



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

IASMIN SOUZA LIMA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE VARREDURA GENÔMICA E ASSOCIAÇÃO COM
INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI***

Vitória da Conquista, BA

2021

IASMIN SOUZA LIMA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE VARREDURA GENÔMICA 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. Dr. Thiago Magalhães da Silva
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB.

Vitória da Conquista, BA

2021

L732

Lima, Iasmin Souza.

Análise exploratória de varredura genômica e associação com infecção por *Helicobacter pylori*. / Iasmin Souza Lima. --Vitória da Conquista, 2021. 60 f.: il.

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

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Magalhães da Silva

Dissertação (Mestrado – Pós-Graduação em Biociências) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2021.

1. Infecções por *helicobacter pylori*. 2. Estudos de Associação Ampla do Genoma 3. Reprodutibilidade. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Marques, Cintia Rodrigues. III. Silva, Thiago Magalhães da Silva Thiago Magalhães da. IV. Título.

CDU: 616.33-002

IASMIN SOUZA LIMA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE VARREDURA GENÔMICA 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, 09/12/2021.



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



Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Gustavo Nunes de Oliveira Costa (Examinador)
(Universidade Salvador - UNIFACS)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder coragem para realizar mais essa etapa da minha vida.

A Cintia, minha orientadora. Obrigada por sua generosidade e por todo conhecimento compartilhado.

A Thiago, meu co-orientador que tornou as análises de dados passíveis de ocorrer em tempo hábil. Obrigada, professor.

A UFBA e ao Programa de Pós Graduação em Biociências, pelo apoio, infraestrutura, professores e funcionários qualificados.

Aos voluntários da coorte Salvador - SCAALA. Sem eles a pesquisa não teria acontecido.

A FAPESB, pelo apoio financeiro.

Aos colegas de mestrado, obrigada pelos momentos descontraídos.

A Alice, Pedro e Lucas por todo incentivo e compressão que recebi de vocês.

“É necessário sair da ilha para ver a ilha.

Não nos vemos se não saímos de nós”.

José Saramago

LIMA, Iasmin Souza. Análise exploratória de varredura genômica e associação com infecção por *Helicobacter pylori*. 61 pp. il. 2021. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2021.

RESUMO

A infecção pelo *Helicobacter pylori* provoca uma resposta inflamatória no hospedeiro e o desenvolvimento de várias doenças gástricas, como o câncer gástrico. Evidências na literatura indicam que a susceptibilidade à infecção pela bactéria está associada a fatores genéticos do indivíduo. Diversos estudos demonstram que polimorfismos genéticos em genes relacionados a resposta imunológica possuem relação direta com a infecção por *H. pylori*. Entretanto, poucos Estudos de Associação Ampla do Genoma (GWAS) têm sido realizados. Até o momento, existem poucos dados para a população brasileira, principalmente para *coorte* de crianças. Portanto, este trabalho avaliou a associação entre polimorfismos genéticos e infecção por *Helicobacter pylori* através de um estudo de varredura genômica conduzido em uma população Latino Americana miscigenada. Para isso, foram incluídas nesse trabalho 1.161 crianças que participam do Programa Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA). O DNA foi extraído de amostras de sangue periférico usando o kit comercial Qiagen Flexigene. Variantes de Nucleotídeo Único (SNVs) para a população SCAALA foram genotipadas usando o painel comercial Illumina HumanOmni2.5-8. A detecção de infecção por *H. pylori* foi realizada usando um ensaio de imunização ligada a enzima (ELISA), seguindo as instruções do fabricante. A análise de regressão logística foi usada para examinar a associação com infecção por *H. pylori*, assumindo um modelo genético aditivo. Como resultado, encontramos 22 SNVs sugestivamente associados à infecção por *H. pylori*. Desse total, 2 polimorfismos se destacaram em nosso estudo. O SNV mais sugestivamente associado foi o alelo T rs77955022 (OR = 2,27; IC (95%) = 1,65 - 3,13; p=4.83-07), que está localizado no cromossomo 5 em uma região intrônica do gene *EXOC3* (componente do complexo exocístico 3). O segundo SNV mais sugestivamente associado foi o alelo G rs10914996 (OR = 0,61; CI (95%) = 0,50 - 0,74; p=8.97-07), que pode ser encontrado na região 1p35.1. Reproduzimos nossos resultados na *coorte* Study of Health in Pomerania (SHIP) e os SNVs rs2339212-alelo A (OR = 1,14; IC (95%) = 1,048 - 1,241; p = 0,0024), rs4795970-alelo A (OR = 0,879; CI (95%) = 0,808 - 0,957; p = 0,0029) e rs6595814-alelo A (OR = 0,878; CI (95%) = 0,772 - 0,998; p = 0,046) foram replicados. Além disso, observamos a presença de 23 variantes no locus 4p14 do receptor toll-like (TLR), que foram verdadeiramente associadas a soroprevalência ao *H. pylori* em um GWAS realizado em populações europeias, em nosso banco de dados. Nossos dados sugerem que variantes de nucleotídeo único podem condicionar o indivíduo à infecção por *Helicobacter pylori*. Além disso, nosso trabalho, até o momento, é o único que traz análises de varredura genômica para infecção por *H. pylori* em uma população miscigenada e não adulta. No entanto, mais estudos devem ser realizados para melhor compreender os efeitos funcionais dessas variantes, bem como replicar esses achados em outras populações.

Palavras-chave: GWAS. Reprodutibilidade. *Helicobacter pylori*. Infecção.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection causes an inflammatory response in the host and the development of various gastric diseases, such as gastric cancer. Evidence in the literature indicates that susceptibility to infection by the bacteria is associated with the individual's genetic factors. Several studies demonstrate that genetic polymorphisms in genes related to immune response have a direct relationship with *H. pylori* infection. However, few Genome Wide Association Studies (GWAS) have been performed. So far, there are few data for the Brazilian population, especially for the cohort of children. Therefore, this work evaluated the association between genetic polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection through a genomic scanning conducted in a mixed Latin American population. For this purpose, 1,161 children participating in the Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA) program were included in this work. DNA was extracted from peripheral blood samples using the commercial Qiagen Flexigene kit. Single Nucleotide Variants (SNVs) for the SCAALA population were genotyped using the commercial Illumina HumanOmni2.5-8 panel. Detection of *H. pylori* infection was performed using an enzyme-linked immunization assay (ELISA) following the manufacturer's instructions. Logistic regression analysis was used to examine the association with *H. pylori* infection, assuming an additive genetic model. As a result, we found 22 SNVs suggestively associated with *H. pylori* infection. Of this total, 2 polymorphisms stood out in our study. The most suggestively associated SNV was the T allele rs77955022 (OR = 2.27; CI (95%) = 1.65 - 3.13; p=4.83-07), which is located on chromosome 5 in an intronic region of the *EXOC3* gene (component of the exocystic complex 3). The second most suggestively associated SNV was the G allele rs10914996 (OR = 0.61; CI (95%) = 0.50 - 0.74; p=8.97-07), which can be found in the 1p35.1 region. We reproduced our results in the Study of Health in Pomerania (SHIP) cohort and the SNVs rs2339212-allele A (OR = 1.14; CI (95%) = 1.048 - 1.241; p = 0.0024), rs4795970-allele A (OR = 0.879; CI (95%) = 0.808 - 0.957; p = 0.0029) and rs6595814-allele A (OR = 0.878; CI (95%) = 0.772 - 0.998; p = 0.046) were replicated. In addition, we observed the presence of 23 variants at the 4p14 toll-like receptor (TLR) locus, which were truly associated with *H. pylori* seroprevalence in a GWAS performed in European populations, in our database. Our data suggest that single nucleotide variants may condition the individual to *Helicobacter pylori* infection. Furthermore, our work, so far, is the only one that brings genomic scanning analyzes for *H. pylori* infection in a mixed and non-adult population. However, more studies should be carried out to better understand the functional effects of these variants, as well as to replicate these findings in other populations.

Keywords: GWAS. Reproducibility. *Helicobacter pylori*. Infection.

SUMÁRIO

1 Introdução	10
2 Revisão de Literatura	11
2.1 Epidemiologia da Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	11
2.2 Resposta Imunológica.....	16
2.3 Susceptibilidade Genética.....	19
2.3.1 Estudos de Gene Candidato.....	19
2.3.2 Estudos de Varredura Genômica.....	21
3 Objetivos	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4 Material e Métodos	23
4.1 População de Estudo.....	23
4.2 Detecção Sorológica para <i>Helicobacter pylori</i>	23
4.3 Genotipagem e Controle de Qualidade.....	23
4.4 Reprodutibilidade em Estudos de Associação Ampla do Genoma.....	24
4.5 Análise estatística	24
5. Referências	25
Capítulo 1	34
Considerações Finais	59
ANEXO 1 Normas para formatação do manuscrito Revista Helicobacter.....	60

1 INTRODUÇÃO

A partir das descobertas feitas por Warren e Marshall, no início da década de 1980, de que a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) era responsável por desenvolver gastrite e úlcera péptica nos seres humanos, vários questionamentos surgiram na tentativa de compreender e explicar a patogênese desencadeada por essa bactéria (MARSHALL, 1984; WARREN, 1983).

Helicobacter pylori é um bacilo gram-negativo, espiralado, flagelar, microaerofílico que coloniza a mucosa gástrica humana, presente em diversas regiões estomacais, porém sendo mais constantemente encontrada no antro gástrico. *H. pylori* provoca inflamação na mucosa estomacal que posteriormente se desenvolve em gastrite (WARREN, 1983), estando também associada a outras doenças como úlcera péptica e câncer gástrico (MARSHALL, 1984).

De acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Gastroenterologia, pelo menos metade da população mundial está infectada por *H. pylori*, com taxas de prevalência mais altas nos países em desenvolvimento quando comparado com países desenvolvidos (WGO, 2021). A prevalência da infecção pela bactéria difere globalmente e é moldada por diferentes fatores de risco como cepa bacteriana, genética do hospedeiro, região geográfica, condições sanitárias, situação socioeconômica, ambiente de trabalho, idade e etnia (LEJA et al., 2019). E a sua transmissão podendo ocorrer pelas vias oral-fecal, gástrico-oral, oral-oral ou sexual (ZAMANI et al., 2017).

O *H. pylori* utiliza diversas estratégias para colonizar e permanecer na mucosa gástrica humana. Fatores de virulência como urease, citotoxina associada ao gene A (CagA) e citotoxina vacuolante A (VacA), são alguns dos mecanismos desenvolvidos pela bactéria para se estabelecer no ambiente gástrico e que contribuem para a severidade das doenças estomacais relacionadas (BAJ et al., 2020).

A infecção por *H. pylori* desencadeia no hospedeiro tanto resposta imune inata quanto adaptativa, envolvendo a produção e recrutamento de citocinas pró e anti-inflamatórias, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DC) e células T helper (Th) que conjuntamente determinam a resposta imune do hospedeiro e influenciam no desenvolvimento de doenças gástricas associadas à bactéria (WHITE, WINTER & ROBINSON, 2015).

As consequências clínicas da infecção por *H. pylori* são determinadas pela interação patógeno-hospedeiro. A infecção e o desenvolvimento de doenças gástricas dependem de vários parâmetros, que abrangem tanto fatores sociodemográficos (ALEXANDER et al., 2021) quanto mecanismos genéticos bacteriano como os genes de virulência *VacA* (LEUNK et al., 1988) e *CagA* (TUMMURU, COVER & BLASER, 1993) e predisposição genética do hospedeiro (El-OMAR et al., 2000).

Diversos estudos já verificaram associação de polimorfismos em genes relacionados a resposta imunológica com infecção por *H. pylori*, a exemplo *IL-1 β* , *IL-1RN*, *IL-10*, *TNF- α* , *IL-18*, *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* e *TLR10* (El-OMAR et al., 2000; MYUNG et al., 2015; NOACH et al., 1994; RAD et al., 2004; SIMAWARANON; WATTANAWONGDON; TONGTAWEE, 2017). Além disso, estudos têm indicado que a inflamação causada por *H. pylori* induz alterações epigenéticas no hospedeiro (MAEKITA et al., 2006; NAKAJIMA et al., 2006; VAZIRI et al., 2018). Estes estudos sugerem que tanto alterações genéticas quanto epigenéticas podem ser determinantes para a presença da bactéria e interferir no desenvolvimento de doenças gastrointestinais.

Entretanto a maior parte das pesquisas com genes candidatos e análises de varredura genômica são realizadas com populações asiáticas e europeias. Além disso, estes estudos utilizaram indivíduos adultos na sua grande maioria (BARBOZA et al., 2021; HISHIDA et al., 2019; MAYERLE et al., 2013; SAES et al., 2017). Poucos trabalhos utilizaram amostras miscigenadas, como é o caso, por exemplo, dos indivíduos brasileiros. Além disso, no Brasil, estudos de gene candidato e de varredura genômica para susceptibilidade à infecção por *H. pylori* se concentram nas regiões sul e sudeste do país com voluntários adultos (NORONHA et al., 2021; SAES et al., 2017). Considerando essas informações na literatura, este trabalho conduziu um estudo de associação ampla do genoma com indivíduos miscigenados não adultos, com o intuito de conhecer e compreender o perfil genético e sua possível relação com infecção por *H. pylori*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI*

A infecção por *Helicobacter pylori* é a causa mais comum de gastrite em todo o mundo, podendo desenvolver para outras doenças como úlcera péptica e neoplasias

gástricas (SUGANO et al., 2015). Além disso, *H. pylori* também é reconhecida como carcinógeno do tipo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1994).

No trabalho de revisão realizado por Hooi e colaboradores em 2017, foi avaliado que 62 países estimam que pelo menos metade de sua população esteja infectada pelo *H. pylori*. Na Europa, a prevalência da infecção por *H. pylori* varia em aproximadamente 53,57%. Para o continente asiático a prevalência está em torno de 54,75% (HOOI et al., 2017; MEZMALE et al., 2020). Na América do Norte e na Oceania a prevalência da infecção pelo *H. pylori* é baixa, quando comparada com outros países, alcançando 37,1% e 24,4%, respectivamente (HOOI et al., 2017). O continente africano possui a maior taxa de prevalência pelo *H. pylori*, atingindo 70,1%, entretanto, com exceção da gastrite, um papel patológico da bactéria com outras doenças gástricas ainda não está bem esclarecido (SMITH et al., 2021). Já nos países latinos, a prevalência média é de aproximadamente 57,57% (CURADO, DE OLIVEIRA & FAGUNDES, 2019).

