



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Avaliação da densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em gastrites e adenocarcinomas gástricos de pacientes portadores ou não de infecção pelo *Helicobacter pylori***

**JOANA TERESA DINIZ CARVALHO TAVARES**

**BRASÍLIA/DF**  
**2016**

**JOANA TERESA DINIZ CARVALHO TAVARES**

**Avaliação da densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em gastrites e adenocarcinomas gástricos de pacientes portadores ou não de infecção pelo *Helicobacter pylori***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliza Carla Barroso Duarte

**BRASÍLIA/DF**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

- J62a    Diniz Carvalho Tavares, Joana Teresa.  
Avaliação da densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em gastrites e adenocarcinomas gástricos de pacientes portadores ou não de infecção pelo *Helicobacter pylori* / Joana Teresa Diniz Carvalho Tavares. -- 2016.  
86 f.: il. col. ; 30cm
- Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, 2016.  
Inclui bibliografia.  
Orientação: Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto.  
Coorientação: Eliza Carla Barroso Duarte.
1. *Helicobacter pylori*. 2. Gastrite. 3. Adenocarcinoma Gástrico. 4. Linfócitos T CD8<sup>+</sup>. I. Figueiredo Cavalcanti Neto, Florêncio, orient. II. Barroso Duarte, Eliza Carla, co-orient. III. Título.

**JOANA TERESA DINIZ CARVALHO TAVARES**

**Avaliação da densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em gastrites e adenocarcinomas gástricos de pacientes portadores ou não de infecção pelo *Helicobacter pylori***

**Aprovada em 12 de dezembro de 2016.**

**BANCA EXAMINADORA DA DESEFA DE MESTRADO**

---

**Prof. Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto**  
(Presidente)  
Universidade de Brasília - UnB

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Doralina do Amaral Rabello Ramos**  
(Membro Titular)  
Universidade de Brasília - UnB

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Daniela Cotta Ribeiro**  
(Membro Titular Externo)  
Universidade do Distrito Federal - UDF

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Tânia Torres Rosa**  
(Membro Suplente)  
Universidade de Brasília – UnB

**Brasília/DF**

**2016**

## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, companheiro, amigo e cúmplice Marcus Tavares, que sempre me incentivou e apoiou nesse grande desafio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que mesmo após momentos tão difíceis, acolheu-me em seus braços, nunca me deixando desistir com seu amor incondicional, por guiar meus caminhos e escolhas, por transformar minha vida, minha mente e meu coração.

Ao orientador Prof. Dr. Florêncio Figueiredo, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos por meio do universo da pesquisa.

À coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliza Duarte, pelo incentivo, sabedoria e eterno aprendizado passado a mim.

Aos meus pais e irmãos, que mesmo de longe, apoiaram-me nessa conquista.

À minha sogra Dona Conceição, por suas palavras de incentivo e orações.

Aos colegas que conquistei ao longo dessa jornada, Tércia, Patrícia, Robson e Ramon que nunca me deixaram abater e ajudaram-me nos momentos que pareciam difíceis.

À Professora Aline, de Goiânia, que mesmo a tendo conhecido tão pouco, tornou-se uma grande amiga, com seus conselhos, paciência e palavras de incentivo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Ferreira, por abrir as portas do mundo acadêmico, indicando-me ao meu Orientador Prof. Dr. Florêncio Figueiredo.

Ao Alessandro, secretário do Programa de Pós-graduação de Ciências Médicas, pela paciência de sempre me auxiliar nos processos burocráticos e nunca ter deixado perder nenhum prazo.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas da Universidade de Brasília que proporcionou todas as condições para a realização deste trabalho e crescimento profissional, e ao corpo Docente, por todo conhecimento compartilhado.

*“Tudo parece impossível até que seja feito”*  
(Nelson Mandela).

## RESUMO

A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* ocorre em todo o mundo. Sua prevalência varia de acordo com o desenvolvimento de diferentes países e está associada a inúmeras doenças gástricas. A presença da bactéria na mucosa gástrica induz resposta inflamatória ativa que determina danos em diferentes graus: de atrofia, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma gástrico, na presença ou não de bacilos detectáveis na mucosa. Estas manifestações estão associadas ao estabelecimento do câncer da mucosa gástrica. Após a inflamação aguda, pode ocorrer aumento da permeabilidade do epitélio gástrico, exposição contínua ao antígeno do *H. pylori*, recrutamento de células T e ainda a produção de anticorpos pelas células B. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em gastrites e adenocarcinoma gástrico de pacientes portadores ou não de infecção pelo *H. pylori*. Para esta análise, foram utilizados 25 casos de gastrite inativa, 26 casos de gastrite ativa leve, 25 casos de gastrite ativa moderada e 14 casos de adenocarcinoma gástrico, amostras coletadas do período de março de 2014 a abril de 2016 dos arquivos do Laboratório de Imunopatologia de Brasília. Para verificar a expressão dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos casos estudados, foi realizado o teste de imunohistoquímica e as células imunomarcadas foram obtidas, utilizando o programa *ImageJ* (1.32j). A maioria dos casos de gastrite foi de pacientes do sexo feminino (71,2%) e nos casos de adenocarcinoma gástrico foram pacientes do sexo masculino (71,4%). Verificou-se a progressão da resposta inflamatória à colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*. Foram identificados mecanismos de migração celular, aparentemente associados à liberação de antígenos do bacilo no microambiente estabelecido no curso da infecção. Averiguou-se a participação das células inflamatórias na erradicação de bacilos e a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que podem aparentemente exercer duas funções, tanto modular a inflamação como participar de mecanismos oncogênicos. Estes resultados demonstram que a colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* estabelece uma resposta inflamatória, além de promover alterações em subpopulações de linfócitos. Esses importantes mecanismos que participam do controle da erradicação dos bacilos também estão presentes no estabelecimento do carcinoma gástrico.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*; Gastrite; Adenocarcinoma Gástrico; Linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* infection occurs worldwide. Its estimate of agreement with the development of different countries and is associated with numerous diseases. The presence of the bacterium in the gastric mucosa induces an active inflammatory response that determines gastric mucosa damage in different degrees: atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia and gastric carcinoma, in the presence or not of detectable mucosa bacilli. These manifestations are associated with the establishment of cancer of the gastric mucosa. After an acute inflammation, there may be an increase in the permeability of the gastric epithelium, a continuous exposure to the *H. pylori* antigen, a recruitment of T cells, and an antibody production on B cells. In view of this, to evaluate a density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in gastritis and gastric adenocarcinoma of patients with or without *H. pylori* infection. We analyzed 25 cases of inactive gastritis, 25 cases of moderate active gastritis and 14 cases of gastric adenocarcinoma, samples collected from March 2014 to April 2016 from the archives of the Laboratory of Immunopathology De Brasilia. To verify the expression of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the cases studied, the immunohistochemical test was performed and the immunolabelled cells were obtained using the ImageJ program (1.32j). Most cases of gastritis were female (71.2%) and cases of gastric adenocarcinoma were male patients (71.4%). A progression of the inflammatory response to *H. pylori* colonization of the gastric mucosa has been reported. Cell migration mechanisms were identified, apparently associated with the release of bacillus antigens without microenvironment established in the course of infection. There was a participation of inflammatory cells in the eradication of bacilli and a presence of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes that may apparently exert two functions as modulating an inflammation as participating in oncogenic mechanisms. These results demonstrate that colonization of the gastric mucosa by *H. pylori* is an inflammatory response, besides promoting the development in subpopulations of lymphocytes. These important mechanisms that participate in the control of eradication of bacilli are also present in the establishment of gastric carcinoma.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*; Gastritis; Gastric Adenocarcinoma; CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto típico de <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
Figura 2 - Esquema da reação catalisada pela urease: hidrólise de ureia, produzindo CO <sub>2</sub> e amônia .....	17
Figura 3 - Prevalência global de casos de <i>Helicobacter pylori</i> .....	18
Figura 4 - Esquema de como desenvolveu-se a técnica de imunohistoquímica.....	32
Figura 5 - Fotomicrografia das imunomarcção de Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> em aumento de 40x: A) GIA; B) GALA; C) GAMA; D) AG. A imunomarcção para Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> pode ser vista em contorno marrom, com maior número nos casos de AG quando comparado aos demais casos .....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica das amostras de gastrites associadas ao sexo .....	36
Gráfico 2 - Representação gráfica das amostras de AG associadas ao sexo .....	36
Gráfico 3 - Comparação da densidade de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> entre os grupos de pacientes com gastrite ativa moderada/acentuada de antro (GAMA), gastrite ativa leve de antro (GALA), gastrite inativa de antro (GIA) e adenocarcinoma gástrico (AG) .....	38
Gráfico 4 - Correlação entre densidade de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> e a quantidade de <i>H. pylori</i> nos pacientes com GAMA .....	40

## LISTA DE SIGLAS

<b>AG</b>	Adenocarcinoma gástrico
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>GALA</b>	Gastrite ativa leve de antro
<b>GAMA</b>	Gastrite ativa moderada de antro
<b>GIA</b>	Gastrite Inativa do Antro
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IFN – <math>\gamma</math></b>	Interferon – $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LTCs</b>	Linfócitos T citotóxicos
<b>MALT</b>	Tecido linfoide associado à mucosa
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformante- $\beta$
<b>Th1</b>	Células inflamatórias
<b>Th2</b>	Células auxiliares
<b>Treg</b>	Células T regulatórias
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>Mm</b>	Micrômetro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo ocorre por meio de uma sequência de múltiplos passos a partir de exceto câncer de pele não melanoma.....	24
Tabela 2 - Distribuição das amostras quanto aos tipos de casos clínicos e sexo. ....	35

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
1.2 Relação <i>H. pylori</i> e gastrite .....	19
1.3 Relação <i>H. pylori</i> e câncer gástrico.....	22
1.4 Infecções por <i>H. pylori</i> e sua resposta imune.....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos .....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 Delineamento do estudo.....	30
3.2 Processamento histológico das amostras .....	31
3.3 Técnica imunohistoquímica .....	31
3.4 Quantificação de células .....	33
3.5 Análises estatísticas dos dados .....	33
3.6 Considerações éticas.....	34
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 Dados epidemiológicos.....	35
4.2 Análise cruzada dos dados clínico-patológicos.....	35
4.3 Avaliação histopatológica .....	37
4.4 Avaliação por imunohistoquímica para a presença de <i>H. pylori</i> nas amostras gástricas.....	37
4.5 Avaliação imunohistoquímica da densidade de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> nas amostras gástricas.....	38
4.6 Comparação entre a densidade de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> e a quantidade de <i>Helicobacter pylori</i> .....	39
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>
<b>ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília</b> .....	<b>67</b>
<b>ANEXO B - Artigo</b> .....	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi isolada e cultivada pela primeira vez em 1983, pelos pesquisadores australianos Warren e Marshall, a partir de amostras da mucosa gástrica de pacientes com úlcera. O impacto dessa descoberta foi um dos avanços mais importantes da gastroenterologia, possibilitando o esclarecimento de afecções da mucosa gástrica, como a gastrite, úlcera péptica, neoplasias epiteliais e linfoides (OLIVEIRA, 2014).

A infecção por *H. pylori* ocorre em todo o mundo, mas sua prevalência é variável em diferentes países e em grupos populacionais dentro da mesma nação (BARBOSA & SCHINONNI, 2011). A estimativa da população mundial infectada pela bactéria é de cerca de 50%, sendo que a predominância é maior nos países em desenvolvimento (MULLER et al., 2007). Evidências epidemiológicas apontam que essa bactéria é frequentemente adquirida na infância. Na fase adulta sua ocorrência é menor, podendo persistir por toda a vida (YAMAOKA, 2010).

A colonização do *H. pylori* no tecido gástrico é, na maioria das vezes, acompanhada por um processo inflamatório (SUERBAUM & MICHETTI, 2002), que promove danos na mucosa gástrica, caracterizados por uma extensa infiltração de granulócitos e linfócitos (ANDO et al., 2006). Uma das consequências presentes em quase todos os indivíduos infectados é a gastrite, que se estabelece a longo prazo, embora muitos hospedeiros permaneçam assintomáticos (BARBOSA & SCHINONNI, 2011). Essa inflamação aguda parece determinar o aumento da permeabilidade do epitélio gástrico e exposição contínua a antígenos bacterianos, o que provavelmente contribui para o estabelecimento da resposta imune do hospedeiro contra o *H. pylori* e, conseqüentemente, o recrutamento de células T e indução da produção de anticorpos pelas células B (OLIVEIRA, 2014; VIGNALI et al., 2008).

Estudos evidenciaram que a presença de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF –  $\alpha$ ), Interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8), no sangue periférico, está associada com elevação de células

inflamatórias (Th1), células auxiliares (Th2) e a presença de células T reguladoras (Treg), sugerindo a importância da inflamação crônica como mecanismo de resposta a presença de *H. pylori* (WANG et al., 2007; KANG et al., 2009; WATANABE et al., 2010; SUGANUMA et al., 2012). A resposta imune adaptativa ao *H. pylori* é caracterizada pela indução de células T CD4<sup>+</sup> mediadas por células Th1 e células Treg (ZHANG et al., 2010). Estudos recentes demonstram associação entre a colonização por *H. pylori* e o aumento de células T CD8<sup>+</sup> com o desenvolvimento de úlceras gástricas (KRONSTEINER et al., 2014; HELMIN-BASA et al., 2011; TABASSAM et al., 2008). Outro estudo, realizado por Zorzetto et al. (2012), demonstrou que as repostas de células Th1 induzidas pelo *H. pylori* contribuem, também, para o desenvolvimento de tumores gástricos.

Um importante fator de risco para o câncer gástrico é a infecção em longo prazo pelo *H. pylori*. Segundo Tonelli e Freire (2000), essa bactéria é classificada como carcinogênica e está associada ao desenvolvimento do carcinoma e do linfoma gástrico. Esse tipo de câncer parece evoluir de afecções inflamatórias como gastrite atrófica, metaplasia intestinal e alterações displásicas (PARSONNET et al., 1991; YAMAGATA et al., 2000).

O câncer gástrico é uma das afecções mais comuns no mundo e pode ser responsável por 63% dos casos (THE EUROGAST STUDY GROUP, 1993; LIN et al., 2016). Corresponde à segunda principal causa de morte em todo o mundo (PARKIN et al., 2001; STEWART & KLEIHUES, 2016), acomete cerca de 50% da população, chegando a 90% nos países em desenvolvimento (PARKIN et al., 2001).

Inúmeros são os mecanismos envolvidos no controle do câncer gástrico, sendo o principal deles a imunidade inata antitumoral que destrói células neoplásicas por meio dos linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (LTCs). Essas células têm a função de reconhecer e destruir células malignas que expressam peptídeos derivados de proteínas celulares mutantes ou proteínas virais oncogênicas (ABBAS et al., 2015, PIVA et al., 2013).

De modo geral, as neoplasias parecem orquestrar uma reação inflamatória crônica para estabelecer infiltrados celulares que promovem a sobrevivência tumoral (WHITESIDE, 2006). Entender as funções e

interações dos diferentes linfócitos que infiltram regiões inflamatórias é crucial para o desenvolvimento de imunoterapias.

### **1.1 *Helicobacter pylori***

Um dos primeiros relatos de colonização gástrica, por bactérias, ocorreu na Europa em 1906, em que foi relatado a presença de espiroquetas (SNELDERS, 1997; STEER, 1975). Na década de 30, foram identificadas espiroquetas em amostras gástricas de seres humanos, principalmente em portadores de úlcera péptica (WISE et al., 1955). Mais tarde, foi observada uma correlação entre a presença de bactérias e úlceras gástricas, notando que existiam numerosas bactérias espiraladas, em 80% de casos estudados, porém, não foi possível realizar o isolamento e a identificação dos microrganismos observados, pois a técnica para cultivar bactérias microaerofílicas só seria desenvolvida alguns anos depois (STEER, 1975).

Em 1983, Warren e Marshall, pesquisadores australianos, cultivaram, isolaram e descreveram as características microbiológicas da bactéria *H. pylori* e sua similaridade com as espécies do *Campylobacter* (GUSTAFSON & WELLING, 2010; MOBLEY, 2001; PAJARES & GISBERT, 2006). Em 1985, Marshall ingeriu suspensão do *H. pylori* na tentativa de cumprir o postulado de Koch, que versa sobre a autoexperimentação, promovendo os sintomas gástricos da infecção e depois tratando com antibióticos e sais de bismuto. Desde então, essa bactéria está intimamente ligada a um espectro diversificado de doenças gastrointestinais (LOPES et al., 2014).

O impacto dessa descoberta, que deu aos seus pesquisadores o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina, em 2005, revolucionou a gastroenterologia (LOPES et al., 2014). O manejo das doenças gastrintestinais foi notoriamente alterado após a comprovação do seu papel nas infecções gástricas. Esse estudo possibilitou explicações sobre várias doenças gástricas, como: úlcera péptica (gástrica e duodenal), gastrite crônica, linfoma do tecido linfoide associado à mucosa gástrica (MALT) e

adenocarcinoma gástrico (AG) (ATKINSON & BRADEN, 2016; HAJIMAHMOODI et al., 2011; OLIVEIRA, 2014).

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, helicoidal e microaerofílica (LV et al., 2015). Apresenta crescimento lento, mede cerca de 2,5 a 4,0µm de comprimento, 0,5 a 0,9µm de largura e 1µm de diâmetro. Possui de quatro a seis flagelos uni ou bipolares em uma das suas extremidades (FIGURA 1), o que lhe permite motilidade para que ela chegue à superfície gástrica, onde passa a aderir às células do estômago (JOSENHANS & SUERBAUM, 2001; MARSHALL & WARREN, 1984). Sua colonização, normalmente, inicia-se na região pré-pilórica do estômago e, progressivamente, estende-se nos segmentos mais proximais do estômago (CUNHA & AREIAS, 2016).

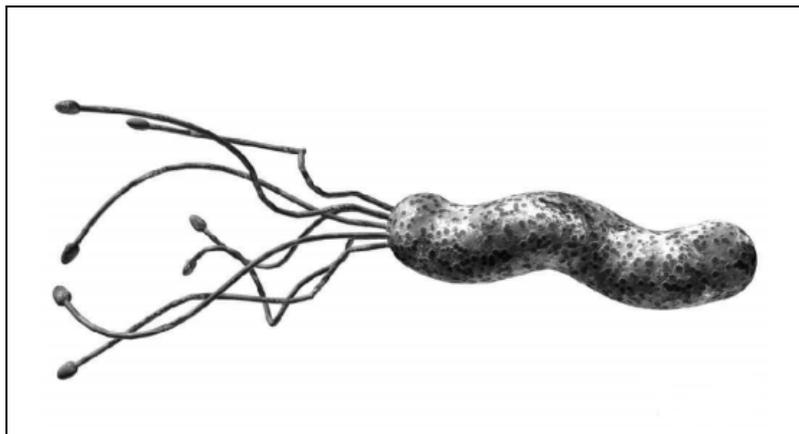


Figura 1 - Aspecto típico de *Helicobacter pylori*  
Fonte: Marshall et al. (1990); Sycuro et al. (2012).

Sua sobrevivência no epitélio gástrico depende da produção de enzimas importantes como a urease, catalase, protease e fosfolipase. Com essas enzimas ela é capaz de adaptar-se à mucosa gástrica, onde a urease catalisa a reação de hidrólise da ureia em duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (FIGURA 2) (LV et al., 2015; MOBLEY, 2001). Marshall et al. (1990) demonstraram que a potente atividade da urease do *H. pylori* explica a sua capacidade de colonizar um meio extremamente ácido. Com a presença de ureia, a bactéria consegue sobreviver em ambientes com pH de até 2,5 e a diminuição do pH da mucosa gástrica pela ação da urease diminui sua viscosidade, o que permite uma maior

quimiotaxia da bactéria (CELLI et al., 2009). Além disso, a urease é considerada um importante fator de virulência, sendo utilizada amplamente como marcador para diagnósticos dessa bactéria (KROGFELT et al., 2005).

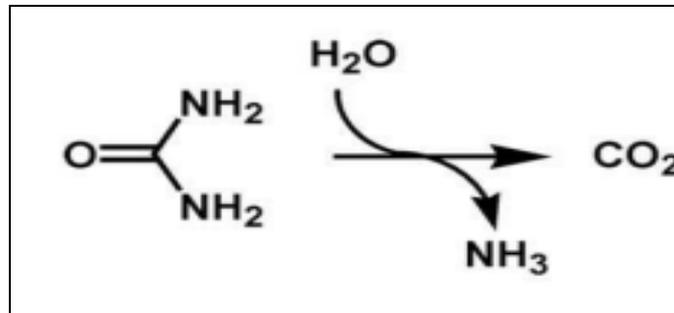


Figura 2 - Esquema da reação catalisada pela urease: hidrólise de ureia, produzindo CO<sub>2</sub> e amônia  
Fonte: Uberti (2014).

A infecção pelo *H. pylori* é uma das mais predominantes entre os seres humanos. Estima-se que aproximadamente metade da população seja portadora desta bactéria (FOCK & ANG, 2010). Sua prevalência pode variar de acordo com as regiões geográficas, etnia, gênero, idade, condições socioeconômica, nível de escolaridade e profissão (BLASER & BERG, 2001).

Por ser uma infecção de distribuição cosmopolita, sua prevalência e incidência são, acima de tudo, uma questão de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento e em indivíduos de baixa classe socioeconômica (DORJI et al., 2014; HESTVIK et al., 2010; NAGY et al., 2011; SANTOS et al., 2010). A figura 3 representa a prevalência mundial da infecção pelo *H. pylori*, sendo mais significativa em países em desenvolvimento, onde abrange todas as faixas etárias, acometendo 70% e 90% da população. Em países desenvolvidos a prevalência é menor, variando entre 20% e 50% (WHO, 2016).

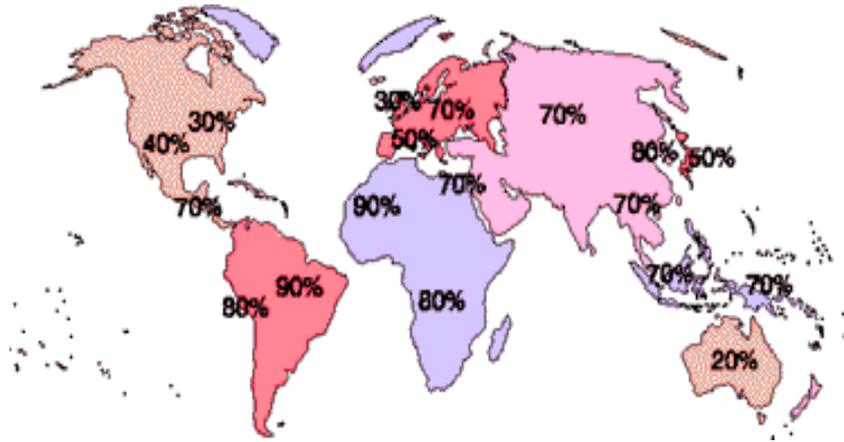


Figura 3 - Prevalência global de casos de *Helicobacter pylori*  
 Fonte: The Helicobacter Foundation (2016).

No Brasil, a prevalência em adultos encontra-se em torno de 82% (WHO, 2016). Estudos realizados em São Paulo e Minas Gerais apontaram prevalência de *H. pylori* entre 40% e 70%, respectivamente (ARAF et al., 2010; ROCHA et al., 2003). Outro estudo na zona rural do Amazonas reportou prevalência de 82% na população geral, sendo 53% crianças e adolescentes e 47% adultos e idosos (MONTEIRO et al., 2013). E estudo realizado em Fortaleza/CE demonstrou um percentual de 44% de pacientes infectados pela bactéria *H. pylori* (ROCHA, 2013).

Em nível mundial, estudos sugeriram que a prevalência de *H. pylori* tem uma tendência de queda tanto nos países desenvolvidos quanto nos subdesenvolvidos (MIENDJE DEYI et al., 2011), devido à melhoria das condições de vida das populações (DACOL et al., 2014; PARENTE & PARENTE, 2010).