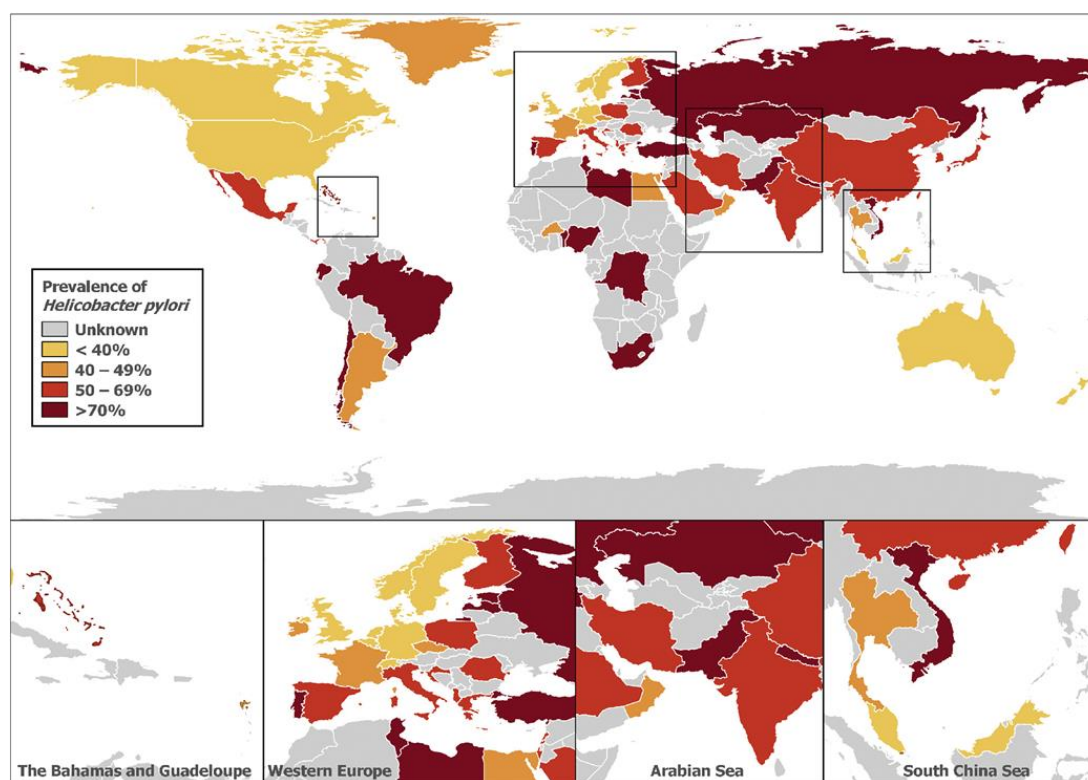


Figura 1. Mapa da prevalência global para infecção por *Helicobacter pylori* (HOOI et al., 2017).

No Brasil, assim como nos demais países, a prevalência da infecção por *H. pylori* difere geograficamente. Nos últimos dez anos diversos estudos têm relatado a prevalência do *H. pylori* em diferentes regiões do país. A presença da infecção bacteriana foi

identificada em aproximadamente 68,57% para a região Norte (RIBEIRO et al., 2010; MIRANDA et al., 2019; VINAGRE et al., 2015), 65,5% para a região Centro-Oeste (BORGES et al., 2019; SILVA et al., 2021), 47,68% para a região Nordeste (BARBOSA et al., 2018; BASÍLIO et al., 2018; DATTOLI et al., 2010; PIMENTEL et al., 2021; SERRA et al., 2020; TRINDADE et al., 2017), 44,57% para a região Sudeste (DOS SANTOS et al., 2021; MATTAR et al., 2020; NORONHA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2019; SILVA et al., 2016) e 54,31% para a região Sul (ANDREOLLA et al., 2016; COGO et al., 2011; FERRARI et al., 2019; NORA et al., 2016).

De acordo com o IV Consenso Brasileiro sobre a infecção por *Helicobacter pylori* realizado em 2018, a aquisição pela bactéria ocorre principalmente na infância, e a prevalência é alta ainda nos primeiros 2 anos de vida, principalmente em indivíduos com condições precárias de vida, baixa renda e recursos limitados de saúde. A depender da região geográfica, desenho e metodologia do estudo, e cepas bacterianas encontradas no local, as taxas de prevalência da infecção podem chegar a 50% em crianças de 2 a 5 anos e 70% a 90% em crianças de 5 a 10 anos. Taxas de prevalência mais baixas são encontradas em indivíduos com maior escolaridade, filhos de pais com maior escolaridade, famílias com melhor nível socioeconômico e residentes em cidades com melhores condições de saneamento e moradia (COELHO et al., 2018).

O principal fator de risco para aquisição e transmissão do *H. pylori* continua sendo o contato interpessoal familiar ainda durante a infância, pelas vias gastro-oral, oral-oral, fecal-oral (KAYALI et al., 2018) ou, menos frequentemente, por contato sexual (IARC, 1994). A transmissão interpessoal pode ser dividida em transmissão vertical e horizontal. A disseminação vertical acontece quando a infecção ocorre dentro da mesma família, enquanto que a transmissão horizontal envolve contato com indivíduos fora da família ou contaminação ambiental (ROTHENBACHER et al., 1999). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo com crianças na cidade de Salvador, Bahia, no qual os autores puderam identificar que ambientes familiares com grandes quantidades de moradores foram positivamente associados à infecção por *H. pylori* (DATTOLI et al., 2010).

Em um estudo no Chile, os autores acompanharam 67 mães e seus filhos até os seis meses de idade. Amostras fecais das gestantes foram colhidas antes do parto e dos bebês aos sete dias, um mês e seis meses de idade, para detecção da bactéria. A positividade para *H. pylori* esteve presente em 71,6% (48/67) das gestantes. Para os recém

nascidos, 8,96% (6/67) deles apresentaram colonização/infecção persistente por *H. pylori*. A prevalência e a incidência da infecção foram de 23,9% e 13%, respectivamente, no primeiro mês de vida (MERINO et al., 2019). De forma geral, esses trabalhos sugerem um risco aumentado para infecção por *H. pylori* nos primeiros anos de vida em relações intrafamiliares.

A região em que o indivíduo reside, área urbana ou rural, também é um fator importante para a contaminação por *H. pylori*, como verificado em diversas pesquisas. Um estudo transversal conduzido com crianças italianas de 5-16 anos de idade residentes em regiões urbana e rural, demonstrou que a soroprevalência da infecção por *H. pylori* foi de 22% (625 de 2.810 crianças) na população total e foi significativamente maior entre as crianças nas áreas rurais (37%) do que nas áreas urbanas (13%). Além disso, foi observado nas áreas rurais, que a presença de animal doméstico aumentava a chance de aquisição da bactéria. Outro dado relevante foi que crianças urbanas que frequentavam creches tiveram uma prevalência de infecção maior (17%) do que aquelas que nunca frequentaram (12%) (DORE et al., 2002).

Estudo equivalente foi realizado recentemente na Hungria com 250 indivíduos adultos. Os autores deste trabalho observaram maior prevalência de infecção por *H. pylori* em residentes de áreas rurais (36.2%) do que em regiões urbanas (27.94%) (BÁLINT et al., 2019). No Brasil, um trabalho semelhante foi realizado em Minas Gerais, Brasil. Nesta pesquisa com indivíduos adultos, a prevalência de infecção por *H. pylori* foi maior em indivíduos de áreas rurais (67,4%) do que residentes em regiões urbanas (56,3%) (NASCIMENTO et al., 2002). Em Monte Negro/RO e Campina Grande/PB - Brasil, respectivamente, foram encontrados resultados similares para presença de *H. pylori* em moradores de área rural (210/266) 78.9% (RIBEIRO et al., 2010) e residentes urbanos (120/200) 59.8% (BASÍLIO et al., 2018).

Condições de higiene e hábitos alimentares são importantes características que aumentam o risco de contaminação pela bactéria. Estudos no Irã, Peru e Brasil encontraram, respectivamente, a presença generalizada de *H. pylori* em 36% (14/39), 12.2% (9/82), 52,72% (396/751) das amostras de água residencial coletadas, indicando uma possível fonte de disseminação e contaminação desse patógeno (CASTILLO et al., 2019; FARHADKHANI et al., 2019; SERRA et al., 2020). O consumo de frutos do mar, alimentos crus como alface, tomate, pimenta, chicória, leite não processado industrialmente e ingestão de alimentos fora de casa foram considerados com fatores de

risco de contaminação por *H. pylori* (GUESSOUM, GUECHI & ADNANE, 2018; MONNO et al., 2019; PINA-PÉREZ et al., 2019).

Algumas pesquisas demonstraram que determinados profissionais apresentam maiores riscos de contaminação por *H. pylori*. Uma revisão descreveu a prevalência da infecção por *H. pylori* em diferentes grupos de trabalhadores. Ao todo, 98 estudos foram incluídos na análise, no entanto, a maioria dos estudos datavam de duas décadas. Os profissionais de saúde, principalmente aqueles que trabalhavam em unidades gastrointestinais, apresentaram maiores chances de contágio pela bactéria do que a população em geral. Semelhantes resultados foram vistos em trabalhadores relacionados à agricultura, sanitização, mineração e instituições para deficientes intelectuais (KHEYRE et al., 2018).

Resultados similares foram encontrados em pesquisas atuais, como verificado por Bálint et. al, 2019 em que trabalhadores agrícolas/industriais eram mais propensos a serem positivos para infecção por *H. pylori* do que aqueles trabalhavam em ambiente corporativo (38,35% e 30,11%), respectivamente. Nos Emirados Árabes Unidos, as babás apresentaram a maior prevalência de *H. pylori* (64,3%), seguidas por operários (43,2%), industriais (41,2%) e estudantes (35,2%) (KHODER et al., 2019).

Helicobacter pylori causa gastrite crônica ativa em todos os indivíduos colonizados. A erradicação do *H. pylori* cura a gastrite e pode alterar a progressão para complicações de longo prazo ou recorrência da doença. Por essas razões, esse patógeno é considerado causador de uma doença infecciosa, independentemente dos sintomas do indivíduo e do estágio da doença (SUGANO et al., 2015).

De acordo o Consenso Maastricht V/Florence de 2017 que sugere um guia de manejo da infecção por *H. pylori*, o diagnóstico pode ser feito por meio do teste respiratório de ureia marcada, teste de antígeno fecal, sorologia, teste rápido da urease, ensaios moleculares, histoquímica, imunohistoquímica e cultura microbiológica. A escolha do teste depende de diversos fatores como custo, disponibilidade, idade e condição clínica do paciente, e a prevalência de *H. pylori* na população (MALFERTHEINER et al., 2017).

O tratamento de erradicação da infecção por *H. pylori* basicamente consiste na terapia quádrupla com bismuto ou terapia quádrupla sem bismuto por 10-14 dias para pacientes que residem em áreas com altos índices de resistência do patógeno à

claritromicina. A terapia quádrupla com bismuto consiste em um inibidor da bomba de prótons (IBP), bismuto e 2 tipos de antibióticos. Tradicionalmente, os antibióticos incluídos são metronidazol e tetraciclina. Posteriormente, amoxicilina, claritromicina e tinidazol também foram incluídos. A terapia quádrupla consiste em um IBP e 3 tipos de antibióticos, geralmente incluindo amoxicilina, claritromicina e metronidazol. A terapia tripla que inclui um IBP e dois antibióticos incluindo claritromicina e alternando entre amoxiciclina e metronidazol, é indicada para pacientes moradores de regiões em que *H. pylori* apresenta baixa resistência à claritromicina (MALFERTHEINER et al., 2017; SUZUKI et al., 2021).

A terapia de erradicação do *H. pylori* deve ser realizada o quanto antes possível, pois elimina a inflamação gástrica curando a gastrite e impedindo a possibilidade de desenvolvimento de doenças gástricas com maior gravidade (MALFERTHEINER et al., 2017).

2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A infecção por *H. pylori* é tipicamente adquirida durante a infância e quando não tratada se torna uma infecção para o resto da vida (CHONG et al., 1994). Durante a infecção por *H. pylori*, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune, que pode não ser eficaz para eliminar o patógeno. Evidências indicam que a resposta imunológica desempenha um papel importante na patogênese desencadeada por *H. pylori*. Dessa forma, *H. pylori* estabelece com sucesso uma infecção persistente que leva à inflamação crônica usando uma série de estratégias para conseguir evitar a resposta imune, colonizar e persistir no ambiente gástrico (LINA et al., 2014).

O lúmen do estômago possui pH 1-2. Essa acidez diminui a motilidade do *H. pylori*, limitando sua sobrevivência por apenas alguns minutos. Assim, *H. pylori* deve migrar rapidamente para regiões do estômago com pH neutro ou ligeiramente alcalino para obter sucesso na colonização gástrica (SCHREIBER et al., 2005, 2006). *H. pylori* produz a enzima urease que hidrolisa a ureia presente no suco gástrico em bicarbonato e amônia iônica e conseqüentemente alcaliniza o ambiente estomacal. Em pH baixo, as mucinas presentes no muco gástrico se convertem em um estado de gel que efetivamente captura as bactérias, mas na presença da atividade da urease, o pH aumenta e subsequentemente, a viscosidade das mucinas diminuem, fazendo com que patógenos,

como *H. pylori*, sejam capazes de transitar na camada mucosa (CELLI et al., 2009; SIDEBOTHAM et al., 2003).

As cepas de *H. pylori* também expressam as enzimas catalase e superóxido dismutase que são importantes para a neutralização de espécies reativas de oxigênio (BENOIT & MAIER, 2016). Além dessas proteínas, a arginase atua limitando a produção de óxido nítrico por monócitos, neutrófilos e células epiteliais promovendo assim a sobrevivência bacteriana (LEWIS et al., 2010). *H. pylori* também altera a autofagia das células infectadas por meio da inibição da depuração lisossomal de autofagossomos, que pode promover o acúmulo de autofagossomos nas células epiteliais gástricas contribuindo para a sobrevivência bacteriana (ZHANG et al., 2018).

A infecção por *H. pylori* desencadeia uma resposta inflamatória no hospedeiro que leva ao recrutamento de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o tecido gástrico (WHITE, WINTER & ROBINSON, 2015). Através de componentes de secreção do tipo IV codificados pela ilha de patogenicidade do gene associado à citotoxina (*cag PAI*) e pelo gene *VacA*, o *H. pylori* consegue inibir com eficiência sua própria captação por essas células fagocíticas (ALLEN, SCHLESINGER & KANG, 2000). Além disso, foi verificado também que *VacA* alterava a apresentação de antígeno pelas células B (MOLINARI et al., 1998) e T, desregulava o funcionamento das células Th1 (GEBERT et al., 2003) e interferia na proliferação das células TCD4⁺, TCD8⁺ e B (TORRES et al., 2007).

Um dos mecanismos que *H. pylori* utiliza para evitar o sistema imune inato é escapar da detecção pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que são proteínas que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Quando os PRRs reconhecem os PAMPs, ocorre cascatas de ativação extracelular levando a respostas inflamatórias que são essenciais para a eliminação do patógeno (GONZALEZ et al., 2021). Receptores semelhantes a Toll (TLRs) são o principal agrupamento de PRRs que reconhecem PAMPs. Lipopolissacárideos (LPS), peptidoglicanos, lipoproteínas, ácido lipoteicóico e ilhas CpG são os principais alvos dos TLRs (TAKEDA & AKIRA, 2004).

Estudos demonstram que *H. pylori* escapa com sucesso do reconhecimento pelos TLRs. Como, por exemplo, o LPS bacteriano consegue fugir do reconhecimento de TLR4. A atividade do LPS de *H. pylori* é 1000 vezes menor do que a do LPS da

Escherichia coli (*E. coli*). Esta menor atividade se deve à forma tetra-acilada do LPS de *H. pylori* em comparação com LPS hexa-acilado de *E. coli* (STEAD et al., 2008). Entretanto, outros estudos sugerem que o TLR2 seja o receptor para LPS de *H. pylori* (SMITH et al., 2011). A flagelina, outro PAMP de *H. pylori*, consegue alterar o domínio N-terminal de reconhecimento do TLR5, resultando em baixa afinidade de ligação do componente microbiano ao receptor, dessa forma escapando da resposta imune (GEWIRTZ et al., 2004).