Com isso, muitos estudos verificaram que os principais fatores de riscos que promovem o desenvolvimento da infecção por *H. pylori* estão relacionados às condições socioeconômicas da população afetada, como o baixo nível de renda familiar (LIM et al., 2013; ZHU et al., 2014) moradores de área rural (HANAFI & MOHAMED, 2013; LIM et al., 2013; VILAICHONE et al., 2013) família com muitos indivíduos (BASTOS et al., 2013; DORJI et al., 2014) e baixo nível de escolaridade (ALVARADO-ESQUIVEL, 2013; BENAJAH et al., 2013; DEN HOLLANDER et al., 2013; MANA et al., 2013; ZHU et al., 2014).

As vias de transmissões do *H. pylori* ainda não estão completamente compreendidas na literatura, no entanto, admitem-se as seguintes vias: (i) fecal-oral, (ii) oral-oral e gastro-oral (KHALIFA et al., 2010; SHANKS & EL-OMAR, 2009).

- (i) A via fecal-oral ocorre, principalmente, por meio de água contaminada, geralmente em países em desenvolvimento, onde o tratamento dos fluentes não é adequado, o que potencializaria a contaminação por meio das fezes (SHANKS & EL-OMAR, 2009; KHALIFA et al., 2010). Atualmente, o *H. pylori* está presente em 95% dos pacientes com úlceras duodenais e em 70% daqueles com úlceras gástricas; os quais são tipicamente contaminados pela via fecal-oral durante a primeira infância (FASHNER & GITU, 2015).
- (ii) Já a via oral-oral baseia-se no fato da bactéria ter sido encontrada no suco gástrico, em regurgitações e vômitos, tornando-se possíveis fontes de contaminação. Diferentes estudos têm relatado a presença de DNA do *H. pylori* oriundos de materiais como saliva, biofilme sub-gengival e placa dental (BÜRQUERS et al., 2008; SOUTO & COLOMBO, 2008).
- (iii) E a via gastro-oral ou via iatrogênica, que se dá principalmente, por equipamentos usados em exames de pessoas contaminadas e que são esterilizados ou manuseados incorretamente (MAZZOLENI & MAZZOLENI, 2010).

Sugere-se, também, que a transmissão deste microrganismo ocorra por meio de contato de pessoa-pessoa e a disseminação intrafamiliar (CALVET et al., 2013).

## **1.2 Relação *H. pylori* e gastrite**

As gastrites são caracterizadas por reações inflamatórias na parede do estômago e quando essa barreira mucosa é danificada permite que o suco gástrico produzido pelo estômago cause erosões ou possibilite

infecções no revestimento de proteção do estômago (AGUIAR et al., 2002). De acordo com Lopes (2013), o conceito de gastrite deve ser utilizado nos casos em que coexiste lesão celular, processo regenerativo e infiltração inflamatória, acrescidos da presença de folículos linfóides na mucosa gástrica, como também neutrófilos, plasmócitos, linfócitos e eosinófilos, de evolução aguda ou crônica, achados associados quase sempre à infecção por *Helicobacter pylori*.

A gastrite possui diversos fatores etiológicos que podem ser classificados de acordo com o mecanismo patogênico, a localização anatômica, a evolução temporal e características histológicas (LONGO & FAUCI, 2014).

Dentre os principais mecanismos patogênicos envolvidos, estão os fatores de virulência do microrganismo, como a aderência (MAHDAVI et al., 2002), a urease (VOLAND et al., 2003), a fosfolipase (MISIEWICZ, 1995) e as citotoxinas (ATHERTON, 1997; CENSINI et al., 1996); a resposta inflamatória na mucosa gástrica, induz a um infiltrado inflamatório por neutrófilos, monócitos, linfócitos e plasmócitos e a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6 e IL8, TNF –  $\alpha$  e interferon – gama (IFN –  $\gamma$ ) (HUNT et al., 1995; MISIEWICZ, 1995); e alteração da secreção ácida gástrica, que está associada com a diminuição da liberação da somatostatina e aumento da liberação de gastrina pelo antro gástrico (HUNT et al., 1995; MISIEWICZ, 1995).

Atualmente, o *H. pylori* é considerado o principal agente etiológico da gastrite, da úlcera péptica, do câncer gástrico e do MALT (GODOY et al., 2007; DDINE et al., 2012; ZULLO et al., 2013). Quanto à sua localização anatômica, o *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica, especificamente as microvilosidades situadas acima da camada de células epiteliais do estômago e tem preferência pela região do antro gástrico, onde reconhece antígenos (AGUIAR et al., 2002; BLACK, 2002; MINCIS, 1999). A sua evolução temporal consiste principalmente em aguda e crônica, e é considerado um dos processos inflamatórios mais frequentes nos seres humanos (JEONG et al., 2000; MINCIS, 2003).

A gastrite aguda caracteriza-se por alterações histológicas que incluem um intenso infiltrado neutrofílico da mucosa e da lâmina própria,

podendo ocasionar uma inflamação apenas superficial ou escoriações da mucosa gástrica pela própria secreção do estômago (HU et al., 2016; LEE, 2016; SOBALA et al., 1991). Tanto os neutrófilos como o *H. pylori* são responsáveis pela destruição do epitélio (SOBALA et al., 1991). A inflamação neutrofílica e a presença de folículos linfóides com centros germinativos são as duas principais alterações histológicas oriundas da infecção pelo *H. pylori* e sua erradicação provoca rápido desaparecimento dos neutrófilos; desta forma, a permanência dos neutrófilos é um bom indicador da falha terapêutica. Após a erradicação das bactérias, há uma rápida reversão das alterações histológicas e as células voltam as suas formas normais e reorganização espacial (KONG et al., 2014).

Após a infecção, a gastrite aguda produz uma hipocloridria transitória, facilitando a colonização inicial e promovendo a ativação da inflamação. Este mecanismo não está totalmente compreendido, entretanto, hipóteses sugerem que a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-8 sejam responsáveis (SAHA et al., 2010). Nesta fase, a inflamação é de curta duração e na maioria dos casos a infecção resolve-se espontaneamente (SOBALA et al., 1991). Além disso, a gastrite pode ser assintomática ou provocar dores e indigestão (BLACK, 2002; HU et al., 2016) ou ainda pode evoluir para gastrite crônica, como na maioria dos casos (KUSTERS et al., 2006).

Pesquisas apontam que 95% das gastrites crônicas possuem como agente etiológico o *H. pylori* (LEE, 2016; MINCIS, 2003). Esta bactéria reside primariamente na camada mucosa imóvel, adjacente às células epiteliais e foveolas gástricas (BLASER & ATHERTON, 2004). A gastrite crônica localiza-se, predominantemente, no antro ou no corpo gástrico, podendo afetar ambas as zonas do estômago, pangastrite. Pacientes com esse tipo de patologia desenvolvem um padrão inflamatório da mucosa, caracterizado principalmente pela presença de células mononucleares, e também por neutrófilos (SUERBAUM & MICHETTI, 2002). Alguns indivíduos têm o predomínio de células mononucleares e o desenvolvimento de uma atrofia da mucosa que pode levar à acloridria, ou seja, o estômago deixa de secretar o ácido clorídrico (MINCIS, 2003; SHIU & BLANCHARD, 2013).

A infecção pelo *H. pylori* também está associada ao desenvolvimento da úlcera péptica, devido à superprodução ácida derivada desta infecção

(CARVALHO, 2000). A úlcera duodenal, geralmente, é derivada de uma gastrite antral, que é a forma mais comum de gastrite causada pelo *H. pylori*. Já indivíduos que apresentam gastrite no corpo e atrofia multifocal são mais propensos ao desenvolvimento de úlcera gástrica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e, por último, do carcinoma gástrico (SUERBAUM & MICHETTI, 2002).

A úlcera péptica é uma patologia na qual se observa macroscopicamente uma lesão na membrana mucosa intestinal duodenal ou gástrica. Esta resposta inflamatória induz a secreção exagerada de gastrina pelas células G do antro, que atinge o corpo gástrico, estimulando as células parietais com consequente aumento da secreção ácida. Níveis persistentemente elevados de gastrina e de ácido gástrico podem danificar o duodeno e resultar numa úlcera duodenal (BLACK, 2002; JANEWAY et al., 2006; MINCIS, 2003; DE & ROYCHOUDHURY, 2015; AHN & LEE, 2015). Com a perpetuação da inflamação, há uma perda gradual de células G, produtoras de gastrina e células parietais, condicionando uma queda da secreção ácida e o desenvolvimento de atrofia gástrica com metaplasia intestinal, fatores que facilitam a migração do *H. pylori* para o corpo gástrico. Este padrão de gastrite associa-se preferencialmente às úlceras gástricas (EGAN & O'MORAIN, 2007; SCHUBERT & PEURA, 2008).

Um dos avanços significativos na compreensão da doença gastroduodenal foi a percepção de que a infecção por *H. pylori* é uma causa significativa de úlceras gastroduodenais, correspondendo a 90% a 95% das causas de úlceras duodenais e de 70% a 75% de úlceras gástricas (FASHNER & GITU, 2015).

### **1.3 Relação *H. pylori* e câncer gástrico**

O câncer é uma doença genética caracterizada pela proliferação descontrolada e desordenada de células anormais que possuem uma capacidade invasiva, pois tem potencial de disseminação por vários tecidos do corpo (ESTELLER & HERMAN, 2002). O câncer gástrico possui etiologia

multivariável, pela interação entre fatores genéticos dos pacientes, fatores socioambientais, bem como pelos fatores de virulência das cepas de *H. pylori* (SUERBAUM & MICHETTI, 2002).

Desde a descoberta de *H. pylori* em 1983 (MARSHALL & WARREN, 1984), vários estudos demonstraram associação entre a infecção pela bactéria e o desenvolvimento de diversas doenças gástricas, incluindo o câncer gástrico (PARSONNET et al., 1991; YAMAGATA et al., 2000). Este trata de uma doença em que a infecção, a inflamação crônica e as alterações epigenéticas encontram-se interconectadas (HU et al., 2016; LEE, 2016). A associação entre infecção pelo *H. pylori* e o câncer gástrico é forte e bem descrita pela literatura mundial (BRENNER et al., 2000).

Em 1994, o *H. pylori* foi classificado como agente cancerígeno da classe I (definitivo) pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC - International Agency for Research on Cancer), uma divisão da Organização Mundial da Saúde (OMS) (IARC, 1994; AHN & LEE, 2015). O câncer gástrico é um importante problema de saúde pública. Além de ser considerada uma das principais causas de mortes em todo o mundo (VALENZUELA et al., 2015). Apesar da incidência e mortalidade ter diminuído nas últimas décadas, ele continua sendo uma das doenças malignas mais comuns (LIN et al., 2016).

Um importante fator de risco para o indivíduo desenvolver o câncer gástrico é história familiar positiva para a doença, pois estudos epidemiológicos reportam significância estatística para a referida relação (MARCOS-PINTO et al., 2012). Este tipo de câncer provoca danos em glândulas gástricas, desencadeando gastrite atróficas associada a hipocloridria ou acloridria e altos níveis de gastrina. Tais alterações gástricas evoluem em várias etapas, incluindo metaplasia intestinal, displasia e adenocarcinoma (AMIEVA & EL-OMAR, 2008; NAM et al., 2011; AHN & LEE, 2015; DE & ROYCHOUDHURY, 2015).

Conforme a classificação de Lauren, o adenocarcinoma gástrico possui dois tipos histológicos: intestinal e o difuso (SANTORO et al., 2007; NAM et al., 2011). O adenocarcinoma do tipo difuso tem associação com o *H. pylori* por possuir aspecto histológico com poucas glândulas gástricas e células não coesivas com infiltrado na parede gástrica e sua maior

incidência ocorre em pacientes jovens (SANTORO et al., 2007; POLK & PEEK, 2010; AHN & LEE, 2015). Já a sequência da evolução de manifestações clínicas da infecção pelo *H. pylori* até o desenvolvimento do câncer gástrico do tipo intestinal são: gastrite crônica, que está presente na maioria dos pacientes e em muitos se encontram assintomáticos; úlceras duodenais, que ocorre de 10% a 15% dos indivíduos; úlceras gástricas e adenocarcinoma que podem evoluir até câncer gástrico em 1% a 3% dos indivíduos infectados e linfoma MALT, que se desenvolve em 0,1% dos indivíduos (SANTORO et al., 2007; AMIEVA & EL-OMAR, 2008; AHN & LEE, 2015).