Experimentos realizados com células dendríticas (DC) mostraram que o sistema imune reconhece o ácido nucléico de *H. pylori* (RAD et al., 2009). O DNA de *H. pylori* liberado intracelular em DCs ativa TLR9 levando a respostas anti-inflamatórias. Em modelo de camundongo, foi verificado que a sinalização de TLR9 tem efeitos anti-inflamatórios nos estágios iniciais da infecção por *H. pylori* (VARGA & PEEK, 2017). Além disso, um estudo experimental em camundongos confirmou que o DNA de *H. pylori* pode inibir o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Esse resultado foi atribuído a uma sequência específica (TTTAGGG) que parece ser exclusiva do genoma de *H. pylori* (HANSEN et al., 2011).

Ainda há poucos dados sobre populações de células linfóides e células natural killers (NK) no contexto de infecção por *H. pylori*. As células NK foram vistas com maior abundância na mucosa gástrica infectada (O'KEEFFE et al., 2008) e detectada no sangue periférico de pacientes com infecção pela bactéria (RUDNICKA et al., 2013). Não está bem compreendido como esses tipos de células contribuem para a infecção, no entanto, perforinas e granzimas derivadas de células NK podem causar danos às células hospedeiras. Foi observado que células NK respondem à incubação com *H. pylori* ou seus produtos secretados através de citocinas inflamatórias, como interferon-gama (IFN γ) e TNF α (fator de necrose tumoral) (YUN et al., 2005).

A infecção por *H. pylori* induz uma forte resposta de células T, que inclui células CD4⁺ e CD8⁺. A mucosa gástrica de humanos infectados contém um número aumentado de células CD8⁺ as quais contribuem para a inflamação e infecção (FIGUEIREDO SOARES et al., 2007). As principais populações de células T auxiliares (Th) induzidas pela infecção por *H. pylori* são subconjuntos de células pró-inflamatórias Th17 e Th1 e células T regulatórias (Treg), no entanto, as respostas Th2 e Th22 também foram relatadas (BUZZELLI et al., 2015; ENARSSON et al., 2006; ROBINSON et al., 2008; SERELLI-LEE et al., 2012; ZHUANG et al., 2015).

Células Th1 secretam as citocinas IFN γ e TNF α , que estimulam macrófagos a liberarem moléculas pró-inflamatórias no combate a bactéria (POPOVA et al., 2011). Células Th17 participam do recrutamento de neutrófilos, produção de peptídeos antimicrobianos, quimiocinas e citocinas, como IL-6, IL-8 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que são importantes no controle de patógenos extracelulares (DIXON et al, 2019). Em um estudo, os autores puderam observar que células Th17 *H. pylori*-específicas permanecem no sangue e na mucosa gástrica de indivíduos que já tiveram a infecção, sugerindo que essa inflamação constante possa elevar o risco de patologias gástricas, mesmo que a bactéria tenha sido erradicada (SERELLI-LEE et al., 2012).

Apesar da resposta imune desencadeada pelas células Th1/Th2/Th17, a total eliminação de *H. pylori* pode não ser efetivada devido a ativação das células Tregs FOXP3⁺ (LIU; ZHANG; ZHAO, 2019). Células Treg têm a função de suprimir respostas imunológicas, principalmente através de interações célula-célula e/ou a produção do fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e IL-10 (READ & POWRIE, 2001). Estudos recentes têm evidenciado níveis elevados de células Tregs FOXP3⁺ em pacientes com infecção por *H. pylori* em relação ao controle negativo (BAGHERI et al., 2017; LIU; ZHANG; ZHAO, 2019), possibilitando a persistência pela infecção (LUNDGREN et al., 2005).

2.3 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA

2.3.1 Estudos de gene candidato

O desfecho clínico da infecção pelo patógeno *Helicobacter pylori* não é o mesmo para todos os indivíduos e também difere em diferentes grupos étnicos. A infecção ocorre no início da vida e embora algumas pessoas infectadas desencadeiam uma resposta imunológica e desenvolvam gastrite, a maioria dos indivíduos continuam assintomáticos. Polimorfismos genéticos do hospedeiro também foram identificados como fatores que desempenham um papel na mediação do resultado clínico da infecção. Diferentes estudos apresentam evidências de que polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune, como citocinas pró e anti-inflamatórias e PRRs, desempenham um papel na modulação do desfecho da doença (CLYNE & ROWLAND, 2019).

Diversos estudos demonstraram que genes e variantes genéticas desempenham um papel importante na infecção por *H. pylori*. Como verificado em um estudo com pacientes iraquianos, onde os pesquisadores analisaram quatro SNVs (variante de nucleotídeo único) no gene β -defensina. Este gene possui elevada expressão em células epiteliais e tem função antimicrobiana, atuando na resposta imunológica contra *H. pylori*. Os resultados mostraram que a variante rs2740090 (C/T) foi associada com a recorrência de infecção por *H. pylori* (SULEIMAN, SHABAN & AL-CHALABI, 2021).

Em relação ao rs1800972 (C/T), o alelo T e o genótipo CT foram significativamente associados a uma maior possibilidade de recuperação de infecções pelo patógeno, entretanto as frequências mais altas foram encontradas em pacientes com o rs2740091 (G/A). Além disso, o haplótipo (rs1800972, rs1047031, rs2740090 e rs2740091) revelou que (CGCC e CGCT) apareciam com maior frequência em pacientes tratados para a infecção do que naqueles recorrentes. Esses dados sugerem que polimorfismos no gene β -defensina podem afetar sua expressão e interferir na resposta ao tratamento de pacientes com *H. pylori* (SULEIMAN, SHABAN & AL-CHALABI, 2021).

Em outro trabalho, as variantes *IL6*-174 G/C, *IL8*-251 A/T, *IL1 β* -511 C/T e *IL1RN* VNTR (número variável de repetição em tandem) foram avaliadas em diferentes lesões gástricas associadas com *H. pylori*. Os autores constataram que o genótipo heterozigoto *IL6*-174 GC foi mais presente em pacientes com gastrite crônica inativa do que naqueles com gastrite crônica ativa, apresentando um efeito protetor. Considerando o sexo do indivíduo, *IL6*-174 foi observada apenas nas mulheres. A importância do gênero nas análises de risco/proteção também foi observada em *IL8*-251, onde o genótipo AT conferia proteção às mulheres e, por outro lado, os mesmos alelos foram associados ao risco em homens. Parece, portanto, que o polimorfismo *IL8*-251 desempenha um papel duplo no gastrite crônica ativa de acordo com o gênero, o que pode ser devido a diferenças hormonais e/ou de estilo de vida. Além disso, o alelo *IL8*-251 T e o alelo *IL1 β* -511 T em pacientes com gastrite crônica ativa, foram associadas às cepas mais virulentas de *H. pylori* (BARBOZA et al., 2021).

Em um estudo realizado na Turquia, polimorfismos nos genes *TLR1* rs4833095, *TLR2* rs3804099, *TLR5* rs5744174 e *TLR10* rs10004195, foram avaliados. De acordo esse trabalho, o alelo C em rs4833095 (odds ratio (OR), 2.01), rs3804099 (OR, 1.78), rs5744174 (OR, 1.87) e alelo A de rs10004195 (OR, 2.66), foram associados

significativamente à um maior risco de infecção por *H. pylori* (KALKANLI TAS et al., 2020). Já em uma pesquisa com amostras gástricas pediátricas, os pesquisadores analisaram o rs4073 (-251 T>A) presente no gene *IL-8*. Em indivíduos infectados com *H. pylori*, o genótipo AA (OR, 16.30) foi associado a maiores chances de desenvolver gastrite quando comparados com os genótipos TA e TT (SAES et al., 2017).

2.3.2 Estudos de varredura genômica

Durante os últimos anos, um crescente interesse surgiu em investigar a influência dos fatores genéticos na variação do comportamento humano. O objetivo dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS) é identificar variantes de nucleotídeo único (SNVs) dos quais as frequências alélicas variam sistematicamente como uma função de valores de traços fenotípicos. A identificação de SNPs associados a características pode, subsequentemente, revelar novos *insights* sobre os mecanismos biológicos subjacentes a esses fenótipos. Os avanços em ferramentas tecnológicas permitem a investigação de um grande número de SNVs distribuídos por todo o genoma e sugerir o seu impacto em determinado desfecho (MAREES et al., 2018).

Atualmente há diversos estudos de GWAS para diferentes patologias, como doença de Alzheimer (KUNKLE et al., 2019), vírus da hepatite B (LI et al., 2016), malária (TIMMANN et al., 2012), Covid-19 (KATZ et al., 2020), câncer de mama (FERREIRA et al., 2019), entre outros. Na literatura existem alguns estudos de GWAS que avaliam somente o *status* de infecção por *H. pylori* como os trabalhos realizados por Chong et al., 2021 e Hu et al., 2021, que identificaram os SNVs rs35030589 e rs1687312, rs7875160, rs8046411, rs5749679 sugestivamente associados, respectivamente. Já em um GWAS para úlcera péptica associada a infecção por *H. pylori*, foi possível encontrar 8 variantes sugestivas localizadas ou próximas aos genes *MUC1*, *MUC6*, *FUT2*, *PSCA*, *ABO*, *CDX2*, *GAST* e *CCKBR1* os quais estão envolvidos na suscetibilidade à infecção, resposta para neutralizar os danos relacionados à infecção, secreção de ácido gástrico ou motilidade gastrointestinal (WU et al., 2021). Resultados significativamente associados foram encontrados numa população europeia, na qual dois *loci*, 4.p14 e 1q23.3, atingiram significância a nível de GWAS (MAYERLE et al., 2013). Contudo, grande parte dos estudos de varredura buscam relacionar doenças gastrointestinais induzidas por *H. pylori*.

GWAS realizados em indivíduos chineses com infecção por *H. pylori* puderam identificar polimorfismos em genes como *PSCA* e *PRKAA1*, aumentando o risco de câncer gástrico quando comparado aos indivíduos sem a presença da bactéria (CAI et al., 2017; HISHIDA et al., 2019; LI et al., 2013). Outro trabalho conduzido com uma população japonesa evidenciou que o SNP rs6490061, localizado em uma região de íntron do gene *CUX2*, estava relacionado a alteração da expressão desse gene. Uma associação significativa também foi encontrada entre o rs7849280 com a elevada expressão do gene *ABO*, enquanto que a infecção por *H. pylori* diminuía sua expressão. Este achado sugere que tanto o polimorfismo como o tipo sanguíneo podem interferir na relação patógeno-hospedeiro (TANIKAWA et al., 2018).

A maior parte dos estudos de varredura genômica em indivíduos com infecção com *H. pylori*, se concentram em amostras asiáticas ou europeias e compreendidas por voluntários adultos. Poucos estudos são conduzidos com populações pediátricas e/ou com indivíduos miscigenados. Desta forma, mais estudos de GWAS com amostras heterogêneas e não adultas devem ser conduzidos para avaliar a possível susceptibilidade genética à infecção por *H. pylori*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a associação entre polimorfismos genéticos e infecção por *Helicobacter pylori* através de uma análise exploratória de varredura genômica.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar fatores de riscos genéticos, através de um estudo de varredura genômica, associados a soroprevalência de *H. pylori* em crianças.
- Descrever as frequências dos polimorfismos mais associados a soroprevalência por *H. pylori* em uma população brasileira.
- Reproduzir nossos resultados na *coorte* Study of Health in Pomerania (SHIP).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de estudo

Este estudo foi conduzido com 1.161 crianças de 4 a 11 anos que participam do Programa Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA) residentes na cidade de Salvador que possui uma população de aproximadamente 2.8 milhões de habitantes. A amostra dessa *coorte* consiste em 1.446 crianças recrutadas na infância por um estudo prospectivo que visava medir o impacto de um programa de saneamento na cidade de Salvador sobre a morbidade infantil (BARRETO et al., 2007).

Os dados das crianças que moravam em áreas intra-urbanas de Salvador foram coletados em 2003 e 2005. Questionários padronizados foram aplicados ao responsável legal de cada criança para coletar dados sobre as variáveis demográficas e sociais, bem como sobre o ambiente doméstico. Este trabalho possui aprovação do Comitê de Ética Nacional de Pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foi apropriadamente obtido pelo responsável legal de cada criança (BARRETO et al., 2006). Além disso, a pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios descritos na Declaração de Helsinque.

4.2 Detecção sorológica para *Helicobacter pylori*

A presença de anticorpos IgG em amostras de sangue foi determinada por ELISA usando um kit comercialmente disponível (Diamedix, Miami, FL, EUA) seguindo as instruções fornecidas pelo fornecedor. O *cut-off* foi determinado por um valor de índice obtido pela relação entre a absorbância da amostra e a absorbância de um calibrador (uma solução contendo soro humano ou plasma desfibrinado, com anticorpos IgG fracamente reativos com *H. pylori* e 0,1% de azida sódica). Uma proporção > 1,1 foi considerada positiva. Assuntos limítrofes foram removidos da análise (DATOLLI et al., 2010).

4.3 Genotipagem e controle de qualidade

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico utilizando Kit comercial Qiagen Flexigene. Os SNVs genotipados para população SCAALA foram realizados com o painel comercial Illumina Human Omni2.5-8 Kit BeadChip (www.illumina.com) (KEHDY et al., 2015) O controle de qualidade foi realizado aplicando a taxa de chamada da genotipagem (call rate) inferior a 0,98; e valor de p para

o alelo de menor frequência (Minor Allele Frequency – MAF) inferior a 1% (MAREES et al., 2018).

4.4 Reprodutibilidade em Estudos de Associação Ampla do Genoma

Resultados obtidos em estudos de associação genômica devem ser reproduzidos em populações independentes. A importância da realização desta confirmação em outras amostras com desenho e métodos diferentes fornece credibilidade nos achados observados, descartando as chances de resultados espúrios (KRAFT, ZEGGINI, IOANNIDIS, 2009). Os resultados encontrados em nossa população foram reproduzidos na população do Study of Health in Pomerania (SHIP).

SHIP é um estudo de base populacional realizado no nordeste da Alemanha que tem como objetivos avaliar a prevalência e incidência de fatores de risco comuns, distúrbios subclínicos e doenças clínicas como também investigar associações entre essas variáveis. Os voluntários e suas respectivas informações foram coletadas e acompanhadas entre 1997 e 2012 (JONH et al., 2001; VÖLZKE et al., 2011; VÖLZKE, 2012).

Nosso estudo de reprodutibilidade foi conduzido na mesma amostra utilizada em um Estudo de Associação Ampla do Genoma conduzido em 2013 em uma população europeia. A amostra compreende 3.830 indivíduos (958 casos e 2.736 controles) entre 20-79 anos de idade com determinação da soroprevalência para *Helicobacter pylori* mensurados por títulos de anticorpos IgG séricos maiores que 25% (MAYERLE et al., 2013).

4.5 Análise estatística

Regressão logística foi realizada no programa Plink 1.9 para examinar a associação entre variantes e infecção por *Helicobacter pylori*, assumindo um modelo genético aditivo. As análises foram ajustadas para os três primeiros componentes principais, idade e sexo. A análise de componentes principais controla a confusão, além de calcular o fator de inflação genômico (λ), com a função de visualizar e evitar estatísticas de teste infladas nos resultados. Uma associação é considerada sugestiva quando o valor de p está entre 10^{-6} e 10^{-8} e verdadeiramente associada quando o valor de p é menor que 10^{-8} (MAREES et al., 2018). Para selecionar os SNVs mais sugestivos,

usamos a linguagem de programação R através do pacote qqman com as seguintes suposições: $\text{genomewideline} = -\log_{10}(5e-08)$ e $\text{annotatePval} = 1e-05$. Para imputação, usamos a ferramenta IMPUTED e a população africana como referência (genomas hg19 / 1000, Nov. 2014 AFR) (DA SILVA et al, 2019; DE SENA-REIS et al., 2019).

5 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, S.M. et al. *Helicobacter pylori* in human stomach: the inconsistencies in clinical outcomes and the probable causes. **Frontiers in Microbiology**, Trivandrum, India, v. 12, p.1-17, ago. 2021.

ALLEN, L.A.; SCHLESINGER, L.S.; KANG, B. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. **J Exp Med.**, Iowa, USA, v. 91, n. 1, p. 115-28, jan. 2000.

ANDREOLLA, H.F. et al. Lack of association between *Helicobacter pylori*'s virulence and increased serum c-reactive protein levels in functional dyspeptic patients. **Arquivos de Gastroenterologia**, Rio Grande do Sul, Brasil, v. 53, n. 1, p. 49-54, mar. 2016.

BAGHERI, N. et al. Role of regulatory T-cells in different clinical expressions of *Helicobacter pylori* infection. **Archives of Medical Research**, Tehran, Iran, v. 47, n. 4, p. 245-254, 2019.

BAJ, J. et al. *Helicobacter pylori* virulence factors-mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. **Cells**, Lublin, Polônia, v. 10, n. 1, p. 27-25, dez. 2020.

BÁLINT, L. et al. Epidemiologic characteristics of *Helicobacter pylori* infection in southeast Hungary. **World J Gastroenterol**, Szeged, Hungria, v. 25, n. 42, p. 6365-6372, nov. 2019.

BARBOSA, A.M.C. et al. Platelet count response to *Helicobacter pylori* eradication for idiopathic thrombocytopenic purpura in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Ceará, Brasil, v. 40, n. 1, p. 12-17, mar. 2018.

BARBOZA, M.M.O. et al. Contribution of genetic polymorphisms of interleukins *IL1B*-511 C/T, *IL1RN* VNTR, *IL6*-174 G/C, and *IL8*-251 A/T in gastric lesions: gender and *Helicobacter pylori* genes matter. **Archives of Microbiology**, Ceará, Brasil, v. 203, p. 3467–3472, 2021.

BARRETO, M.L. et al. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). **BMC Pulmonary Medicine**, Salvador, Brasil, v. 6, n. 15, p. 1-10, jun. 2006.

BARRETO, M.L. et al. Effect of city-wide sanitation programme on reduction in rate of childhood diarrhoea in northeast Brazil: assessment by two cohort studies. **Lancet**, Salvador, Brasil, v. 370, n. 9599, p. 1622-8, nov. 2007.

BASÍLIO, I.L.D. et al. Risk factors of *Helicobacter pylori* infection in an urban community in Northeast Brazil and the relationship between the infection and gastric diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Paraíba, Brasil, v. 51, n. 2, p. 183-189, mar. 2018.

BENOIT, Stéphane; MAIER, Robert. *Helicobacter* catalase devoid of catalytic activity protects the bacterium against oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, Athens, Georgia, v. 291, n. 45, p. 23366-23373, nov. 2016.

BORGES, S.S. et al. [Article partial retraction] Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients and its association with clinical risk factors for developing gastric adenocarcinoma. **Arquivos de Gastroenterologia**, Goiás, Brasil, v. 56, n. 1, p. 66-70, mar. 2019.

BUZZELLI, J.N. et al. IL33 is a stomach alarmin that initiates a skewed Th2 response to injury and infection. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, Victoria, Austrália, v. 1, n. 2 p. 203-221, jan. 2015.

CAI, M. et al. Environmental factors, seven GWAS-identified susceptibility loci, and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. **Cancer Medicine**, Pequim, China, v. 6, n. 3, p. 708–720, 2017.

CASTILLO, M. et al. *Helicobacter pylori* detected in tap water of Peruvian patients with gastric cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, Lima, Peru, v. 20, n. 11, p. 3193-3196, nov. 2019.

CELLI, J.P. et al. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, USA, v. 106, n. 34, p. 14321-6, ago. 2009.

CHONG, A.H.W. et al. Genetic analyses of common infections in the Avon longitudinal study of parents and children cohort. **Front. Immunol.**, Bristol, UK, v.12, p. 1-15, nov. 2021.

CHONG, J. et al. Occupational exposure to *Helicobacter pylori* for the endoscopy professional: a sera epidemiological study. **The American Journal of Gastroenterology**, Miami, Flórida, v. 89, n. 11, p. 1987-92, nov. 1994.

CLYNE, Marguerite; ROWLAND, Marion. The role of host genetic polymorphisms in *Helicobacter pylori* mediated disease outcome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Dublin, Irlanda, v. 1149, p. 151-172, 2019.

COELHO, L.G.V. et al. IVth Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arquivos de Gastroenterologia**, Minas Gerais, Brasil, v. 55, n. 2, p. 97-121, abr. 2018.

COGO, L.L. et al. Characterization of virulence genes *cagA* and *vacA* in *Helicobacter pylori* and their prevalence in gastrointestinal disorders. Brazilian journal of microbiology. **Brazilian Society for Microbiology**, Curitiba, Paraná, v. 42, n. 4, p. 289-95, out. 2011.

CURADO, M.P.; DE OLIVEIRA, M.M.; FAGUNDES, M.A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Latin America and the Caribbean populations: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol.**, São Paulo, Brasil, v. 60, p. 141-148, jun. 2019.

DA SILVA, T.M. et al. African biogeographical ancestry, atopic and non-atopic asthma and atopy: A study in Latin American children. **Pediatr Pulmonol.**, Salvador, Bahia, v. 54, n. 2, p. 125-132, fev. 2019.

DATTOLI, V.C. et al. Seroprevalence and potential risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children. **Helicobacter**, Salvador, Brasil, v. 15, p. 273-8, jul. 2010.

- DE SENA-REIS, J.S. et al. Relationship between African Biogeographical Ancestry and *Helicobacter pylori* infection in children of a large Latin American urban center. *Helicobacter*, Jequié, Brasil, v. 24, n. 6, p. 1-8, mai. 2019.
- DIXON, B.R.E.A. et al. Th17 Cells in *Helicobacter pylori* Infection: a dichotomy of help and harm. **Infection & Immunity**, Tennessee, USA, v. 87, n. 11, n 87, e00363-19, 2019.
- DORE, M.P. et al. Risk Factors associated with *Helicobacter pylori* infection among children in a defined geographic area. **Infectious Diseases Society of America**, Sardenha, Itália, v. 35, n. 3, p. 240-5, ago. 2002.
- DOS SANTOS, M.P. et al. Decrease of miR-125a-5p in gastritis and gastric cancer and its possible association with *H. pylori*. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, São Paulo, Brasil, v. 52, n. 2, p. 569-574, jun. 2021.
- EL-OMAR, E.M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, Maryland, EUA, v. 404, p. 398-402, mar. 2000.
- ENARSSON, K. et al. Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. **Clinical Immunology**, Göteborg, Suécia, v. 121, n. 3, p. 358-68, dez. 2006.
- FARHADKHANI, M. et al. Potential transmission sources of *Helicobacter pylori* infection: detection of *H. pylori* in various environmental samples. **J Environ Health Sci Eng.**, Isfahan, Irã, v. 17, n. 1, p. 129-134, jan. 2019.
- FERRARI, F. et al. Time trends of *Helicobacter pylori* prevalence in Itajaí - SC: a retrospective study of 25 years based on endoscopic database. **Arquivos de Gastroenterologia**, Santa Catarina, Brasil, v. 56, n. 1, p. 10-14, mai. 2019.
- FERREIRA, M.A. et al. Genome-wide association and transcriptome studies identify target genes and risk loci for breast cancer. **Nature Communications**, Brisbane, Austrália, v. 10, n. 1, p. 1-18, abr. 2019.
- FIGUEIREDO SOARES, T. et al. Differences in peripheral blood lymphocyte phenotypes between *Helicobacter pylori*-positive children and adults with duodenal ulcer. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Minas Gerais, Brasil, v. 13, n. 11 p. 1083-8, nov. 2007.
- GEBERT, B. et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science**, Nova Iorque, Nova Iorque, v. 301, n 5636, p. 1099-102, ago. 2003.
- GEWIRTZ, A.T. et al. *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, Georgia, USA, v. 189, n. 10, p. 1914-20, mai. 2004.
- GONZALEZ, I. et al. Pattern recognition receptors and their roles in the host response to *Helicobacter pylori* infection. **Future Microbiology**, Talca, Chile, v. 16, p. 1229-1238, out. 2021.
- GUESSOUM, M.; GUECHI, Z.; ADNANE, M. First-time serological and molecular detection of *Helicobacter pylori* in milk from Algerian local-breed cows. **Vet World**, Algiers, Argélia, v. 11, n. 9, p. 1326-1330, set. 2018.

- HANSEN, R. et al. Could *Helicobacter* organisms cause inflammatory bowel disease? **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Aberdeen, Reino Unido, v. 61, n. 1, p. 1-14, fev. 2011.
- HISHIDA, A. et al. GWAS analysis reveals a significant contribution of *PSCA* to the risk of *Helicobacter pylori*-induced gastric atrophy. **Carcinogenesis**, Nagoia, Japão, v. 40, n. 5, p. 661-668, jul. 2019.
- HOOI, J.K.Y. et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. **Gastroenterology**, Hong Kong, China, v.153, n. 2, p. 420-429, ago. 2017.
- HU, D. et al. Glycosaminoglycan biosynthesis pathway in host genome is associated with *Helicobacter pylori* infection. **Sci Rep**, Beijing, China, v. 11, n. 18235, p.1-10, set. 2021.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. *Schistosomes*, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.**, Lyon, França, v. 61, p. 1-241, jun. 1994.
- JOHN. U. et al. Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. **Soz Präventivmed**, Greifswald, Alemanha, v. 46, n. 3, p. 186-194, 2001.
- KALKANLI TAS, S. et al. Polymorphisms in Toll-like receptors 1, 2, 5, and 10 are associated with predisposition to *Helicobacter pylori* infection. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, Hamidiye, Turquia, v. 32, n. 9, p. 1141-1146, set. 2020.
- KATZ, D.H. et al. Mining a GWAS of severe Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, Boston, Massachusetts, v. 383, n. 26, p. 1-3, dez. 2020.
- KAYALI, S. et al. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. **Acta Bio-medica: Atenei Parmensis**, Parma, Itália, v. 89, n. 8, p. 72-76, dez. 2018.
- KEHDY, F.S.G. et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Minas Gerais, Brasil, v. 112, n. 28, p. 8696-701, jul. 2015.
- KHEYRE, H. et al. The occupational risk of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Porto, Portugal, v. 91, n. 6, p. 657-674, ago. 2018.
- KHODER, G. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* and its associated factors among healthy asymptomatic residents in the United Arab Emirates. **Pathogens**, Sharjah, UAE, v. 8, n. 2, p. 1-14, abr. 2019.
- KRAFT, P.; ZEGGINI, E.; IOANNIDIS, J.P. Replication in genome-wide association studies. **Stat Sci.**, Boston, USA, v. 24, n. 4, p. 561-573, nov. 2009.
- KUNKLE, B.W. et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. **Nature Genetics**, Flórida, USA, v. 51, n. 3, 414-430, fev. 2019.

- LEJA, M. et al. Review: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, Riga, Letônia, v. 24, n. 1, e12635, set. 2019.
- LEUNK, R.D. et al. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J Med Microbiol.**, Nova Iorque, EUA, v. 26, n. 2, p. 93-9, jun. 1988.
- LEWIS, N.D. et al. Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. **Journal of Immunology**, Nashville, USA, v. 184, n. 5, p. 2572-82, mar. 2010.
- LI, M. et al. *Helicobacter pylori* infection synergizes with three inflammation-related genetic variants in the GWAS to increase risk of gastric cancer in a Chinese Population. **Plos One**, Hubei Province, China, v. 8, n. 9, p. e74976, 2013.
- LI, Y. et al. Genome-wide association study identifies 8p21.3 associated with persistent hepatitis B virus infection among Chinese. **Nature Communications**, Beijing, China, v. 7, n. 1-11, may. 2016.
- LINA, T.T. et al. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. **World Journal of Gastroenterology**, Galveston, EUA, v. 20, n. 36, p. 12753-66, set. 2014.
- LIU, X.; ZHANG, Z.; ZHAO, G. Recent advances in the study of regulatory T cells in gastric cancer. **International Immunopharmacology**, Shanghai, China, v. 73, p. 560-567, 2019.
- LUNDEGREN, A. et al. Mucosal FOXP3- expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. **Infection & Immunity**, Heidelberg, Alemanha, v. 73, n. 1, p. 523-531, 2005.
- MAEKITA, T. 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**, Tóquio, Japão, v.1, n.12, p.989-995, 2006.
- MALFERTHEINER, P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. **Gut**, Maastricht, Holanda, v. 66, n. 1, p. 6-30, jan. 2017.
- MAREES, A.T. et al. A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, Paris, França, v. 27, n. 2, p. 1-10, jun. 2018.
- MARSHALL, Barry; WARREN, John Robin. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, Londres, Inglaterra, v. 1, n. 8390, p. 1311-5, jun. 1984.
- MATTAR, R. et al. Diagnostic accuracy of gastropanel® for atrophic gastritis in Brazilian subjects and the effect of proton pump inhibitors. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, Brasil, v. 57, n. 2, p. 154-160, jun. 2020.
- MAYERLE, J. et al. Identification of genetic loci associated with *Helicobacter pylori* serologic status. **JAMA**, Greifswald, Alemanha, v. 309, n. 18, p. 1912-20, mai. 2013.
- MERINO, J.S. et al. Dynamics of *Helicobacter pylori* infection in infants during the first six months of life. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, Concepción, Chile, v. 37, n. 2, p. 109-111, fev. 2019.