Estima-se o surgimento de 20.520 novos casos de câncer gástrico no Brasil, sendo 12.920 em homens e 7.600 em mulheres, no ano de 2016. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13,04 casos novos a cada 100 mil homens e 7,37 para cada 100 mil mulheres. A tabela 1 representa a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma (INCA, 2016).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo ocorre por meio de uma sequência de múltiplos passos a partir de exceto câncer de pele não melanoma.

Localização primária					Localização primária		
casos novos	%				casos novos	%	
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA (2016).

O adenocarcinoma gástrico origina-se nas células epiteliais gástricas e assume formas, tamanhos e características invasivas muito diversas. Tanto a macroscopia quanto a histopatologia fornecem elementos úteis para a classificação que melhor se correlaciona com o prognóstico (ADU-ARYEE et al., 2016). O desenvolvimento do câncer gástrico é: gastrite crônica,

gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, adenocarcinoma gástrico após um período prolongado de tempo (CORREA, 1995; HUANG et al., 2016).

#### **1.4 Infecções por *H. pylori* e sua resposta imune**

O risco de desenvolver doença gástrica na presença do *H. pylori*, depende da interação de uma variedade de fatores, dentre eles, bactéria, hospedeiro e meio ambiente (KUSTERS et al., 2006). O *H. pylori* desenvolveu estratégias que lhe permitem sobreviver e persistir na mucosa gástrica, regulando negativamente a resposta imune do hospedeiro por meio de seus fatores de virulência. Além disso, suas características como a forma espiral com os flagelos, facilitam a mobilidade e penetração na mucosa, conseguindo, assim, colonizar a superfície do epitélio celular de onde retira micronutrientes importantes como, por exemplo, o ferro (TAN et al., 2008). Entretanto, a maioria dos portadores desta bactéria é assintomática e apenas uma pequena porcentagem dos pacientes infectados desenvolve respostas mais severas à infecção, sendo a gastrite o quadro clínico aparente mais comum (BARBOSA & SCHINONNI, 2011).

A presença do *H. pylori*, além de estimular a imunidade inata, estimula também as respostas imunes humorais e mediadas por células. Contudo, as respostas humorais não estão envolvidas na proteção; em contraste com as respostas mediadas por células que atuam na eliminação da bactéria e na patogênese em modelos animais e em seres humanos (EATON et al., 2001). Essa reação inflamatória, provocada na infecção pelo *H. pylori* na mucosa gástrica do hospedeiro apresenta infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos T e B. Tanto o *H. pylori* quanto as citocinas induzidas durante a infecção podem estimular o recrutamento e a ativação das células inflamatórias (SHIMADA et al., 2011). Após a inflamação aguda que desencadeia alterações na permeabilidade do epitélio gástrico, haverá uma exposição contínua ao antígeno, que implicará,

consequentemente, no recrutamento de células T e uma indução na produção de anticorpos pelas células B (KANG et al., 2009).

Na infecção pelo *H. pylori* o que predomina é o perfil de resposta celular Th1, o qual está associado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação de macrófagos. Essa resposta imune adaptativa ao *H. pylori* tem sido extensivamente estudada em experimentos com rato infectados e seus resultados sugerem que uma forte resposta com células Th1 desenvolveram uma gastrite intensa, mas com baixa carga bacteriana; enquanto que em ratos com perfil de resposta celular Th2 foi observado o contrário, com diminuição da inflamação e atrofia gástrica (SMYTHIES et al., 2000; FOX et al., 2000). Semelhantes aos seres humanos, os modelos de animais infectados por *H. pylori*, são caracterizados pela indução de respostas mistas de células T CD4<sup>+</sup> mediadas por Th1, Th17, e subconjuntos de células Treg, que também não erradicam a bactéria (ZHANG et al., 2010).

As células T *helper* expressam CD4 e podem se diferenciar em dois subtipos funcionais: os macrófagos M1 que normalmente participam da resposta imune inicial para microrganismos invasores e promovem células Th1, que são secretoras de IL-2, IFN  $\gamma$  e produtos microbianos; e os macrófagos M2 que são induzidos durante a fase de resolução da inflamação e estão envolvidos na eliminação de detritos, remodelação de tecidos, e promoção de células Th2 ou citocinas anti-inflamatórias, que secretam fatores de crescimento, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  (MARTINEZ et al., 2009; MOSSER & EDWARDS, 2008). Existem evidências de que a resposta de células Th1 induzida pelo *H. pylori* contribui para o desenvolvimento de tumores gástricos (ZORZETTO et al., 2012). A indução da inflamação no microambiente do estômago encontra-se associada com a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8. Vários estudos demonstraram que os níveis destas citocinas na mucosa são significativamente mais elevados em pacientes infectados com *H. pylori* (KANG et al., 2009; WATANABE et al., 2010; SUGANUMA et al., 2012).

Nesse contexto das respostas imunes ao *H. pylori*, dados recentes de estudos clínicos humanos enfatizam a relevância potencial de outro subconjunto de células T como os linfócitos T citotóxicos CD8 positivos

(LTCs CD8<sup>+</sup>). Estudos clínicos com humanos, tanto em crianças quanto em adultos, sugerem a associação entre a colonização por *H. pylori* e o aumento de células T CD8<sup>+</sup> com o desenvolvimento de úlceras gástricas (GRAHAM et al., 2004; HELMIN-BASA et al., 2011; KRONSTEINER et al., 2014).

O principal mecanismo de defesa da imunidade antitumoral é a morte de células neoplásicas por linfócitos T CD8 citotóxicos (PIVA et al., 2013). As células citotóxicas T CD8<sup>+</sup> são responsáveis por limitar infecções por patógenos, sendo mais comum o vírus. Estas eliminam os alvos infectados com grande precisão, poupando as células vizinhas normais. O mecanismo de ação das células T CD8<sup>+</sup> dá-se a partir da liberação de grânulos citotóxicos que contêm três classes de proteínas: a perforina, que são proteínas que formam poros na membrana da célula alvo, permitindo a entrega de moléculas efetoras como as granzimas, ou de água, o que causa a lise por osmose; as granzimas, que entram na célula alvo por meio dos poros previamente formados, ativam proteínas intracelulares e induzem apoptose; e a granulicina, que possui ação antimicrobiana e também pode induzir apoptose (MURPHY et al., 2016; TORREZINI & ATHANAZIO, 2008). Essa resposta imune às doenças infecciosas representa um equilíbrio complexo entre a indução bem sucedida de respostas inflamatórias e anti-inflamatórias, necessárias para limitar os danos aos tecidos do hospedeiro (TAAMS et al., 2006).

A *H. pylori* é vista como uma bactéria extracelular. No entanto, descobertas recentes demonstraram a sua presença no ambiente intracelular de células epiteliais e mielóides, além de serem detectadas respostas de células T CD8<sup>+</sup> em indivíduos infectados por esta bactéria (GRAHAM et al., 2004; HELMIN-BASA et al., 2011; KRONSTEINER et al., 2014). No que se refere à alteração na secreção gástrica do hospedeiro, estudos indicam que indivíduos infectados com essa bactéria apresentam maior concentração de gastrina plasmática, elevados níveis de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e nesse mesmo estudo, foi observado que a secreção de ácido em pacientes não infectados retornam ao normal após tratamento adequado (CRABTREE et al., 1991; YAMAOKA et al., 2002).

Essas observações destacam o fato de que a eficácia da resposta imune na supressão da repostas inflamatórias é altamente dependente do tipo de patologia e do momento em que é realizada a ativação imune (ZHU et al., 2014). No entanto, até o momento existem poucos estudos que relacionam a densidade de células T CD8<sup>+</sup> com a infecção causada pelo *H. pylori* e consequente resposta inflamatória, por isso o papel dessas células na resposta imune ao *H. pylori* tem sido mal definido.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em gastrites e adenocarcinoma gástrico de pacientes portadores ou não de infecção pelo *H. pylori*.

### 2.2 Específicos

- ✓ Verificar a associação entre gênero e a presença de *H. pylori* nos casos de gastrites e do adenocarcinoma gástrico;
- ✓ Avaliar a progressão da resposta inflamatória à colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*;
- ✓ Constar a participação das células inflamatórias na erradicação de bacilos e a presença de linfócitos TCD8<sup>+</sup> que podem aparentemente exercer duas funções, tanto modular a inflamação, como participar de mecanismos oncogênicos;
- ✓ Identificar mecanismos de migração celular, aparentemente associados à liberação de antígenos do bacilo no microambiente estabelecido no curso da infecção;
- ✓ Avaliar a associação da quantidade de bacilos do *H. pylori* com a densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em pacientes com diagnósticos de gastrite e adenocarcinoma gástrico;
- ✓ Comparar a densidade de linfócitos célula T CD8<sup>+</sup>, em gastrites e adenocarcinoma gástrico associadas ou não a infecções causadas pela bactéria *H. pylori*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento do estudo

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília/UnB, aprovado sob o número do CAAE 41240815.3.0000.5558 (ANEXO 1).

As amostras de biópsias foram selecionadas por conveniência no período de março de 2014 a abril de 2016. O número de amostras selecionadas para a pesquisa foi definido de acordo com Pereira (2011), em que especifica que as amostras foram usadas intencionalmente e não se busca a generalidade de resultados, mas investigar melhor as situações estudadas. A coleta foi realizada nos arquivos do Laboratório de Imunopatologia de Brasília, sob a responsabilidade técnica da Dr.<sup>a</sup> Raquel Pedrosa Ferreira Moreira, CRM-DF 9284.

Foram selecionadas amostras dos seguintes casos: (i) 25 casos de Gastrite Inativa do Antro (GIA); (ii) 26 casos de Gastrite Ativa Leve de Antro (GALA); (iii) 22 casos de Gastrite Ativa Moderada de Antro (GAMA); e (iv) 14 casos de adenocarcinoma gástrico (AG). Os casos foram analisados e classificados de acordo com a presença ou não de atividade inflamatória, intensidade do infiltrado inflamatório, formações de agregados linfóides ou hiperplasia linfóide folicular e presença ou ausência da bactéria *H. pylori*.

Os critérios para inclusão das amostras no estudo foram: 1) casos de gastrite e adenocarcinoma gástrico associada ou não à bactéria *H. pylori*, confirmado por meio de técnicas de rotinas hematoxilina e eosina (HE) e/ou métodos de imunohistoquímica; 2) laudos bem preenchidos, segundo os critérios do Laboratório de Imunopatologia de Brasília; 3) blocos parafinizados em bom estado de conservação e tecido íntegro. Como critérios de exclusão, foram considerados: 1) blocos defeituosos que impossibilitassem a análise; 2) casos com laudos mal preenchidos; 3) casos de pacientes que tenham sido submetidos a tratamentos prévios

(radioterapia e/ou quimioterapia); 4) casos de AG recidivantes; e 5) presença de outras malignidades no prazo de 5 anos antes do diagnóstico.

### **3.2 Processamento histológico das amostras**

O processamento histológico das amostras foi realizado no Laboratório de Imunopatologia de Brasília/DF em que, a partir das amostras emblocadas em parafinas foram obtidos cortes consecutivos de 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura e colocados sobre lâminas de vidro. Os diagnósticos foram confirmados, por procedimento às cegas, por dois patologistas por meio da técnica de HE.

### **3.3 Técnica imunohistoquímica**

A avaliação da expressão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e de *H. pylori* foi realizada por imunohistoquímica, utilizando-se o Kit *MACH4 Universal HRP-Polymer Detection System (Polymer Detection; Universal Blocker; DAB Chromogen)*, do fabricante BIOCARE Medical, ISO 9001 & 13485 CERTIFIED.

Após a seleção prévia das amostras, os tecidos foram desparafinizados em três banhos de xilol, por 10 minutos cada, e depois hidratados por submersão em álcool etílico em concentrações decrescentes, partindo-se de álcool absoluto, álcoois a 95% e a 70%, em banho de dois minutos cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em solução de Tris Buffered Saline (TBS), incubadas em solução de Citrato (pH 6,0) e colocadas em banho-maria digital (DeLeo), à temperatura de 95°C, por 30 minutos, para recuperação antigênica dos epítomos alvos. Após resfriamento progressivo, em temperatura ambiente por 10 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em TBS e incubadas em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%, por 30 minutos, para o bloqueio da peroxidase

endógena tecidual para evitar possíveis falso-positivos. As lâminas foram lavadas, secas cuidadosamente e os cortes foram demarcados com a caneta hidrofílica. Em seguida, procedeu-se a incubação com o *background sniper* (Biocare Medical), por 10 minutos, para bloqueio de proteínas inespecíficas, como por exemplo, crescimento de fungos. Posteriormente, retirou-se o excesso da solução e as lâminas foram incubadas por 18 horas com o anticorpo primário monoclonal anti-CD8 a concentração 1:200 (C8/144B, Dako) e anticorpos primários policlonal anti-*H. pylori* a concentração 1:200 (Dako/Carpinteria, CA) em câmara úmida à temperatura de 4° C.