- MEZMALE, L. et al. Review: Epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, Riga, Letônia, v. 25, p. 1-5, set. 2020.
- MIRANDA, A.C. et al. Gender, age, endoscopic findings, urease and *Helicobacter pylori*: all uncorrelated within a sample of a high gastric cancer prevalence population in Amazon. **Arquivos de Gastroenterologia**, Pará, Brasil, v. 56, n. 3 p. 264-269, set. 2019.
- MOLINARI, M. et al. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. **The Journal of Experimental Medicine**, Padova, Itália, v. 187, n. 1, p. 135-40, jan. 1998.
- MONNO, R. et al. *Helicobacter pylori* infection: association with dietary habits and socioeconomic conditions. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, Bari, Itália, v. 43, n. 5, p. 603-607, out. 2019.
- MYUNG, D-S. et al. Association between interleukin-18 gene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in the Korean population. **Scientific Reports**, Gwangju, Coréia, v. 5, p. 1-8, jun. 2015.
- NASCIMENTO, R.S. et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chronic chagasic patients, and in the rural and urban population from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, Minas Gerais, Brasil, v. 44, n. 5, p. 251-4, set. 2002.
- NAKAJIMA, T. et al. Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Tóquio, Japão, v.15, n.11, p. 2317–2321, 2006.
- NOACH, L.A. et al. Mucosal tumor necrosis factor- α , interleukin-1/3, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Amsterdã, Holanda, v. 29, n. 5, p. 425-429, out. 1994.
- NORA, M.D. et al. Is the immunocromatographic fecal antigen test effective for primary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients? **Arquivos De Gastroenterologia**, Rio Grande do Sul, Brasil, v. 53, n. 4, p. 224-227, out. 2016.
- NORONHA, B.P. et al. *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* infections and immunological profile of community-dwelling older adults. **Experimental Gerontology**, Minas Gerais, Brasil, v. 156, p. 1-7, out. 2021.
- O'KEEFFE, J. et al. Natural killer cell receptor T-lymphocytes in normal and *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **Helicobacter**, Galway, Irlanda, v. 13, n. 6, p. 500-5, dec. 2008.
- PIMENTEL, A.M. et al. Endoscopic and histopathological findings of the esophagus, stomach, and duodenum in patients with crohn's disease from a reference center in Bahia, Brazil. **Clinics and Practice**, v. 11, n. 2, p. 374-385, jun. 2021.
- PINA-PÉREZ, M.C. et al. *Helicobacter pylori* detection in shellfish: a real-time quantitative polymerase chain reaction approach. **Foodborne Pathogens and Disease**, Valencia, Espanha, v. 16, n. 2, p. 137-143, fev. 2019.
- POPOVA, A. et al. Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. **Immunobiology**, Mannheim, Alemanha, v. 216, n. 1, p. 164-72, fev. 2011.

- RAD, R. et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, Munique, Alemanha, v. 53, n. 8, p. 1082-9, ago. 2004.
- RAD, R. et al. Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, Munique, Alemanha, v. 136, n. 7, p. 2247-57, jun. 2009.
- READ, Simon; POWRIE, Fiona. CD4(+) regulatory T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, Oxford, Reino Unido, v. 13, n. 6, p. 644-649, 2001.
- RIBEIRO, R.B. et al. Evaluation of *Helicobacter pylori* colonization by serologic test (IgG) and dyspepsia in volunteers from the countryside of Monte Negro, in the Brazilian western Amazon region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, Brasil, v. 52, n. 4, p. 203-6, jul. 2010.
- ROBINSON, K. et al. *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. **Gut**, Nottingham, Reino Unido, v. 57, n. 10, p. 1375-85, mai. 2008.
- RODRIGUES, M.F. et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer precursor lesions: prevalence and associated factors in a reference laboratory in Southeastern Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, Minas Gerais, Brasil, v. 56, n. 4, p. 419-424, out. 2019.
- ROTHENBACHER, D.B. et al. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. **J Infect Dis.**, Ulm, Alemanha, v. 179, n. 2, p. 398-402, fev. 1999.
- RUDNICKA, K. et al. Immunophenotype of peripheral blood natural killer cells and IL-10 serum levels in relation to *Helicobacter pylori* status. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Immunologica Scandinavica**, Lodz, Polônia, v. 121, n. 9, p. 806-13, jun. 2013.
- SAES, M. et al. Interleukin 8 (-251 T>A) polymorphism in children and teenagers infected with *Helicobacter pylori*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, São Paulo, Brasil, v. 23, n. 23, p. 1-3, abr. 2017.
- SCHREIBER, S. et al. Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*. **Infection and Immunity**, Bochum, Alemanha, v. 73, n. 3, p. 1584-9, mar. 2005.
- SCHREIBER, S. et al. Gastric antibacterial efficiency is different for pepsin A and C. **Archives of Microbiology**, Bochum, Alemanha, v. 184, n. 5, p. 335-40, jan. 2006.
- SERELLI-LEE, V. et al. Persistent *Helicobacter pylori* specific Th17 responses in patients with past *H. pylori* infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1 β . **PloS One**, Singapore, República de Singapura, v. 7, n. 6, p. 1-11, jun. 2012.
- SERRA, M.A.A.O. et al. *Helicobacter pylori* cagA+ genotype is associated with consumption of untreated drinking water in North-Eastern Brazil. **Biol Res Nurs.**, PiauÍ, Brasil, v. 22, n. 4, p. 544-551, out. 2020.
- SIDEBOTHAM, R.L. et al. How *Helicobacter pylori* urease may affect external pH and influence growth and motility in the mucus environment: evidence from in-vitro studies. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, Londres, Reino Unido, v. 15, n. 4, p. 395-401, abr. 2003.

SILVA, L.L.L. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *dupA*, and *vacA* genotypes and their association with the severity of gastropathies in patients with dyspepsia. **Genetics and Molecular Research**, Goiás, Brasil, v.20, n. 3, p. 1-12, jul. 2021.

SILVA, R.G.S.C. et al. *Helicobacter pylori* infection is high in paediatric nonulcer dyspepsia but not associated with specific gastrointestinal symptoms. **Acta Paediatrica**, São Paulo, Brasil, v. 105, n. 5, p. 228-31, mai. 2016.

SIMAWARANON, T.; WATTANAWONGDON, W.; TONGTAWEE T. Toll-Like receptors are associated with *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosa pathology. **Jundishapur J Microbiol.**, Nakhon Ratchasima, Tailândia, v. 10, n. 12, p. 1-7, nov. 2017.

SMITH, S.I. et al. *Helicobacter pylori* infection in Africa: update of the current situation and challenges. **Dig Dis.**, Lagos, Nigéria, p. 1-10, ago. 2020.

SMITH, S.M. et al. Tribbles 3: a novel regulator of TLR2-mediated signaling in response to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, Dublin, Irlanda, v. 186, n. 4, p. 2462-71, fev. 2011.

STEAD, C.M. et al. Deciphering the unusual acylation pattern of *Helicobacter pylori* lipid A. **Journal of Bacteriology**, Georgia, USA, v. 190, n. 21, p. 7012-21, nov. 2008.

SULEIMAN, A.A.; SHABAN, S.A.; AL-CHALABI, R. Genetic polymorphism relationship of four SNP in beta defensins genes 1 and 2 with susceptibility and effect of triple therapy of *Helicobacter pylori* infection in Iraq. **Gene Reports**, Ramadi, Iraque, v. 25, p. 1-5, dez. 2021.

SUGANO, K. et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. **Gut**, Kyoto, Japão, v. 64, n. 9, p. 1353-1367, set. 2015.

SUZUKI, S. et al. The ideal *Helicobacter pylori* treatment for the present and the future. **Digestion**, Itabashi, Japão, p. 1-7, out. 2021.

TANIKAWA, C. et al. Genome-wide association study identifies gastric cancer susceptibility loci at 12q24.11-12 and 20q11.21. **Cancer Science**, Tóquio, Japão, v. 109, p. 4015-4024, 2018.

TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, Osaka, Japão, v. 16, n. 1, p. 3-9, fev. 2004.

TIMMANN, C. et al. Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. **Nature**, Hamburg, Alemanha, v. 489, n. 7416, p. 443-6, set. 2012.

TORRES, V.J. et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets. **Journal of Immunology**, Nashville, USA, v. 179, n. 8, p. 5433-40, out. 2007.

TRINDADE, L.M.D.F. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in samples of gastric biopsies. **Gastroenterology Research**, Aracaju, Sergipe, v. 10, n. 1, p. 33-41, fev. 2017.

TUMMURU, M.K.; COVER, T.L.; BLASER, M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. **Infect Immun.**, Nashville, Tennessee, v. 61, n. 5, p. 1799-809, mai. 1993.

VARGA, Matthew Gordon; PEEK, Richard. DNA transfer and Toll-like receptor modulation by *Helicobacter pylori*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Nashville, USA, v. 400, p. 169-193, 2017.

VAZIRI, F. et al. New insights of *Helicobacter pylori* host-pathogen interactions: The triangle of virulence factors, epigenetic modifications and non-coding RNAs. **World J. Clin. Cases**, Teerã, Irã, v. 6, n. 5, p.64-73, 2018.

VINAGRE, I.D.F. et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with different gastrointestinal diseases from Northern Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, Pará, Brasil, v. 52, n. 4, p. 266-71, dez. 2015.

VÖLZKE, H. et al. Cohort profile: the study of health in Pomerania. **Int J Epidemiol**, Greifswald, Alemanha, v. 40, n. 2, p. 294-307, abr. 2011.

VÖLZKE, Henry. Study of Health in Pomerania (SHIP): Concept, design and selected results. **Bundesgesundheitsbl**, Greifswald, Deutschland, v. 55, n. 6-7, p. 790-794, jun. 2012.

WARREN, John Robin; MARSHALL, Barry. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, Londres, Inglaterra, v. 1, n. 8336, p. 1273-5, jun. 1983.

WHITE, J.R.; WINTER, J.A.; ROBINSON, K. Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: etiology and clinical outcomes. **J Inflamm**, Nottingham, Reino Unido, v. 13, n. 8, p. 137-47, ago. 2015.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Helicobacter pylori in Developing Countries 2021**. Disponível em: <<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/helicobacter-pylori/helicobacter-pylori-english>>. Acesso em: 11 out. 2021.

WU, Y. et al. GWAS of peptic ulcer disease implicates *Helicobacter pylori* infection, other gastrointestinal disorders and depression. **Nature Communications**, Brisbane, Austrália, v. 12, n. 1, p. 1-17, fev. 2021.

YUN, C.H et al. Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. **Infection and Immunity**, Göteborg, Suécia, v. 73, n. 3, p. 1482-90, mar. 2005.

ZAMANI, M. et al. Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. **Caspian Journal of Internal Medicine**, Babol, Irã, v. 8, n. 3, p. 146-152, 2017.

ZHANG, L. et al. Reduced lysosomal clearance of autophagosomes promotes survival and colonization of *Helicobacter pylori*. **The Journal of Pathology**, Hong Kong, China v. 244, n. 4, 432-444, abr. 2018.

ZHUANG, Y. et al. A pro-inflammatory role for Th22 cells in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. **Gut**, Chongqing, China, v. 64, n. 9, p. 1368-78, set. 2015.

CAPÍTULO 1

Genome-wide association study for *Helicobacter pylori* infection in Latin America children

Genome-wide association study for *Helicobacter pylori* infection in Latin America children

Iasmin Souza Lima¹, Thiago Magalhães da Silva², Georg Homuth³, Camila A. Figueiredo⁴, Neuza Maria Alcantara-Neves⁴, Maurício Lima Barreto⁵, Cintia Rodrigues Marques¹.

¹ Multidisciplinary Institute in Health, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil.

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

³University Medicine Greifswald, Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, Department of Functional Genomics, Greifswald, Germany.

⁴ Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

⁵ Institute of Collective Health, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

Corresponding author: Cintia Rodrigues Marques cintiabiomedica@yahoo.com.br.

Graduate Program in Bioscience, Federal University of Bahia, Multidisciplinary Institute in Health/Anísio Teixeira Campus, Vitória da Conquista, Bahia.

Address: Rua Hormindo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58
Bairro Candeias, CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista – Bahia, Brazil.

Contact Phone +55 77 34292700.

Article to be submitted in the journal **Helicobacter**.

Abstract

Background and aim: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is bacterial agent with at least half of the world population infected by this pathogen and is responsible for several human gastric pathologies. Environmental and host factors are associated with *H. pylori* infection outcomes. Genome-wide association studies sought to elucidate the genetic bases of *H. pylori* infection. Few studies have been conducted for admixed populations from developing countries, which exhibit high prevalence of *H. pylori* infection. We performed a genome-wide association study to elucidate the genetic basis of *H. pylori* infection in a cohort children admixed from a large Latin American urban center. **Methods:** Cross-sectional study involving 1,161 children from 4 to 11 years old participating in the cohort Social Change, Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA-Salvador) project. DNA was extracted from peripheral blood samples using the commercial Qiagen Flexigene kit. Single nucleotide variants (SNVs) were genotyped using the commercial Illumina HumanOmni2.5-8 panel. Detection of *H. pylori* infection was previously performed using an enzyme-linked immunization assay (ELISA), following the manufacturer's instructions. Logistic regression analysis was used to examine the association with *H. pylori* infection, assuming an additive genetic model. **Results and conclusions:** We found 22 SNVs suggestively associated ($p < 10^{-5}$) with *H. pylori* infection and two of them highlighted in our findings. The most suggestive SNV was the T allele rs77955022 (OR = 2.27; CI (95%) = 1.65 - 3.13; $p = 4.83e-07$) and is located on chromosome 5 in an intronic region of the *EXOC3* gene (exocytic complex component 3). The second most suggestively associated SNV was the G allele rs10914996 (OR = 0.61; CI (95%) = 0.50 - 0.74; $p = 8.97e-07$), located in an intergenic region on the chromosome 1p35.1. Furthermore, we reproduced our results in the cohort Study of Health in Pomerania (SHIP) and 3 SNVs with $p < 0.05$ were replicated, namely A allele rs2339212 (OR = 1.14;

CI (95%) = 1.048 - 1.241; $p=0.0024$), A allele rs4795970 (OR = 0.879; CI (95%) = 0.808 - 0.957; $p = 0.0029$) and A allele rs6595814 (OR = 0.878; CI (95%) = 0.772 - 0.998; $p = 0.046$). We also replicated associations to *H. pylori* infection from SNVs at the toll-like receptor (TLR) locus 4p14, which were previously associated with *H. pylori* seroprevalence in a GWAS conducted for European populations. Our work, so far, is the only one that performed genome-wide analyses for *H. pylori* infection in a childhood for an admixed Latin American population. However, further studies must have been conducted to better understand the functional effects of these variants, as well as to replicate these findings in other populations.

Abbreviations:

H. pylori: *Helicobacter pylori*

GWAS: Genome-wide Association Study

SCAALA: Social Change, Asthma and Allergy in Latin America

SNV: Single Nucleotide Variant

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

P: P value

OR: Odds Ratio

CI: Confidence Interval

QQ-plot: Quantile-Quantile plot

EWAS: Whole Epigenome Association Study

Introduction

Helicobacter pylori is a spiral-shaped, gram-negative, microaerophilic bacillus that inhabits the human acidic gastric mucosa, causing several gastrointestinal diseases, such as gastritis, chronic gastritis¹, peptic ulcer² and gastric cancer³. At least half of the world's population is infected by this bacterium. The transmission still occurs during childhood with socioeconomic characteristics, housing conditions and health status as major risk factors for infection³. Developing countries have higher prevalence rates, with estimates of 70.1% for the African region, 69.4% for South American countries and 66.6% for West tern Asia. In Brazil, the estimated prevalence of *H. pylori* infection is 71.2%⁴.

The inflammation triggered by *H. pylori* alters the gastric mucosal microenvironment, influencing the host's immune response⁵. It is also known that host genetic factors can interfere with infection by the pathogen⁶. Several studies have shown that polymorphisms in host genes are associated with *H. pylori* infection, including the genes *IL-10*, *IL-1 β* , *IL-1R*, *TNF α* , and *TLR*⁷. These data demonstrate that the individual genotype may influence susceptibility to *H. pylori* infection. Studies aiming identify genetic factors associated with the acquisition of *H. pylori* in populations from developing countries, however, are still scarce. Furthermore, to our best knowledge, no GWAS conducted to date have investigated genetic variants of susceptibility to *H. pylori* infection in children. Thus, we conducted a genome-wide association study for *Helicobacter pylori* infection in children of a Brazilian urban population highly admixed and with a remarkable African ancestry.