Após incubação com anticorpo primário, as lâminas foram lavadas três vezes em TBS e incubadas com *MACH 4 Mouse Probe* (Biocare Medical) e em seguida, com o polímero *MACH 4 MR HRP-Polymer* (Biocare Medical) por 30 minutos cada em temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada com diaminobenzidina – DAB (Biocare Medical) por 10 minutos. Para finalizar, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina por 50 segundos, montadas e observadas em microscópio óptico. Como controle positivo, foram utilizados cortes de amígdala e para controle negativo foram utilizados os cortes dos casos de GIA, GALA, GAMA e AG sem a adição de anticorpo primário.

Abaixo, representando na figura 4, está o esquema de como desenvolveu-se a técnica de imunohistoquímica.



Figura 4 - Esquema de como desenvolveu-se a técnica de imunohistoquímica.

### 3.4 Quantificação de células

Para realização da morfometria de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, as amostras foram fotografadas, utilizando-se câmera digital “*Leica DMC 2900*” acoplada ao microscópio óptico e *software “Leica Application Suite, Version 4.4.0”*.

Para a quantificação, foi realizada uma varredura inicial das lâminas na objetiva de 10x para seleção de áreas a serem fotografadas. Aleatoriamente, foram selecionados 5 campos fotografados na objetiva de 40x (CHEN et al., 2011) de modo que eles representassem a totalidade do corte (CARMO et al., 2016). As células imunopositivas foram visualizadas, marcadas e contadas com o auxílio do sistema analisador de imagens *Image j 1.32j (National Institute of Health, USA)*. Para a obtenção da densidade de células de cada caso, dividiu-se o número de células contadas pelo valor da área total fotografada.

### 3.5 Análises estatísticas dos dados

A análise estatística foi realizada por meio do *software SPSS*, versão 18 (Chicago, Illinois). Para análise de associação entre os parâmetros avaliados, foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson. Para verificar se as distribuições das amostras eram normais ou não, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram avaliadas pelo teste “t” de *Student* para comparação de dois grupos e ANOVA para comparação de mais de dois grupos seguidos pelo teste de Tukey. As variáveis com distribuição não normal foram avaliadas pelo teste de Mann Whitney para comparação de dois grupos ou Kruskal Wallis para comparação de mais de dois grupos seguidos pelo teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ . Os gráficos serão apresentados com média  $\pm$  epm (erro padrão da média).

### **3.6 Considerações éticas**

Os materiais analisados foram provenientes de cirurgias para a remoção das lesões estudadas. Desta forma, a pesquisa não acarretou em riscos físicos para os pacientes e suas identificações foram mantidas em total confidencialidade, sendo identificados por códigos numéricos. Da mesma maneira, será mantido sigilo na divulgação e publicação dos dados. Os benefícios gerados pela pesquisa não serão direitos e nem usufruídos pelos sujeitos participantes, mas os resultados poderão servir como base para estudos futuros.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados epidemiológicos

Analisaram-se 87 casos, dos quais 22 (25,3%) foram de GIA, 26 (29,9%) de GALA, 25 (28,7%) de GAMA e 14 (16,1%) de AG. Em relação à distribuição por gênero, observou-se que dos 73 casos de pacientes portadores de gastrite, 52 (71,2%) foram mulheres e 21 (28,8%) homens. No que se refere aos pacientes portadores de AG, 4 (28,6%) foram mulheres e 10 (71,4%) homens. Os dados clínicos relativos aos casos analisados estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das amostras quanto aos tipos de casos clínicos e sexo.

Dados clínicos	GIA	GALA	GAMA	AG
	(n=22)	(n=26)	(n=25)	(n=14)
	n%	n%	n%	n%
<b>Sexo</b>				
Feminino	68,2(15)	69,2 (18)	76 (19)	28,6 (4)
Masculino	31,8(7)	30,8 (8)	24(6)	71,4(10)

### 4.2 Análise cruzada dos dados clínico-patológicos

A análise cruzada foi realizada para verificar se havia associação entre as variáveis: tipos de gastrite (GIA, GALA e GAMA) e sexo (GRÁFICO 1) e AG e sexo (GRÁFICO 2). Em todos os tipos de gastrites, observou-se uma predominância de pacientes do sexo feminino (64,3%). No entanto, quando analisados os dados clínicos de pacientes portadores de AG, verificou-se uma predominância em paciente do sexo masculino (71,4%) nas amostras avaliadas. Assim, infere-se que há associação significativa entre as duas variáveis ( $p=0,021$ ; valor  $p < 0,05$ ).

Em relação a diferença de densidade média de linfócitos T C8<sup>+</sup> nos casos de GIA, GALA, GAMA e AG para os indivíduos do sexo masculino e feminino, conclui-se que não há diferença significativa entre as médias populacionais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> para os indivíduos conforme o sexo ( $p=0,86$ ; valor  $p>0,05$ ):

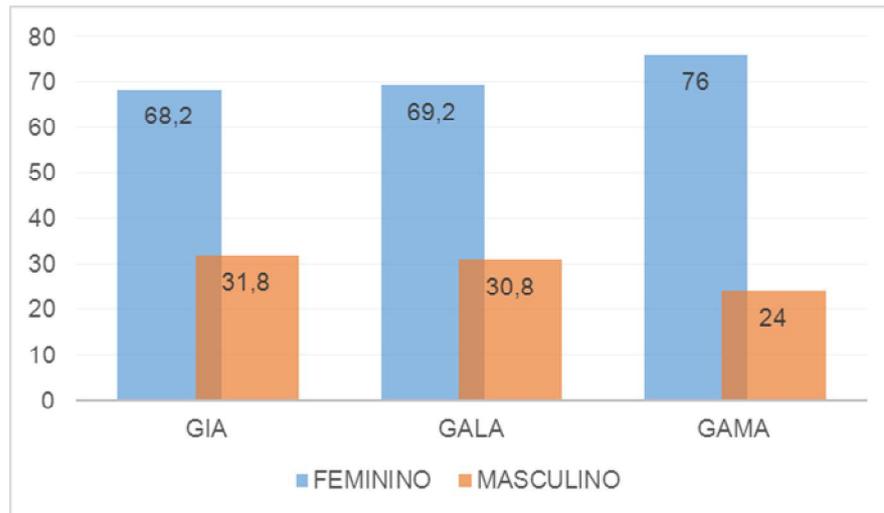


Gráfico 1 - Representação gráfica das amostras de gastrites associadas ao sexo

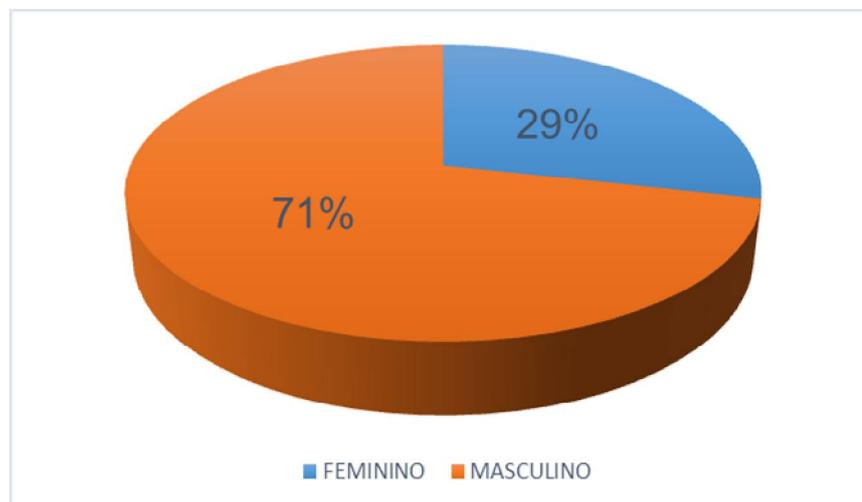


Gráfico 2 - Representação gráfica das amostras de AG associadas ao sexo

### 4.3 Avaliação histopatológica

Em relação à análise histopatológica das amostras selecionadas, observou-se que 100% dos casos de gastrite (GIA, GALA e GAMA) e 21,4% dos casos de AG apresentaram hiperplasia foveolar.

A presença de alargamento da lâmina própria ocorreu em 100% dos casos de gastrite. Observou-se também um aumento da população de células mononucleares e ausência de lesão do epitélio de revestimento glandular em 100% dos casos de GIA. Já em GALA observou-se um infiltrado de células inflamatórias mono e polimorfonucleares de intensidade leve. Em relação aos eventos de GAMA, 100% apresentaram características observadas nos episódios de GALA, porém, com atividade moderada ou acentuada do infiltrado inflamatório da lâmina própria, com presença de lesão do epitélio de revestimento glandular e formação de microabcessos.

Em complementariedade aos resultados anteriores, os acúmulos linfóides foram observados em 05 (22,7%) dos casos de GIA, 20 casos (76,9%) de GALA e 10 casos (40%) de pacientes portadores de GAMA. Não foram relatados casos de acúmulos linfóides em pacientes portadores de AG.

Em relação a Hiperplasia folicular linfóide (HFL), foi possível observar que não ocorreu nos casos de GIA, mas foi observada em 10 casos (38,5%) de GALA, 20 (40%) de GAMA e em um caso (7,1%) de AG.

### 4.4 Avaliação por imunohistoquímica para a presença de *H. pylori* nas amostras gástricas

A avaliação imunohistoquímica para a presença de *H. pylori* revelou ausência de bacilos nas amostras de gastrite inativa, na gastrite ativa leve e no adenocarcinoma gástrico. Nos casos de gastrite ativa moderada/acentuada, foram observados bacilos imunopositivos com leve

(+ /++++) (08 casos), moderada (++ /++++) (08 casos) e acentuada (+++ /++++) (09 casos).

#### 4.5 Avaliação imunohistoquímica da densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nas amostras gástricas

A avaliação imunohistoquímica para a densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os grupos estudados, gastrite inativa e gastrite ativa leve, gastrite ativa moderada/acentuada e adenocarcinoma gástrico revelou diferença estatisticamente significativa entre a gastrite inativa e o carcinoma gástrico ( $p=0,012$ ; \*  $p<0,05$ ). Foi possível observar uma maior densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no carcinoma gástrico quando comparado com a gastrite inativa (GRÁFICO 3).

Na figura 5, é possível observar as fotomicrografias das reações imunohistoquímica, em que se evidenciam as diferenças na expressão imunohistoquímica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos casos de gastrites (GIA, GALA e GAMA) e no AG.