Material and methods

1. Study population and biological samples collection

The study was conducted using the SCAALA cohort (Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America), which includes 1.161 children aged 4-11 living in outlying areas in Salvador's city, Bahia, Brazil. The collection of data and biological samples of the members of the cohort occurred in 2003 and 2005^{8,9}.

A standardized questionnaire was applied to those responsible for each child to collect socioeconomic data, housing and sanitary conditions, and individual information such as age and gender. Ethical approval for this study was obtained from the National Council of Ethics of Brazil, and written informed consent was obtained from the guardians of each child. Furthermore, the research was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

2. Serological detection of anti-*Helicobacter pylori* IgG

The presence of IgG antibodies in blood samples was determined by ELISA using a commercially available kit (Diamedix, Miami, FL, USA) following the directions provided by the supplier. The cut-off was determined by an index value obtained by the ratio of sample absorbance to the absorbance of a calibrator (a solution containing human serum or defibrinated plasma, with IgG antibodies weakly reactive with *H. pylori* and 0.1% sodium azide). A ratio >1.1 was considered positive. Borderline subjects were removed from the analysis¹⁰.

3. Genotyping and quality control

The DNA extraction methodology and genotyping were previously described⁹. In short, DNA was extracted from peripheral blood using a commercial kit (Gentra® Puregene® Blood Kit (Qiagen)). SNVs genotyped for the SCAALA population were performed using the commercial Illumina HumanOmni2.5-8 Kit BeadChip panel (www.illumina.com). Sixty-three individuals were excluded due to family relationships

and one individual due to the inconsistency of the registered sex and genetic sex. Quality control was performed by applying a genotyping call rate of 95% and p value for the lowest frequency allele (minor allele frequency - MAF) <1% ¹¹.

4. Statistical analysis

Logistic regression was performed in Plink 1.9 to examine the association with *Helicobacter pylori* infection, assuming an additive genetic model. Analyses were adjusted for the first three main components of genetic variance (PC1, PC2 and PC3), age and sex. Principal component analysis controls confounding, in addition to calculating the genomic inflation factor (λ), with the function of visualizing and avoiding inflated test statistics in the results.

An association was considered suggestive when $5.0 \times 10^{-8} < p \text{ value} < 10^{-5}$ and truly associated when the p value $< 5.0 \times 10^{-8}$ ¹¹. For imputation, we used the IMPUTED¹² and African populations (hg19/1000 genomes Nov. 2014 AFR) as references^{12, 13}.

Results

The general characteristics of the study population are described in Table 1. The majority of the sample was male (53,49%), with a mean age of 6.3 years (SD = 1.67). The prevalence of seropositivity for *H. pylori* was 27,74%.

Table 1. Study population characteristics and serology status for *Helicobacter pylori*.

Subjects group (1161)			
Variables	N (%)	Cases=322 (27,74%)	Controls=839 (72,26%)
Gender			
Female	540 (46,51%)	140 (43,48%)	400 (47,67%)
Male	621 (53,49%)	182 (56,52%)	439 (52,33%)
Age			
<6	444 (38,24%)	113 (35,09%)	331 (39,45%)
>6	717 (61,76%)	209 (64,91%)	508 (60,55%)

The quantile-quantile plot (QQ plot) comparing the observed and expected P values and the value of the genomic inflation factor (λ), which was 1.01, indicated little chance of the results being influenced by population stratification (Figure 1).

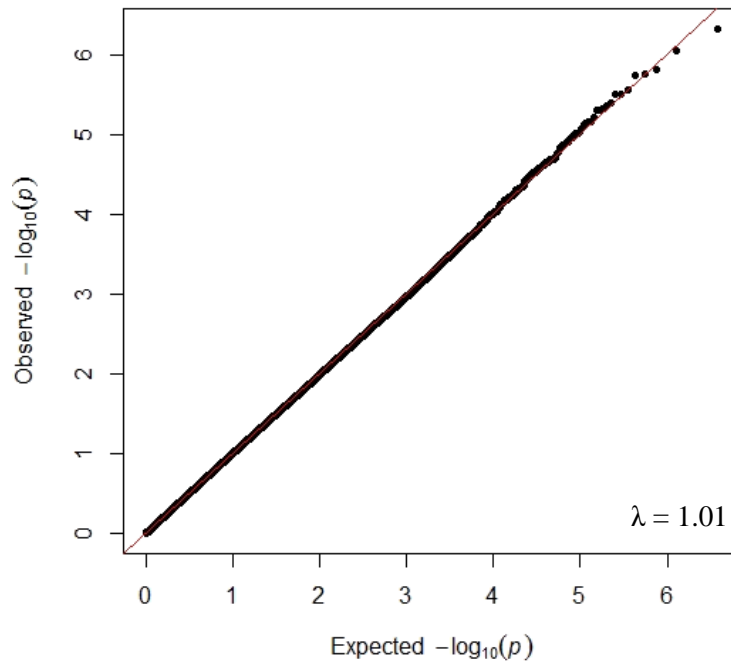


Fig. 1: QQ-plot for childhood *Helicobacter pylori* infection, adjusted for population structure.

We found 22 SNVs suggestively associated with *Helicobacter pylori* infection (Table 2). Of this total, 2 polymorphisms stood out in our study. The first suggestive SNV was rs77955022-T allele (OR = 2.27; CI 95% = 1.65 - 3.13; p= 4.83e-07), which is located on chromosome 5 in an intronic region of the *EXOC3* gene (exocystic complex component 3) (Figure 3A). The second most significantly associated SNV was rs10914996-G allele (OR = 0.61; 95% CI = 0.50 – 0.74; p=8.97e-07), which is located in an intergenic region on the chromosome 1p35.1 (Figure 2).

Table 2: The 22 SNVs that are most associated with childhood *Helicobacter pylori* infection, corrected by the first three principal components for ancestry.

SNV	Chr	Gene	Annotation	Minor Allele	MAF†	OR‡	CI (95%)§	P*
rs77955022	5	<i>EXOC3</i>	Intron Variant	T	0.08	2.27	1.65 - 3.13	4.83e-07
rs10914996	1	<i>LOC105378641</i>	Intron Variant	G	0.41	0.61	0.50 - 0.74	8.97e-07
rs7548924	1	<i>LOC105378641</i>	Intron Variant	T	0.31	0.59	0.47 - 0.73	1.56e-06
rs9295348	6	<i>RPS6KA2</i>	Intron Variant	C	0.33	1.61	1.32 - 1.95	1.75e-06
rs7105675	11	<i>OPCML</i>	Genic upstream transcript variant	T	0.35	1.62	1.33 - 1.98	1.85e-06
rs12149021	16	<i>CDH13</i>	Genic upstream transcript variant	T	0.21	1.70	1.36 - 2.12	2.78e-06
rs75137136	11	NC_000011.10:38070995:G:A		A	0.02	4.20	2.30 - 7.69	3.18e-06
rs12050717	15	NC_000015.10:52306333:C:T		T	0.11	0.44	0.31 - 0.62	3.20e-06
rs693227	1	<i>LOC105378641</i>	Intron Variant	A	0.44	0.63	0.52 - 0.77	4.02e-06
rs8055256	16	<i>CDH13</i>	Genic upstream transcript variant	G	0.21	1.70	1.36 - 2.13	4.32e-06
rs6595814	5	<i>FBN2</i>	Intron Variant	G	0.38	1.58	1.30 - 1.92	4.83e-06
rs17176567	16	<i>CDH13</i>	Genic upstream transcript variant	C	0.21	1.68	1.35 - 2.10	4.92e-06
rs2339212	17	NC_000017.11:34690767:A:T		T	0.5	1.55	1.28 - 1.87	4.99e-06
rs4795970	17	NC_000017.11:34687007:A:G		A	0.49	0.65	0.54 - 0.78	6.13e-06
rs10208804	2	NC_000002.12:11873559:G:T		T	0.12	1.89	1.43 - 2.50	7.07e-06
rs2812531	10	NC_000010.11:69692115:C:T		T	0.24	0.57	0.45 - 0.73	7.09e-06
rs1872753	10	<i>LOC105376360</i>	Intron Variant	G	0.31	0.62	0.51 - 0.77	7.18e-06
rs7098808	10	NC_000010.11:14505529:C:T		T	0.08	2.02	1.48 - 2.75	7.59e-06
rs9515577	13	<i>LOC107984621</i>	Intron Variant	T	0.07	2.11	1.51 - 2.94	8.65e-06
rs455980	21	NC_000021.9:15720180:T:C		T	0.07	2.14	1.53 - 2.99	9.35e-06
rs2371541	7	<i>PCLO</i>	Intron Variant	G	0.44	1.54	1.27 - 1.86	9.64e-06
rs11631806	4	NC_000004.12:115599496:C:T		T	0.03	3.2	1.91 - 5.36	9.77e-06

† MAF: Minor Allele frequency; ‡ OR: Odds Ratio; § CI: Confidence Interval; * P: P value.

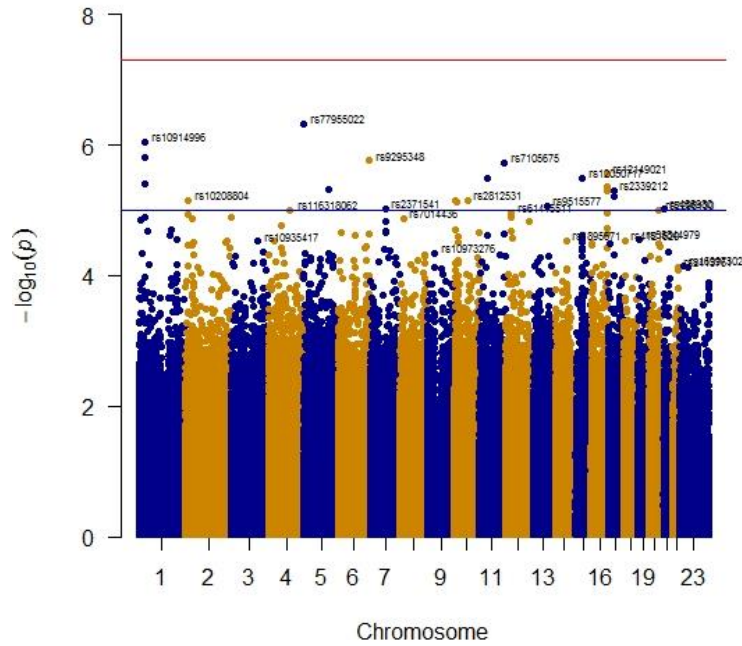


Fig. 2. Manhattan plot for *Helicobacter pylori* infection in children, adjusted for population structure.

After imputation to chromosome 5 (Figure 3B) and chromosome 1 (Figure 4B), it was observed that the SNVs most suggestively associated in the genomic scan analysis remained the same when compared to the microarray result (Figure 3A and 4A).

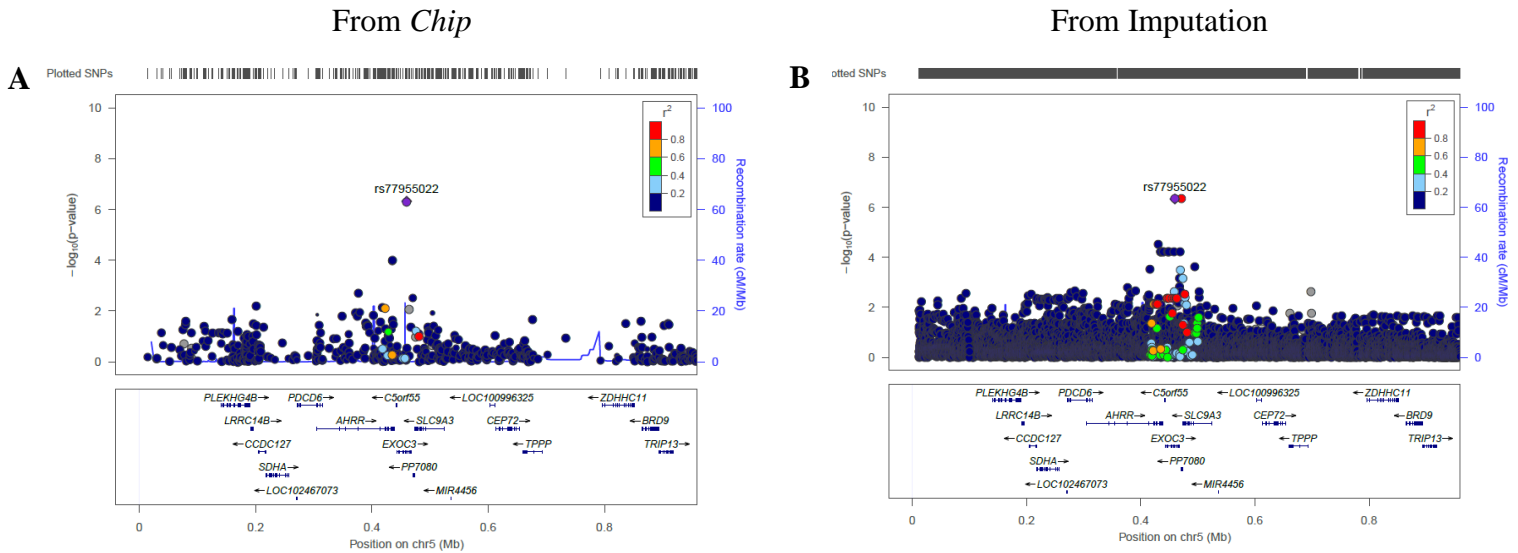


Fig. 3: Regional plot of chromosome 5, which is the region most associated with childhood *Helicobacter pylori* infection. **A.** Genotyping result using DNA *Chip*. **B.** Result of imputation analysis.