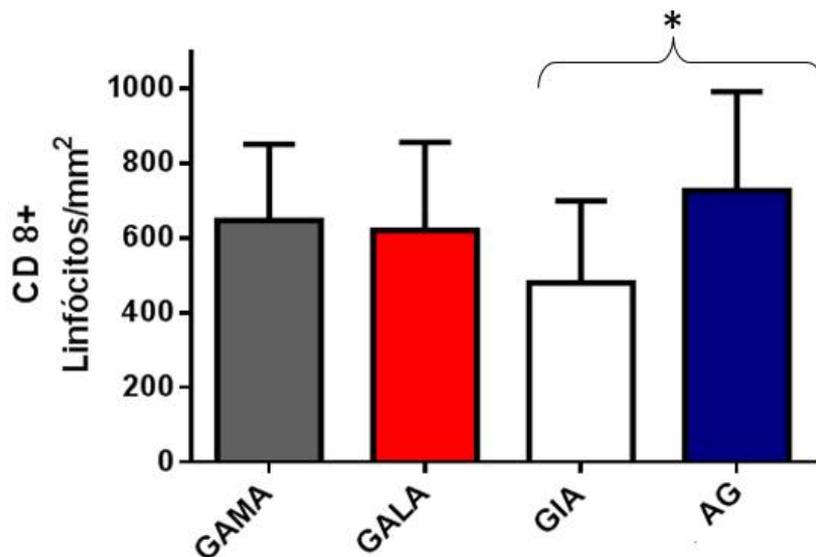


Gráfico 3 - Comparação da densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre os grupos de pacientes com gastrite ativa moderada/acentuada de antro (GAMA), gastrite ativa leve de antro (GALA), gastrite inativa de antro (GIA) e adenocarcinoma gástrico (AG)

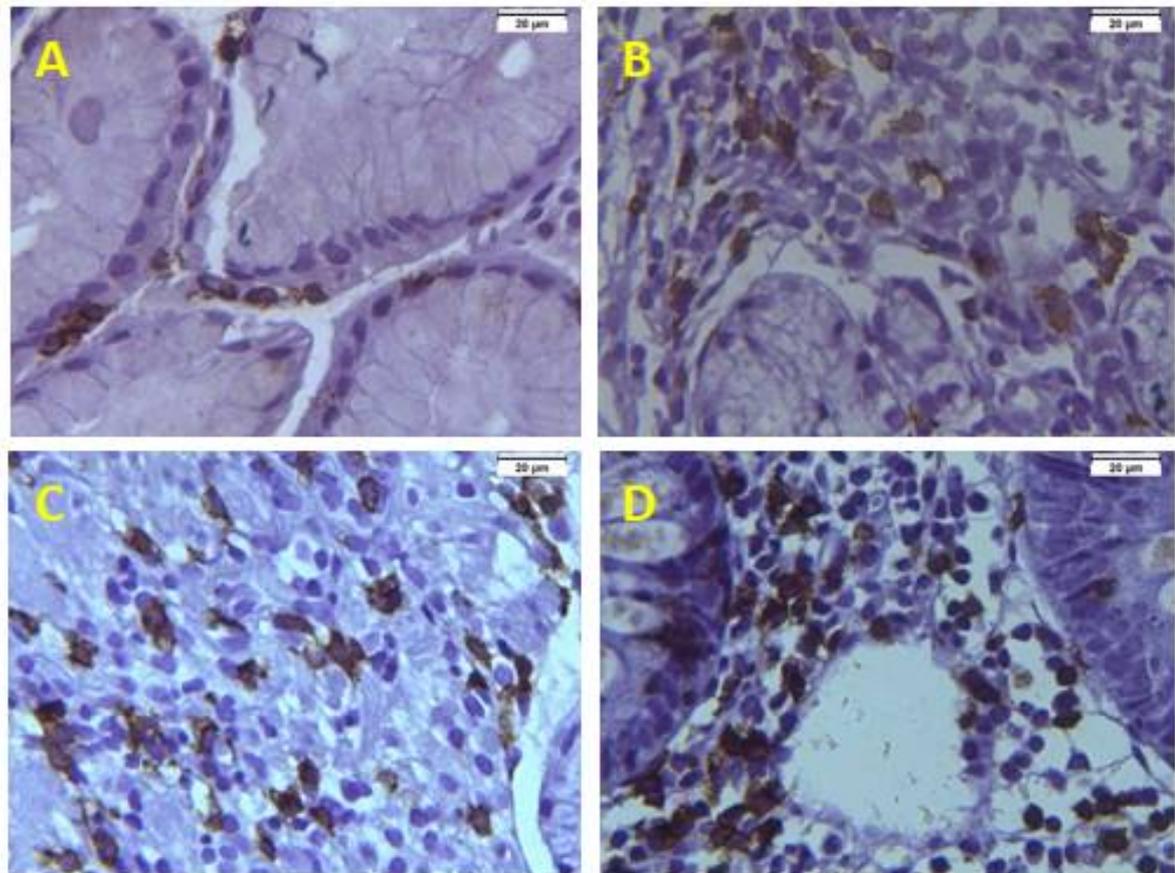


Figura 5 - Fotomicrografia das imunomarcações de Linfócitos T CD8<sup>+</sup> em aumento de 40x: A) GIA; B) GALA; C) GAMA; D) AG. A imunomarcações para Linfócitos T CD8<sup>+</sup> pode ser vista em contorno marrom, com maior número nos casos de AG quando comparado aos demais casos

#### 4.6 Comparação entre a densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a quantidade de *Helicobacter pylori*

Ao comparar a quantidade de bacilos de *H. pylori* entre os casos de gastrite ativa moderada/acentuada, foi possível observar uma correlação positiva e estatisticamente significativa (\*rS= 0,67; p≤0,001), como observa-se no gráfico 4.

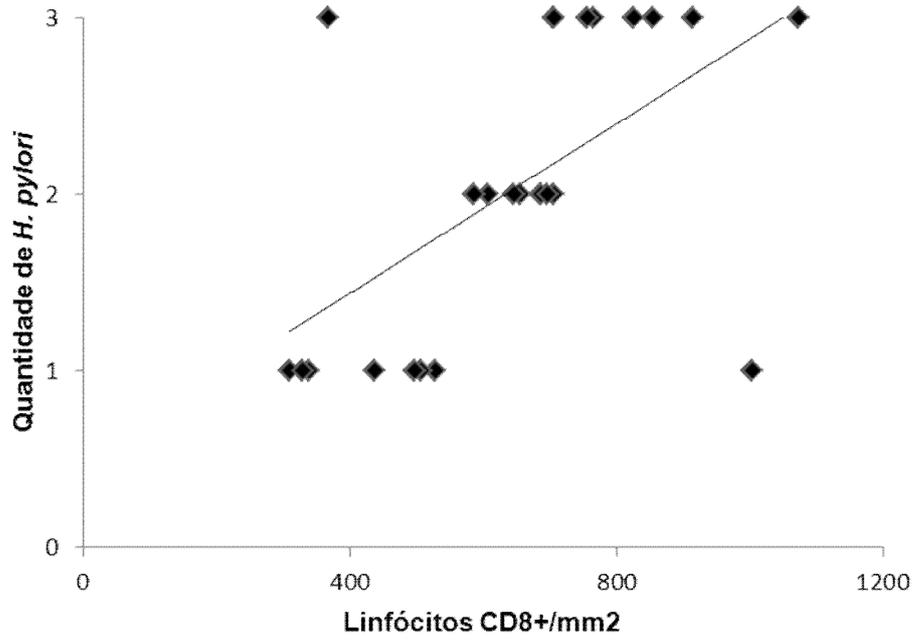


Gráfico 4 - Correlação entre densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a quantidade de *H. pylori* nos pacientes com GAMA

## 5 DISCUSSÃO

Buscou-se avaliar correlações entre a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, gastrites e adenocarcinomas gástricos de pacientes portadores ou não de infecção pelo *H. pylori*. A descoberta do *H. pylori* e a análise de sua relação com as alterações inflamatórias das mucosas digestivas têm sido objeto de vários estudos. Muitos apontam relação entre esta bactéria e ampla variabilidade de doenças gastroduodenais, modificando o entendimento da fisiopatologia que as produz (BLASER & BERG, 2001; FUKUDA et al., 2000).

Nos casos analisados neste estudo, houve uma predominância de pacientes do sexo feminino (71,2%) com diagnósticos de gastrite e predominância de paciente do sexo masculino nos casos de AG, sugerindo-se associação significativa entre essas duas variáveis (sexo/gastrite e sexo/AG). Embora, em um estudo realizado por Siqueira et al. (2007), foi demonstrado uma contradição com os resultados aqui encontrados, qual seja, foi comprovado que a gastrite apresenta-se igualmente em ambos os sexos, no entanto, foi relatado em outro estudo, realizado por Mata et al. (2016), uma possível associação entre gastrite e o gênero, corroborando com os dados aqui encontrados. Já para os dados clínicos de pacientes portadores de AG, nos estudos de Adu-Aryee et al. (2016), observou-se maior prevalência de pacientes do sexo masculino com diagnóstico de câncer gástrico e portadores de *H. pylori* com proporção de 3:1 se comparada à prevalência no sexo feminino. Outro estudo também apontou associação significativa entre o câncer gástrico e gênero, observando que homens são mais frequentemente afetados (WATANABE et al., 1997), semelhante com os dados aqui encontrados.

No presente estudo, foi verificado que a presença de bacilos de *H. pylori* está associada a uma resposta inflamatória progressiva da mucosa gástrica com a presença de células inflamatórias polimorfas e mononucleares. O *H. pylori* promove a migração de leucócitos para a mucosa gástrica com a participação de mediadores químicos, citocinas e quimiocinas, comprovando assim a importância da inflamação no controle

dessa afecção (BROIDE et al., 2007; FARAH & KHAMISY-FARAH, 2014; FEHLINGS et al., 2012). À medida que essas lesões eram mais intensas, verificou-se a correlação positiva com a quantidade de bacilos. Desta forma, tais resultados confirmam a capacidade dessa bactéria em promover resposta inflamatória da mucosa gástrica.

Graham et al. (2004) e Molnar et al. (2010) mostraram que geralmente nesse processo de atividade inflamatória dois outros elementos podem estar presentes: (i) a observação de linfócitos dispostos em agregados inflamatórios e folículos linfóides bem definidos e com centros germinativos proeminentes; (ii) a ocorrência de formas bacilares do *H. pylori*, tanto no revestimento epitelial superficial envolvendo as foveolas como no revestimento epitelial glandular.

Outro dado relevante foi caracterizarem-se por hiperplasia foveolar, observado em 100% dos casos investigados de GIA. Os resultados obtidos neste estudo estão em conformidade com dados obtidos com outros pesquisadores, em que se pode observar que com o avanço da doença, ao longo de muitos anos, as reações inflamatórias estendem-se para dentro da camada glandular da mucosa com uma destruição progressiva das glândulas especializadas. Ao longo do tempo, a mucosa é substituída por uma mistura de áreas de hiperplasia foveolar e proeminente metaplasia glandular pilórica. Casos que indicam uma perda completa das glândulas especializadas e uma inflamação mínima representam, provavelmente, a fase final da doença (GOLDMAN & KRANZ, 1998; KRASINSKAS et al., 2003; TORBENSON et al., 2002).

Notou-se que em 100% dos casos de GIA analisados, todos apresentaram celularidade mononuclear aumentada com o alargamento de lâmina própria, igualmente apresentado nos estudos de Fukuda et al. (2000) e Warren e Marshall (1983) que mostraram resultados semelhantes aos deste estudo, em que a mucosa gástrica dos pacientes apresentaram atividade inflamatória em gastrites ativa ou inativa. Os quadros de gastrite inativa decorrem de estímulos inflamatórios prévios da mucosa, os quais a partir da eliminação do estímulo determinam um quadro caracterizado pelo alargamento da lâmina própria. Esse alargamento é caracterizado pelo edema e aumento da população celular habitual desse compartimento, em que são identificados histiócitos, plasmócitos e linfócitos. Já nos casos de

GALA e GAMA, além da presença de células mononucleares, apresentam células polimorfonucleares, tendo maior intensidade nos casos de GAMA. Neste último, ainda foi observada a presença de células inflamatórias em contato com as células de revestimento epitelial glandular, formando microabcessos nessas estruturas. Com o aumento da população de células mono e polimorfonucleares, os leucócitos polimorfonucleares foram as células efetoras da atividade lesiva do epitélio glandular. Bedoya et al. (2003) demonstraram que a resposta celular inclui uma resposta não específica inata representada principalmente por células polimorfonucleares e macrófagos.

A infecção pela *H. pylori* é a principal causa de gastrite crônica ativa (ASHORN, 1995; KAWAGUCHI et al., 1996) e estudos sugerem que esse agente desempenha importante papel na gênese da úlcera péptica (RAUWS & TYTGAT, 1990). Pacientes com *H. pylori* positivo apresentaram risco 10 vezes maior de desenvolverem algum grau de lesão da mucosa gástrica do que aqueles com ausência (MULLER et al., 2007). Segundo Méndez-Tenorio et al. (2014), essa bactéria está presente em 95% dos casos de gastrite ativa moderada, localizada no antro e em 65% dos casos de GIA. Conforme Nogueira et al. (2001), existem bacilos em situações de gastrite inativa, assim como na mucosa normal. Essa situação pode estar associada tanto à cepa bacilar envolvida, assim como a intensidade da infecção presente na mucosa gástrica. Ao comparar com os dados apresentados nesta dissertação, observou-se ausência de bacilos nas amostras de GIA e também nas amostras de GALA e AG, mostrando-se contraditória a esses dados citados na literatura.