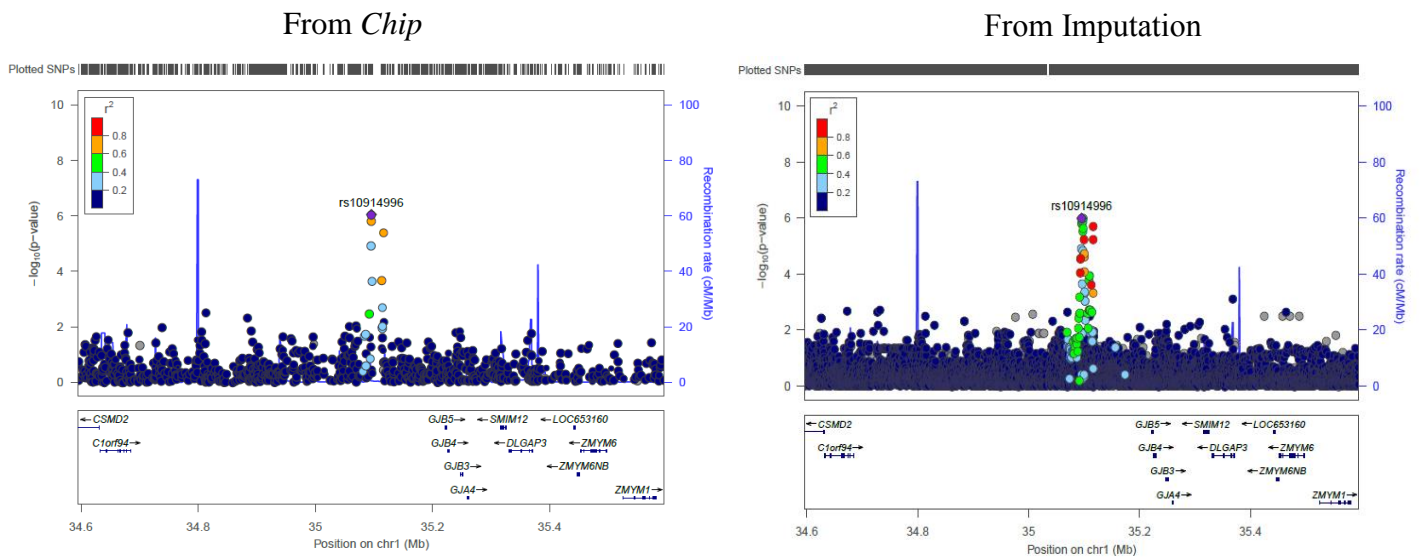


Fig. 4: Regional plot of chromosome 1, the second region most associated with childhood *Helicobacter pylori* infection. **A.** Genotyping result using DNA *Chip*. **B.** Result of imputation analysis.

Table 3 presents the results after we reproduced our results in the Study of Health in Pomerania (SHIP) cohort. Three SNVs with $p < 0.05$ were replicated: rs2339212 (OR =

1.14; CI (95%) = 1.048 - 1.241; p = 0.0024), rs4795970 (OR = 0.879; CI (95%) = 0.808 - 0.957; p = 0.0029) and rs6595814 (OR = 0.878; CI (95%) = 0.772 - 0.998; p = 0.046).

Table 3: Replication results in the SHIP (Study of Health in Pomerania) cohort.

SNV	Chr	Gene	Annotation	Minor Allele	MAF	OR	CI (95%)	P
rs2339212	17	NC_000017.11:34690767:A:T		A	0,4022	1,14	1,048 - 1,241	0,0024
rs4795970	17	NC_000017.11:34687007:A:G		A	0,4017	0,879	0,808 - 0,957	0,0029
rs6595814	5	<i>FBN2</i>	Intron Variant	A	0,1285	0,878	0,772 - 0,998	0,046
rs8055256	16	<i>CDH13</i>	Genic upstream transcript variant	A	0,1846	0,927	0,832 - 1,032	0,1676
rs2812531	10	NC_000010.11:69692115:C:T		T	0,4426	0,945	0,867 - 1,029	0,1939
rs9295348	6	<i>RPS6KA2</i>	Intron Variant	A	0,3042	0,961	0,878 - 1,052	0,3902
rs12050717	15	NC_000015.10:52306333:C:T		T	0,034	1,102	0,869 - 1,396	0,4229
rs1872753	10	<i>LOC105376360</i>	Intron Variant	A	0,1516	0,957	0,852 - 1,075	0,4564
rs77955022	5	<i>EXOC3</i>	Intron Variant	T	0,2054	1,04	0,937 - 1,155	0,4584
rs12149021	16	<i>CDH13</i>	Genic upstream transcript variant	T	0,272	1,035	0,942 - 1,137	0,4729
rs10914996	1	<i>LOC105378641</i>	Intron Variant	A	0,4105	0,969	0,887 - 1,058	0,4797
rs17176567	16	<i>CDH13</i>	Genic upstream transcript variant	T	0,2724	0,968	0,882 - 1,064	0,5023
rs7098808	10	NC_000010.11:14505529:C:T		T	0,0573	1,063	0,886 - 1,276	0,508
rs455980	21	NC_000021.9:15720180:T:C		T	0,0828	1,047	0,897 - 1,221	0,5621
rs9515577	13	<i>LOC107984621</i>	Intron Variant	T	0,0565	0,95	0,793 - 1,138	0,5794
rs7548924	1	<i>LOC105378641</i>	Intron Variant	T	0,2306	0,973	0,88 - 1,007	0,6008
rs2371541	7	<i>PCLO</i>	Intron Variant	T	0,3817	1,007	0,922 - 1,099	0,8834
rs7105675	11	<i>OPCML</i>	Genic upstream transcript variant	T	0,3356	1,006	0,918 - 1,103	0,8927
rs10208804	2	NC_000002.12:11873559:G:T		T	0,1415	0,994	0,879 - 1,123	0,9179
rs693227	1	<i>LOC105378641</i>	Intron Variant	A	0,4572	0,998	0,916 - 1,087	0,9626

Discussion

In this work, a genome-wide association study for *Helicobacter pylori* infection was conducted using a cohort of children living in the outskirts of Salvador's city, Bahia, Brazil. There are still few GWAS studies in pediatric samples. To date, it' is the first GWAS for the outcome of *H. pylori* infection performed in a population of Brazilian children.

In this study, the SNV rs77955022 was suggestively associated with *H. pylori* infection. The rs77955022, is located in an intronic region of the *EXOC3* (exocyst complex component 3) gene¹⁴. *EXOC3* is part of a highly conserved exocystic complex that comprises eight protein subunits of *EXOC1-EXOC8*¹⁵. The exocystic complex plays the

role of directing secretory vesicles towards the plasma membrane in the cell exocytosis process¹⁶.

In addition to being linked to exocytosis, the exocystic complex is involved in several cellular mechanisms, such as neurotransmission, neural cell growth and differentiation, ciliogenesis in kidney cells, cell division, apoptosis, cell-cell communication, phagocytosis in brain cells and epithelial cell polarity^{16,17}, and molecules, such as E-cadherin binding in fibroblasts¹⁸ and SNARE binding in neuron^{19,20}.

The *EXOC3* gene was reported in a study of GWAS associated with severity in cystic fibrosis lung disease²¹, in EWAS (Whole Epigenome Association Study) associated with decreased gas exchange in the lungs²² and as a predictor of age in semen samples in forensic analysis²³ already in candidate gene studies as a prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma²⁴ and in lung cancer tumorigenesis and classification²⁵. However, there are no reports of an association of the *EXOC3* gene with *Helicobacter pylori* infection.

The *EXOC3* gene or its protein were studied with infectious diseases²⁶. In this study 2018 that evaluated the exocyst components - including EXOC3 - in *Legionella pneumophila* infection, the authors identify which exocyst subunits are crucial for the success of infection by the bacterium since *Legionella* uses the exocystic complex to facilitate remodeling of the membranes and fusion with the vesicles of the host cell. In another study with bladder epithelial infection caused by *Escherichia coli*, EXOC3 recruited and interacted with the proteins RAB11a and RAB27b (involved in membrane trafficking), thus helping to expel the pathogen²⁷.

In an evaluation of gingival epithelial tissue infected with *Porphyromonas gingivalis*, they were shown that EXOC3 is present in the early endosomes controlling

the transport of pathogen. This interaction can interfere with the recycling pathways that these bacteria use to leave the infected cell and spread to neighboring cells²⁸. In other study, a proteomic analysis study in cells that expressed the Nef HIV-1 protein, researchers observed that components of the exocystic complex, including EXOC3, were associated with Nef. This interaction may imply the induction of nanotube formation by Nef and consequently interfere with the pathogenesis and progression of AIDS²⁹.

Components of the exocystic complex are regulated by a superfamily of proteins called small GTPases (small guanosine triphosphatases), which include members of the Ras, Rho, Rab, and Arf subfamilies. These proteins are commonly found in eukaryotic cells and are involved in several cellular mechanisms^{16, 30, 31}.

Some studies have shown that virulence factors of *H. pylori* interact with GTPases³². The cytotoxin-associated gene A (CagA) and vacuolating cytotoxin (VacA) virulence factors present in *H. pylori* strains modify host cells to adhere and establish themselves in the gastric environment⁵.

In a study of gastric cells, VacA interacts with GTPases to induce cell vacuolization^{33,34}. CagA was associated with GTPase-dependent scattering and elongation of gastric epithelial cells^{35, 36} and with reduced expression of Rab11a, a GTPase that is involved in trafficking in the apical region of polarized cells³⁷.

The studies mentioned demonstrate the relevance between the exocystic subunit EXOC3 and the proteins involved in the regulation of the components of the exocystic complex in different infection mechanisms. Thus, we can suggest that the same mechanisms or similar interactions in the human gastric mucosa may be involved in the colonization, survival and persistence of *Helicobacter pylori*.

The second suggestively associated variant found in this work, rs10914996, is located in intron in the 1p35.1 region³⁸. In GWAS, this locus has been associated with circulating melanoma tumor cells³⁹ and Crohn's disease in Ashkenazi Jews⁴⁰. In candidate gene studies, this region has been linked to schizophrenia⁴¹ and breast cancer⁴². Cytogenetic analysis has shown that the loss of this locus is involved in colorectal cancer^{43,44}. There are still no studies in the literature relating the 1p35.1 locus to *H. pylori* or other infectious pathologies. More studies must be conducted to better understand this region.

Assessing the other twenty suggestively associated variants in our work, we did not find information on these polymorphisms related to any clinical outcome. However, these genes or other variants present in them have been associated with pathologies of the digestive system.

In a GWAS, the rs1819333 (P=6.14x10⁻⁹, OR= 1.08) in the *RPS6KA2* gene (ribosomal protein S6 kinase A2) was associated with inflammatory bowel disease⁴⁵. In another analysis on the same gene, it was possible to detect that the three variants (rs16898963, rs2072638, and rs9459678) increased the risk of colon cancer, while seven SNVs with protective (rs6911624, rs10946164, rs2345067) and risk (rs9295361, rs9347128, rs234502638, rs rs7745781) effects were associated with rectal cancer⁴⁶.

In another work with colorectal cancer cell lines, it was reported that allelic variations in SNV rs12444338 altered the regulation of transcription of the *CDH13* gene (cadherin 13), revealing that the G allele rs12444338 had greater transcriptional activity than the T allele. This suggests that this marker may be implicated in the risk of developing colorectal cancer⁴⁷.

Expression studies have identified downregulation of the *OPCML* gene (opioid binding protein/cell adhesion molecule-like gene) in cell lines⁴⁸ and gastric cancer samples⁴⁹ compared to the negative control. For *FBN2* (fibrillin 2), alterations in the expression of this gene were verified in samples of primary colorectal cancer and in metastasis⁵⁰, esophageal cancer⁵¹ and ulcerative colitis⁵². These findings suggest a contribution of this gene in gastrointestinal diseases with different severities.

Recent work has shown that macro- and micromutations in the *PCLO* gene are involved in colorectal cancer⁵³, colon cancer⁵⁴, and esophageal squamous cell carcinoma⁵⁵. These studies highlight the importance of these genes in the involvement of gastrointestinal pathologies at different stages of disease development. Therefore, more studies should be conducted to elucidate the genetic mechanisms involved in these diseases and with *H. pylori* infection.

Genomic scanning studies with *Helicobacter pylori* relate gastrointestinal diseases induced by bacteria^{56,57,58} and assess the risk of infection by this pathogen^{59,60,61}. However, the populations analyzed in these works are adult and genetically homogeneous individuals.

The GWAS developed in 2013⁶¹ in a European population found two loci significantly associated with *H. pylori* infection, namely, 4p14 (*TLR10*; rs10004195) and 1q23.3 (*FCGR2A*; rs368433). In our analysis, we did not find these associations or SNVs suggestively associated close to these loci.

However, we observed the presence of 23 variants at the 4p14 locus that were significantly associated in the 2013 study in our database. Although no variants achieved genome-wide significance, seven SNVs at the toll-like receptor (TLR) locus 4p14 were replicated with $p < 0.05$ and same direction of association in our population. The fact that

these polymorphisms are common in the European population⁵⁷ shall explain why we did not find suggestive variants on chromosome 4 in our population that has a high rate of African ancestry^{12,13}.

However, these seven variants from our study found at the *TLR* locus may suggest a likely effect on the risk of infection or level of humoral response to *H. pylori* in populations with different ancestry profiles and sociodemographic composition. Therefore, those children who were positive in the ELISA suggest that they are able to mount a more vigorous antibody response against *H. pylori* infection, which would be, in a way, in agreement with the findings of the survey carried out in 2013 with a European population.

We reproduced the 22 suggestively associated variants in our population in the SHIP (Study of Health in Pomerania) cohort. Although we were unable to replicate our two most suggestively associated variants found in the SCAALA population, we did find the SNVs rs2339212, rs4795970 and rs6595814 that had a p value < 0.05.

We also observed that the lowest frequency allele was the A allele in the three replicated SNVs presenting MAF values of 40.22%, 40.17% and 12.85%, respectively. These results can be explained by the common frequency of this allele in European populations, according to the 1000Genomas project (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)⁶².

Conclusion

To our knowledge, we conducted the first GWAS for *Helicobacter pylori* infection in a cohort of Latin American children. In this study we found genetic variants suggestively associated with *H. pylori* have not been previously described in the literature, that have been replicated in a European population. Thus, these results should

be reproduced in similar populations in terms of genetics and age, in addition to functional studies to understand the impact of these variants on *Helicobacter pylori* infection.

References

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-5.
2. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-5.
3. International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994;61:1-241.
4. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2017;153(2):420-429.
5. Nejati S, Karkhah A, Darvish H, Validi M, Ebrahimpour S, Nouri HR. Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. *Microb Pathog* 2018;117:43-48.
6. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med* 1994;120:982-6.
7. Figueiredo CA, Marques CR, Costa Rdos S, da Silva HB, Alcantara-Neves NM. Cytokines, cytokine gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: friend or foe? *World J Gastroenterol* 2014;20:5235-43.

8. Barreto ML, Cunha SS, Alcântara-Neves N, Carvalho LP, Cruz AA, Stein RT, Genser B, Cooper PJ, Rodrigues LC. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). *BMC Pulm Med* 2006;6:15.
9. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, Magalhães WC, Horimoto AR, Horta BL, Moreira RG, Leal TP, Scliar MO, Soares-Souza GB et al. Brazilian EPIGEN Project Consortium. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:8696-701.
10. Dattoli VC, Veiga RV, da Cunha SS, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML, Alcântara-Neves NM. Seroprevalence and potential risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children. *Helicobacter* 2010;15:273-8.
11. Reed E, Nunez S, Kulp D, Qian J, Reilly MP, Foulkes AS. A guide to genome-wide association analysis and post-analytic interrogation. *Stat Med* 2015;34:3769-92.
12. da Silva TM, Fiaccone RL, Kehdy FSG, Tarazona-Santos E, Rodrigues LC, Costa GNO, Figueiredo CA, Dos Santos DN, Feitosa CA, Fattore GL, Santos LM, Alcântara-Neves NM, Cruz AA, Barreto ML. African biogeographical ancestry, atopic and non-atopic asthma and atopy: A study in Latin American children. *Pediatr Pulmonol* 2019;54:125-132.
13. de Sena-Reis JS, Bezerra DD, Figueiredo CA, Barreto ML, Alcântara-Neves NM, da Silva TM. Relationship between African biogeographical ancestry and *Helicobacter pylori* infection in children of a large Latin American urban center. *Helicobacter*. 2019;24:e12662.