De acordo com dados da literatura, o *H. pylori* pode induzir uma série de alterações morfológicas com diferentes expressões clínicas: gastrite, úlcera gástrica, metaplasia intestinal, alterações displásicas e neoplasias (CHERDANTSEVA et al., 2014; MULLER et al., 2007), no entanto a maioria dos portadores dessa infecção permanece assintomática (LADEIRA et al., 2003). A diversidade de manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo *H. pylori* está associada a fatores ambientais, bacterianos e do hospedeiro, de acordo com Marshall et al. (1990). Esses resultados foram obtidos a partir da indução de infecção pelo *H. pylori* em indivíduos saudáveis. Os estudos histopatológicos demonstram que as lesões da mucosa gástrica, na

infecção pelo *H. pylori*, são determinadas por células inflamatórias que migram dos vasos sanguíneos para a lâmina própria e a lesão do epitélio de revestimento glandular resulta da liberação de antígenos SABA e HP-NAP (proteína ativadora de neutrófilos) do bacilo. Essa migração celular ocorre em resposta à IL-8, via receptores das quimiocinas CXCR1 e CXCR2 (BÄCKHED et al., 2003; SCHMAUSSER et al., 2004). Se por um lado existe comprovação da participação de antígenos do *H. pylori* na migração de leucócitos, por meio de citocinas, por outro lado, não foi estabelecida a eficiência desta via na erradicação dos bacilos, que muitas vezes permanecem latentes. Estudos recentes mostram que uma das explicações para manutenção da colonização da mucosa pelo *H. pylori* é a capacidade da bactéria inibir os receptores das quimiocinas CXCR1 e CXCR2 e consequentemente reduzir a migração dos leucócitos polimorfonucleares. Sendo assim, é possível observar sua permanência na mucosa gástrica, apresentando assim a complexidade da patogenia das manifestações clínicas em decorrência da infecção pela *H. pylori* (ALGOOD & COVER, 2006; BÄCKHED et al., 2003; SCHMAUSSER et al., 2004).

No presente trabalho, além dos leucócitos polimorfonucleares, o infiltrado inflamatório observado na lâmina própria, nos quadros de gastrite ativa, em decorrência da colonização pelo *H. pylori*, também apresenta macrófagos e linfócitos em quantidades variadas. Os macrófagos exercem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos (FEHLINGS et al., 2012; MAI et al., 1991; MILLS et al., 2000; MOOS et al., 2010), cujo contato resulta na produção e secreção de substâncias capazes de promover resposta microbicida, contudo, ao interagir com o *H. pylori*, verifica-se o bloqueio da produção de óxido nítrico em decorrência da presença de arginase liberada pelo bacilo (ALGOOD & COVER, 2006). Estes achados mostram a complexidade da resposta inflamatória contra esse bacilo. Considerando ainda que macrófagos empregam a produção de óxido nítrico como uma das principais vias em sua atividade microbicida. Paradoxalmente sua interação com o *H. pylori* promove a inibição de síntese desses mediadores, resultando na manutenção dos bacilos na mucosa gástrica, portanto eventos da resposta inflamatória, além de contribuírem para a

eliminação desse patógeno, podem participar de eventos que facilitam a perpetuação da infecção (BUSSIÈRE et al., 2005).

Juntamente com os leucócitos polimorfonucleares e com os mononucleares fagocíticos, monócitos e macrófagos, verificou-se que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também estão presentes. Na medida em que ocorreu intensificação da resposta inflamatória, na mucosa do antro gástrico, houve também aumento progressivo desses linfócitos. Nas amostras de gastrite ativa moderada/acentuada, observou-se também uma correlação positiva e significativa entre a quantidade de bacilos de *H. pylori* e a densidade de linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Esse resultado demonstra que, além da resposta inflamatória ao *H. pylori*, na mucosa gástrica, há o estabelecimento de eventos da resposta imune, como descrito na literatura (CHEN et al., 2011; JANG, 2009; KRONSTEINER et al., 2014). Resta saber se o mesmo teria papel modulador da inflamação e eliminação da bactéria. Neste sentido, estudos clínicos enfatizam a relevância dos linfócitos T na gravidade da infecção pela *H. pylori*, bem como no controle das gastrites.

Já, especificamente, em relação aos adenocarcinomas gástricos avaliados, apresentam-se discreto infiltrado inflamatório de leucócitos, ausência de *H. pylori* e elevada densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que foi estatisticamente significativo quando comparado com a gastrite inativa. Muito embora um elevado percentual dos indivíduos infectados pela *H. pylori* mantenham-se assintomáticos, boa parte dos infectados apresentam diferentes manifestações gástricas, inclusive presença do câncer gástrico (AXON, 2014; UNO et al., 2016; YAN et al., 2014). A correlação entre *H. pylori* e câncer são precedidos por eventos inflamatórios (BRESCIANI et al., 2011; BARBOSA & SCHINONNI, 2011). Resultados controversos foram encontrados aqui, enfatizando a ausência de *H. pylori* nos casos de adenocarcinoma gástrico.

Estudos epidemiológicos confirmaram risco aumentado em até 6 vezes para o desenvolvimento de AG em indivíduos infectados pelo *H. pylori* (BRENNER et al., 2000; THE EUROGAST STUDY GROUP, 1993; FORMAN et al., 1991; PARSONNET et al., 1991). Cerca de 2 milhões de novos casos de câncer a cada ano em todo o mundo são atribuíveis a esse tipo de infecções (MARTEL et al., 2012). A resposta inflamatória, em geral, pode

necessitar de eventos moduladores com a participação de diferentes subpopulações de linfócitos, como os linfócitos T CD8 (AMEDEI et al., 2012). Nos resultados aqui encontrados, fica evidente a participação dessas células quando foi verificado seu aumento progressivo na medida em que a infecção evoluiu de inativa para ativa e ainda com o aumento da intensidade da inflamação. Desta forma, pode-se considerar que tanto no estudo aqui realizado quanto nos gerais, o *H. pylori* é responsável por intensificar os efeitos da gastrite, tornando-os prevalentes no desenvolvimento de úlcera e câncer devido aos aspectos inflamatórios (AZEM et al., 2006). Assim, resta avaliar a participação de células T CD4 e da imunidade humoral na modulação da resposta inflamatória da mucosa gástrica ao *H. pylori*.

Sobre essa resposta imunoinflamatória, existem poucos estudos que examinaram o papel de células T CD8<sup>+</sup> em infecções causadas pelo *H. pylori*, no entanto os estudos relataram que essas células podem aumentar supostamente nos estômagos dos indivíduos infectados por aquele microrganismo (AGNIHOTRI et al., 1998). É possível que elas contribuam para indução patológica da doença, tal como foi demonstrado que a expressão de CD8 em crianças infectadas por essa bactéria tem correlação positiva com a gravidade da gastrite (AZEM et al., 2006; MACIORKOWSKA et al., 2004).

Outros resultados indicaram que as células T CD8<sup>+</sup> são os principais contribuintes para a gastrite e as células T CD4<sup>+</sup> exercem uma função reguladora dominante, limitando assim a gravidade da infecção. Tal associação foi realizada em outro estudo clínico em crianças e adultos, sugerindo que a associação entre a colonização da *H. pylori* com células T CD8<sup>+</sup> aumentou a predisposição ao desenvolvimento de úlceras gástricas (GRAHAM et al., 2004; HELMIN-BASA et al., 2011; KOTŁOWSKA-KMIEC et al., 2009). Além disso, pacientes com menor número de células Treg são mais propensos ao desenvolvimento de úlceras pépticas e são afligidos por gastrites mais intensas (ATHERTON, 2006).

Em todos os casos de câncer gástrico analisados, a densidade de células T CD8<sup>+</sup> foi elevada. A presença dessas células teria duas funções básicas: (i) atuariam como células T citotóxicas, promovendo em parte a eliminação dos bacilos; (ii) e a modulação da resposta inflamatória,

importante para o controle da infecção. Na primeira função, destaca-se a liberação de inúmeros antígenos do *H. pylori*, muitos desses responsáveis pelos eventos da migração celular e estabelecimento da resposta inflamatória, além dos mecanismos de transformação das células epiteliais da mucosa gástrica até o estabelecimento do adenocarcinoma (BARBOSA & SCHINONNI, 2011; AMEDEI et al., 2012).

Relatos na literatura demonstram transformações oncogênicas induzidas pelo *H. pylori* (ZORZETTO et al., 2012). Camundongos transgênicos com expressão de antígenos do *H. pylori* podem desenvolver vários tipos de neoplasias, inclusive câncer gástrico (OHNISHI et al., 2008). Ademais, encontra-se devidamente estabelecida a associação entre *H. pylori* e o linfoma tipo MALT (KUO & CHENG, 2013; SUZUKI et al., 2009), portanto, pode-se reafirmar que essa bactéria possui atividade carcinogênica (McNAMARA & EL-OMAR, 2008). A patogenia das neoplasias envolve mecanismos da imunidade. No presente caso, considera-se que com a progressão da infecção pelo *H. pylori* e o estabelecimento da resposta inflamatória, os linfócitos T CD8+ vão elevando-se e estão presentes nos casos de neoplasia.

## 6 CONCLUSÃO

Existiu uma predominância de pacientes do sexo feminino nos casos de gastrite e do sexo masculino nos de adenocarcinoma gástricos.

Houve a progressão da resposta inflamatória à colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*.

Identificaram-se mecanismos de migração celular, aparentemente associados à liberação de antígenos do bacilo no microambiente estabelecido no curso da infecção.

Foi possível correlacionar a quantidade de bacilos do *H. pylori* com a densidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos pacientes com diagnóstico de gastrite ativa moderada de antro.

Constatou-se a participação das células inflamatórias na erradicação de bacilos e a presença de linfócitos TCD8<sup>+</sup> que podem aparentemente exercer duas funções, tanto modular a inflamação, como participar de mecanismos oncogênicos.

Foi exequível comparar a densidade de linfócitos célula T CD8<sup>+</sup>, em gastrites e adenocarcinoma gástrico associadas ou não a infecções causadas pela bactéria *H. pylori*.

Convém melhor avaliar a correlação existente entre *H. pylori*, resposta inflamatória e a imunidade celular no estabelecimento do câncer gástrico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunity to tumors. In: Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2015. Chapter 18. p.383-97.

Adu-Aryee NA, Aabakken L, Dedey F, Nsaful J, Kudzi W. Comparison of endoscopic based diagnosis with *Helicobacter* urease test for *Helicobacter pylori* infection. BMC Res Notes. 2016 ago; 9(1): 421-6.

Agnihotri N, Bhasin DK, Vohra H, Ray P, Singh K, Ganguly NK. Characterization of lymphocytic subsets and cytokine production in gastric biopsy samples from *Helicobacter pylori* patients. Scand J Gastroenterol. 1998 jul; 33: 704-9.

Aguiar DCF, Corvelo TCO, Araújo M, Cruz EMD, Daibes S, Assumpção MBD. Expressão dos antígenos ABH e Lewis na gastrite crônica e alterações pré-neoplásica da mucosa gástrica. Arq Gastroenterol. 2002 out/dez; 39(4): 222-32.

Ahn HJ, Lee DS. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. World J Gastrointest Oncol. 2015 dez; 7(12): 455-65.

Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. Clin Microbiol Rev. 2006 out; 19(4): 597-613.

Alvarado-Esquivel C. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in pregnant women in rural Durango, Mexico. Int J Biomed Sci. 2013 dez; 9(4): 224-9.

Amedei A, Bella CD, Silvestri E, Prisco D, D'Elia MM. T cells in gastric cancer: friends or foes. Clin Dev Immunol. 2012 mar; 10 pages.

Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 2008 jan; 134(1): 306-23.

Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006 jan; 12(2): 181-6.