14. National Center for Biotechnology Information. dbSNP 2021. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs77955022?horizontal_tab=true. Accessed October 11, 2021.
15. Mei K, Li Y, Wang S, Shao G, Wang J, Ding Y, Luo G, Yue P, Liu JJ, Wang X, Dong MQ, Wang HW, Guo W. Cryo-EM structure of the exocyst complex. *Nat Struct Mol Biol* 2018;25:139-146. Erratum in: *Nat Struct Mol Biol* 2018;25:1137.
16. Nishida-Fukuda H. The exocyst: dynamic machine or static tethering complex? *Bioessays* 2019;41:e1900056.
17. Tanaka T, Goto K, Iino M. Diverse functions and signal transduction of the exocyst complex in tumor cells. *J Cell Physiol* 2017;232:939-957.
18. Guo Z, Neilson LJ, Zhong H, Murray PS, Zanivan S, Zaidel-Bar R. E-cadherin interactome complexity and robustness resolved by quantitative proteomics. *Sci Signal* 2014;7:354.
19. Adnan M, Islam W, Zhang J, Zheng W, Lu GD. Diverse role of SNARE protein Sec22 in vesicle trafficking, membrane fusion, and autophagy. *Cells* 2019;8:337.
20. Hong WJ, Lev S. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends in Cell Biology* 2014;24:35-43.
21. Dang H, Polineni D, Pace RG, Stonebraker JR, Corvol H, Cutting GR, Drumm ML, Strug LJ, O'Neal WK, Knowles MR. Mining GWAS and eQTL data for CF lung disease modifiers by gene expression imputation. *PLoS One* 2020;15:e0239189
22. Terzikhan N, Xu H, Edris A, Bracke KR, Verhamme FM, Stricker BHC, Dupuis J, Lahousse L, O'Connor GT, Brusselle GG. Epigenome-wide association study on diffusing capacity of the lung. *ERJ Open Res* 2021;7:00567-2020.

23. Pisarek A, Pośpiech E, Heidegger A, Xavier C, Papież A, Piniewska-Róg D, Kalamara V, Potabattula R, Bochenek M, Sikora-Polaczek M, Macur A, Woźniak A, Janeczko J, Phillips C, Haaf T, Polańska J, Parson W, Kayser M, Branicki W. Epigenetic age prediction in semen - marker selection and model development. *Aging (Albany NY)* 2021;13:19145-19164.
24. Magouliotis DE, Tasiopoulou VS, Dimas K, Sakellaridis N, Svokos KA, Svokos AA, Zacharoulis D. T. Transcriptomic analysis of the Aquaporin (AQP) gene family interactome identifies a molecular panel of four prognostic markers in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* 2019;19:436-442.
25. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;182:1-11.
26. Arasaki K, Kimura H, Tagaya M, Roy CR. *Legionella* remodels the plasma membrane-derived vacuole by utilizing exocyst components as tethers. *J Cell Biol* 2018;217:3863-3872.
27. Miao Y, Bist P, Wu J, Zhao Q, Li QJ, Wan Y, Abraham SN. Collaboration between distinct Rab small GTPase trafficking circuits mediates bacterial clearance from the bladder epithelium. *Cell Host Microbe* 2017;22:330-342.
28. Takeuchi H, Takada A, Kuboniwa M, Amano A. Intracellular periodontal pathogen exploits recycling pathway to exit from infected cells. *Cell Microbiol* 2016;18:928-48.
29. Mukerji J, Olivieri KC, Misra V, Agopian KA, Gabuzda D. Proteomic analysis of HIV-1 Nef cellular binding partners reveals a role for exocyst complex proteins in mediating enhancement of intercellular nanotube formation. *Retrovirology* 2012;9:33.

30. Song S, Cong W, Zhou S, Shi Y, Dai W, Zhang H, Wang X, He B, Zhang Q. Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian J Pharm Sci* 2019;14:30-39.
31. Lipschutz JH. The role of the exocyst in renal ciliogenesis, cystogenesis, tubulogenesis, and development. *Kidney Res Clin Pract* 2019;38:260-266.
32. Stein MP, Müller MP, Wandinger-Ness A. Bacterial pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic* 2012;13:1565-88.
33. Terebiznik MR, Vazquez CL, Torbicki K, Banks D, Wang T, Hong W, Blanke SR, Colombo MI, Jones NL. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2006;74:6599-614.
34. Hotchin NA, Cover TL, Akhtar N. Cell vacuolation induced by the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori* is regulated by the Rac1 GTPase. *J Biol Chem* 2000;275:14009-12.
35. Tegtmeyer N, Harrer A, Rottner K, Backert S. *Helicobacter pylori* CagA induces cortactin Y-470 phosphorylation-dependent gastric epithelial cell scattering via Abl, Vav2 and Rac1 activation. *Cancers (Basel)* 2021;13:4241.
36. Brandt S, Shafikhani S, Balachandran P, Jin S, Hartig R, König W, Engel J, Backert S. Use of a novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII phosphorylation in *Helicobacter pylori*-induced host cell actin cytoskeletal rearrangements. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50:190-205.
37. Zeaiter Z, Huynh HQ, Kanyo R, Stein M. CagA of *Helicobacter pylori* alters the expression and cellular distribution of host proteins involved in cell signaling. *FEMS Microbiol Lett* 2008;288:227-34.

38. National Center for Biotechnology Information. Gene 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/gene/?id=4524>. Accessed October 11, 2021.
39. Chiu CG, Nakamura Y, Chong KK, Huang SK, Kawas NP, Triche T, Elashoff D, Kiyohara E, Irie RF, Morton DL, Hoon DS. Genome-wide characterization of circulating tumor cells identifies novel prognostic genomic alterations in systemic melanoma metastasis. *Clin Chem* 2014;60:873-85.
40. Shugart YY, Silverberg MS, Duerr RH, Taylor KD, Wang MH, Zarfes K, Schumm LP, Bromfield G, Steinhart AH, Griffiths AM, Kane SV, Barmada MM, Rotter JI, Mei L, Bernstein CN, Bayless TM, Langelier D, Cohen A, Bitton A, Rioux JD, Cho JH, Brant SR. An SNP linkage scan identifies significant Crohn's disease loci on chromosomes 13q13.3 and, in Jewish families, on 1p35.2 and 3q29. *Genes Immun* 2008;9:161-7
41. Håvik B, Le Hellard S, Rietschel M, Lybæk H, Djurovic S, Mattheisen M, Mühleisen TW, Degenhardt F, Priebe L, Maier W, Breuer R, Schulze TG, Agartz I, Melle I, Hansen T, Bramham CR, Nöthen MM, Stevens B, Werge T, Andreassen OA, Cichon S, Steen VM. The complement control-related genes CSMD1 and CSMD2 associate to schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2011;70:35-42.
42. Lott ST, Chen N, Chandler DS, Yang Q, Wang L, Rodriguez M, Xie H, Balasenthil S, Buchholz TA, Sahin AA, Chaung K, Zhang B, Olufemi SE, Chen J, Adams H, Band V, El-Naggari AK, Frazier ML, Keyomarsi K, Hunt KK, Sen S, Haffty B, Hewitt SM, Krahe R, Killary AM. DEAR1 is a dominant regulator of acinar morphogenesis and an independent predictor of local recurrence-free survival in early-onset breast cancer. *PLoS Med* 2009;6:e1000068.

43. Thorstensen L, Qvist H, Heim S, Liefers GJ, Nesland JM, Giercksky KE, Lothe RA. Evaluation of 1p losses in primary carcinomas, local recurrences and peripheral metastases from colorectal cancer patients. *Neoplasia* 2000;2:514-22.
44. Matsuzaki M, Nagase S, Abe T, Miura K, Shiiba K, Sunamura M, Horii A. Detailed deletion mapping on chromosome 1p32-p36 in human colorectal cancer: identification of three distinct regions of common allelic loss. *Int J Oncol* 1998;13:1229-33.
45. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119-24.
46. Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Wolff RK. Genetic variation in *RPS6KA1*, *RPS6KA2*, *RPS6KB1*, *RPS6KB2*, and *PDK1* and risk of colon or rectal cancer. *Mutat Res* 2011;706:13-20.
47. Kim I, Park J, Kim JK, Kim BK, Lee H, Choi K, Yoon JB, Yoon SK. A nucleotide variant in promoter of the human *CDH13* gene which affects its transcription activity is associated with colorectal cancer. *Genes Genom* 2014;36:267-274.
48. Zhang N, Xu J, Wang Y, Heng X, Yang L, Xing X. Loss of opioid binding protein/cell adhesion molecule-like gene expression in gastric cancer. *Oncol Lett* 2018;15:9973-9977.
49. Xing X, Cai W, Ma S, Wang Y, Shi H, Li M, Jiao J, Yang Y, Liu L, Zhang X, Chen M. Down-regulated expression of *OPCML* predicts an unfavorable prognosis and promotes disease progression in human gastric cancer. *BMC Cancer* 2017;17:268.
50. Kamal Y, Schmit SL, Hoehn HJ, Amos CI, Frost HR. Transcriptomic differences between primary colorectal adenocarcinomas and distant metastases reveal metastatic colorectal cancer subtypes. *Cancer Res* 2019;79:4227-4241.

51. Singh V, Singh LC, Vasudevan M, Chattopadhyay I, Borthakar BB, Rai AK, Phukan RK, Sharma J, Mahanta J, Kataki AC, Kapur S, Saxena S. Esophageal cancer epigenomics and integrative analysis of genome-wide methylation and expression in high risk northeast indian population. *OMICS* 2015;19:688-99.
52. Kim TO, Park J, Kang MJ, Lee SH, Jee SR, Ryu DY, Yang K, Yi JM. DNA hypermethylation of a selective gene panel as a risk marker for colon cancer in patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med* 2013;31:1255-61.
53. Li C, Xu J, Wang X, Zhang C, Yu Z, Liu J, Tai Z, Luo Z, Yi X, Zhong Z. Whole exome and transcriptome sequencing reveal clonal evolution and exhibit immune-related features in metastatic colorectal tumors. *Cell Death Discov* 2021;7:222.
54. Yi T, Zhang Y, Ng DM, Xi Y, Ye M, Cen L, Li J, Fan X, Li Y, Hu S, Rong H, Xie Y, Zhao G, Chen L, Chen C, Ni S, Mi J, Dai X, Liao Q. Regulatory network analysis of mutated genes based on multi-omics data reveals the exclusive features in tumor immune microenvironment between left-sided and right-sided colon cancer. *Front Oncol* 2021;11:685515.
55. Zhang W, Hong R, Xue L, Ou Y, Liu X, Zhao Z, Xiao W, Dong D, Dong L, Fu M, Ma L, Lu N, Chen H, Song Y, Zhan Q. Piccolo mediates EGFR signaling and acts as a prognostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2017;36:3890-3902.
56. Wu Y, Murray GK, Byrne EM, Sidorenko J, Visscher PM, Wray NR. GWAS of peptic ulcer disease implicates *Helicobacter pylori* infection, other gastrointestinal disorders and depression. *Nat Commun* 2021;12:1146.
57. Tanikawa C, Kamatani Y, Toyoshima O, Sakamoto H, Ito H, Takahashi A, Momozawa Y, Hirata M, Fuse N, Takai-Igarashi T, Shimizu A, Sasaki M, Yamaji T,

Sawada N, Iwasaki M, Tsugane S, Naito M, Hishida A et al. Genome-wide association study identifies gastric cancer susceptibility loci at 12q24.11-12 and 20q11.21. *Cancer Sci* 2018;109:4015-4024.

58. Tanikawa C, Urabe Y, Matsuo K, Kubo M, Takahashi A, Ito H, Tajima K, Kamatani N, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study identifies two susceptibility loci for duodenal ulcer in the Japanese population. *Nat Genet* 2012;44:430-4, S1-2.

59. Hu D, Lu Y, Wang D, Nie C, Li Y. Glycosaminoglycan biosynthesis pathway in host genome is associated with *Helicobacter pylori* infection. *Sci Rep* 2021;11:18235.

60. Hishida A, Ugai T, Fujii R, Nakatochi M, Wu MC, Ito H, Oze I, Tajika M, Niwa Y, Nishiyama T, Nakagawa-Senda H, Suzuki S, Koyama T, Matsui D, Watanabe Y, Kawaguchi T, Matsuda F, Momozawa Y, Kubo M, Naito M, Matsuo K, Wakai K. GWAS analysis reveals a significant contribution of PSCA to the risk of *Helicobacter pylori*-induced gastric atrophy. *Carcinogenesis* 2019;40:661-668.

61. Mayerle J, den Hoed CM, Schurmann C, Stolk L, Homuth G, Peters MJ, Capelle LG, Zimmermann K, Rivadeneira F, Gruska S, Völzke H, de Vries AC, Völker U, Teumer A, van Meurs JB, Steinmetz I, Nauck M, Ernst F, Weiss FU, Hofman A, Zenker M, Kroemer HK, Prokisch H, Uitterlinden AG, Lerch MM, Kuipers EJ. Identification of genetic loci associated with *Helicobacter pylori* serologic status. *JAMA* 8;309:1912-20. Erratum in: *JAMA* 2013;310:99. Kuipers, Ernst [corrected to Kuipers, Ernst J].

62. National Center for Biotechnology Information. dbSNP 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Accessed January 11, 2022.

Support: The EPIGEN Consortium (MCT/DECIT) supported this work. The EPIGEN Brazil initiative is financed by the Ministry of Health of Brazil (Department of Science and Technology of the Secretariat of Science, Technology and Strategic Inputs) through the Financier of Studies and Projects. This research was also supported by the Foundation for Research Support of the State of Bahia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é um dos primeiros estudos de varredura genômica para infecção por *Helicobacter pylori* realizado em uma coorte de crianças latino-americanas. Observamos em nosso estudo associações sugestivas à infecção por *H. pylori* bem como reproduzimos essas variantes em uma coorte europeia. Demais estudos de replicação em populações distintas e avaliação funcional devem ser realizados para melhor verificar a relação dessas variantes com susceptibilidade à infecção por *H. pylori*.

ANEXO 1 - Normas para formatação de manuscritos da Revista Helicobacter

Manuscripts

- Do not attempt to make your output approximate or match the typeset page.
- Be consistent in style (i.e. units, abbreviations).
- End paragraphs in a uniform manner, and in a different manner from line endings within paragraphs. A frequently used paragraph ending is simply two carriage returns.
- Use '1', not 'el' for 'one'. Do not use 'oh' for zero.
- Use double spacing in your document. Do not add extra line spacing (except as a normal paragraph ending indication) above or below titles, subheads, or between paragraphs.
- Do not divide words by hyphenating at line endings.
- Title should not exceed 60 words.
- Running head should not exceed 160 words.

References

- All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text, citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals.

For more information about this reference style, please see the AMA Manual of Style.

Reference examples follow:

Journal article

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

Internet Document

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2003. <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2003PWSecured.pdf>. Accessed March 3, 2003.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. Click [here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Link para acessar as normas de submissão de manuscritos:

https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15235378/homepage/forauthors.html?_cf_chl_jschl_tk__=pmd_Lzl8yvJvuV9Zo48TZ50DnF.j2O2ad_ZQryQOVx3Q_oU-1635271568-0-gqNtZGzNAICjcnBszQ2l#aimsandscope