- Araf LN, Pereira CA, Machado RS, Raguza D, Kawakami E. *Helicobacter pylori* and iron-deficiency anemia in adolescents in Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 out; 51(4): 477-80.
- Ashorn M. What are the specific features of *Helicobacter pylori* gastritis in children? *Ann Med.* 1995 out; 27(5): 617-20.
- Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1997 jun. 40 (6): 701-3.
- Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006; 1: 63-96.
- Atkinson NS, Braden B. *Helicobacter pylori* infection: diagnostic strategies in primary diagnosis and after therapy. *Dig Dis Sci.* 2016 jan; 61(1): 19-24.
- Axon A. *Helicobacter pylori* and public health. *Helicobacter.* 2014 set; 19(Suppl 1): 68-73.
- Azem J, Svennerholm AM, Lundin BS. B cells pulsed with *Helicobacter pylori* antigen efficiently activate memory CD8<sup>+</sup> T cells from *H. pylori*-infected individuals. *Clin Immunol.* 2006 feb/mar; 118(2-3): 284-91.
- Bäckhed F, Torstensson E, Seguin D, Richter-Dahlfors A, Rokbi B. *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-8 receptor expression in the human gastric epithelium. *Infect Immun.* 2003 jun; 71(6): 3357-60.
- Barbosa JA, Schinonni MI. *Helicobacter pylori*: associação com câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. *R Ci Med Biol.* 2011 sep/dec; 10(3): 254-62.
- Bastos J, Peleteiro B, Pinto H, Marinho A, Guimarães JT, Ramos E, La Vecchia C, Barros H, Lunet N. Prevalence, incidence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a cohort of Portuguese adolescents (EpiTeen). *Dig Liver Dis.* 2013 apr; 45(4): 290-5.
- Bedoya A, Garay J, Sanzón F, Bravo LE, Bravo JC, Correa H, Craver R, Fonham E, Du JX, Correa P. Histopathology of gastritis in *Helicobacter pylori*-infected children from populations at high and low gastric cancer risk. *Hum Pathol.* 2003 mar; 34(3): 206-13.

Benajah DA, Lahbabi M, Alaoui S, El Rhazi K, El Abkari M, Nejjari C, Amarti A, Bennani B, Mahmoud M, Ibrahim SA. Prevalence of *Helicobacter pylori* and its recurrence after successful eradication in a developing nation (Morocco). Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2013 nov; 37(5): 519-26.

Black JG. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.589-92.

Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest. 2004 feb; 113(3): 321-33.

Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest. 2001 apr; 107(7): 767-73.

Brenner H, Arndt V, Stürmer T, Stegmaier C, Ziegler H, Dhom G. Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. Cancer. 2000 jan; 88(2): 274-9.

Bresciani C, Latif I, Coser RB, Yagi O, Deutsch CR, Mucerino D, Zilberstein B, Cecconello I. Determinação histopatológica da presença do helicobacter pylori em câncer gástrico. Arq Bras Cir Dig. 2001 jan/mar; 24(1): 59-63.

Broide E, Sandbank J, Scapa E, Kimchi NA, Shapiro M, Lerner A. The immunohistochemistry profile of lymphocytic gastritis in celiac disease and *Helicobacter pylori* infection: interplay between infection and inflammation. Mediators Inflamm. 2007 jan; 6 pages.

Bürguers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller KA, Lehn N, Schmalz G, Ruhl S. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. Eur J Oral Sci. 2008 aug; 116(4): 297-304.

Bussi re FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA Jr, Wilson KT. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. J Biol Chem. 2005 jan; 280(4): 2409-12.

Calvet X, Ramirez-L zaro MJ, Lehours P, M graud F. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2013 sep; 18(Suppl 1): 5-11.

Carmo NGD, Sakamoto LH, Pogue R, Mascarenhas CDC, Passos SK, Felipe MS, Andrade RVD. Altered expression of PRKX, WNT3 and WNT16 in human nodular basal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2016 sep; 36(9): 4545-51.

Carvalho AS. Peptic ulcer. *J Pediatr.* 2000 jul; 76(Suppl 2): S127-34.

Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, Ewoldt RH, Mckinley GH, So P, Erramilli S, Bansil R. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucus viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am.* 2009 sep; 106(34): 14321-6.

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am.* 1996 dec; 93(25): 14648-53.

Chen JG, Xia JC, Liang XT, Pan K, Wang W, Lv L, Zhao JJ, Wang QJ, Li YQ, Chen SP, He J, Huang LX, Ke ML, Chen YB, Ma HQ, Zeng ZW, Zhou ZW, Chang AE, Li Q. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *Int J Biol Sci.* 2011 jan; 7(1): 53-60.

Cherdantseva LA, Potapova OV, Sharkova TV, Belyaeva YY, Shkurupy VA. Association of *Helicobacter pylori* and iNOS production by macrophages and lymphocytes in the gastric mucosa in chronic gastritis. *J Immunol Res.* 2014 sep; 4 pages.

Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1995; 19(Suppl 1): 37-43.

Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JI. Mucosal tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut.* 1991 dec; 32(12): 1473-7.

Cunha ARB, Areias JAAP. Cancro gástrico e *Helicobacter pylori* [Internet]. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar/Universidade do Porto; 2010 [citado em 2016 Nov 27]. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/52733/2/CANCRO%20GSTRICO%20E%20HELICOBACTER%20PYLORI.pdf>

Dacol C, Balter H, Varela L, Buenavida G, González N, Silveira A, Cohen H. Evolución de la respuesta al tratamiento de primeira línea de la infección por *Helicobacter pylori* em Uruguay. Acta Gastroenterol Latinoam. 2014 jun; 44(2): 88-93.

Ddine LC, Ddine CC, Rodrigues CCR, Kirsten VR, Colpo E. Fatores associados com a gastrite crônica em pacientes com presença ou ausência do *Helicobacter pylori*. Arq Bras Cir Dig. 2012 apr/jun; 25(2): 96-100.

De DD; Roychoudhury S. To be or not to be: the host genetic factor and beyond in *Helicobacter pylori* mediated gastro-duodenal diseases. World J Gastroenterol. 2015 mar; 21(10): 2883-95.

Den Hollander WJ, Holster IL, Den Hoed CM, Van Deurzen F, Van Vuuren AJ, Jaddoe VW, Hofman A, Perez Perez GI, Blaser MJ, Moll HA, Kuipers EJ. Ethnicity is a strong predictor for *Helicobacter pylori* infection in young women in a multi-ethnic European city. J Gastroenterol Hepatol. 2013 nov; 28(11): 1705-11.

Dorji D, Dendup T, Malaty HM, Wangchuk K, Yangzom D, Richter JM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Bhutan: the role of environment and geographic location. Helicobacter. 2014 feb; 19(1): 69-73.

Eaton KA, Mefford M, Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. J Immunol. 2001 jun; 166(12): 7456-61.

Egan B, O'Morain CA. A historical perspective of *Helicobacter pylori* gastroduodenitis and its complications. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007 feb; 21(2): 335-46.

Esteller M, Herman J. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol. 2002 jan; 196(1): 1-7.

Farah R, Khamisy-Farah R. Association of neutrophil to lymphocyte ratio with presence and severity of gastritis due to *Helicobacter pylori* infection. J Clin Lab Anal. 2014 may; 28(3): 219-23.

Fashner J, Gitu AC. Diagnosis and treatment of peptic ulcer disease and *H. pylori* infection. Am Fam Physician. 2015 feb; 91(4): 236-42.

Fehlings M, Drobbe L, Moos V, Viveros PR, Hagen J, Beigier-Bompadre M, Pang E, Belogolova E, Churin Y, Schneider T, Meyer TF, Aebischer T, Ignatius R. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. *Infect Immun*. 2012 aug; 80(8): 2724-34.

Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 mar; 25(3): 479-86.

Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*. 1991 jun; 302(6788): 1302-05.

Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN, Nagler-Anderson C. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med*. 2000 may; 6(5): 536-42.

Fukuda S, Tanaka M, Soma Y, Shimoyama T, Mikami T, Crabtree JE, Saito H, Munakata A, Yoshida Y. Histological analysis of gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with early gastric cancer: a case-control study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 dec; 15(12): 1370-6.

Godoy APO, Miranda MCB, Paulino LC, Mendonça S, Ribeiro ML, Pedrazzoli Jr J. Análise das impressões digitais de DNA e de fatores de virulência de linhagens de *Helicobacter pylori*. *Arq. Gastroenterol*. 2007 abr/jun; 44(2): 107-12.

Goldman BS, Kranz RG. Evolution and horizontal transfer of an entire biosynthetic pathway for cytochrome c biogenesis: helicobacter, deinococcus, archae and more. *Mol Microbiol*. 1998 feb; 27(4): 871-3.

Graham DY, Opekun AR, Osata MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*. 2004 sep; 53(9): 1235-43.

Gustafson J, Welling D. "No acid, no ulcer"- 100 years later: a review on the history of peptic ulcer disease. *J Am Coll Surg*. 2010 jan; 210(1): 110-6.

Hajimahmoodi M, Shams-Ardakani M, Saniee P, Siavoshi F, Mehrabani M, Hosseinzadeh H, Foroumadi P, Safavi M, Khanavi M, Akbarzadeh T, Shafiee A, Foroumadi A. In vitro antibacterial activity of some iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Nat Prod Res*. 2011 jul; 25(11): 1059-66.

Hanafi MI, Mohamed AM. *Helicobacter pylori* infection: seroprevalence and predictors among healthy individuals in Al Madinah, Saudi Arabia. J Egypt Public Health Assoc. 2013 apr; 88(1): 40-5.

Helmin-Basa A, Michalkiewicz J, Gackowska L, Kubiszewska I, Eljaszewicz A, Mierzwa G, Bala G, Czerwionka-Szaflarska M, Prokurat A, Marszalek A. Pediatric *Helicobacter pylori* infection and circulating T-lymphocyte activation and differentiation. Helicobacter. 2011 feb; 16(1): 27-35.

Hestvik E, Tylleskar T, Kaddu-Mulindwa DH, Ndeezi G, Grahnquist L, Olafsdottir E, Tumwine JK. *Helicobacter pylori* in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based cross sectional survey. BMC Gastroenterol. 2010 jun; 10(1): 62-70.

Hu Q, Zhang Y, Zhang X, Fu K. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori* infection: a review of current diagnosis and management. Biomark Res. 2016 jul; 4(15): 9 pages.

Huang Y, Yang M, Hu H, Zhao X, Bao L, Huang D, Song L, Li Y. Mitochondrial GRIM-19 as a potential therapeutic target for STAT3-dependent carcinogenesis of gastric cancer. Oncotarget. 2016 jul; 7(27): 41404-20.

Hunt RH, Malfertheiner P, Yeomans ND, Hawkey CJ, Howden CW. Critical issues in the pathophysiology and management of peptic ulcer disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1995 jul; 7(7): 685-99.

IARC The International Agency for Research on Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans). Lyon: World Health Organization; 1994. 270p.

INCA. Ministério da Saúde. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva –INCA; 2016 [citado em 2016 Nov 27]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 6th edition. Porto Alegre: Art Med; 2006. capítulo 10.

Jang TJ. The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. Pathol Res Pract. 2010 jan; 206(1): 34-8.

Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidienė D, Wang Y, Velapatiño B, Gilman RH, Parkinson AJ, Nair GB, Wong BC, Lam SK, Mistry R, Segal I, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Brea ML, Ito Y, Kersulyte D, Lee HK, Gong Y, Goodwin A, Hoffman PS, Berg DE. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2000 sep; 182(18): 5082-90.

Josenhans C, Suerbaum D. *Helicobacter* motility and chemotaxis. In: Achtman M, Suerbaum S. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham: Horizon Scientific Press; 2001. p.171-84.

Kang JM, Kim N, Lee DH, Park JH, Lee MK, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effects of genetic polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases in Korea. *J Clin Gastroenterol.* 2009 may/jun; 43(5): 420-8.

Kawaguchi H, Haruma K, Komoto K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. *Helicobacter pylori* infection is the major risk factor for atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol.* 1996 may; 91(5): 959-62.

Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen?. *Gut Pathog.* 2010 mar; 2(1): 12 pages.

Kong YJ, Yi HG, Dai JC, Wei MX. Histological changes of gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2014 may; 20(19): 5903-11.

Kotłowska-Kmieć A, Bakowska A, Szarszewski A, Kamicka B, Łuczak G, Radys W, Landowski P, Brodzicki J, Korzon M, Liberek A. *Helicobacter pylori* increases expression of proapoptotic markers Fas and FasL on CD4 lymphocytes in children. *Acta Biochim Pol.* 2009 jul; 56(3): 433-8.

Krasinskas AM, Abraham SC, Metz DC, Furth EE. Oxyntic mucosa pseudopolyps: a presentation of atrophic autoimmune gastritis. *Am J Surg Pathol.* 2003 feb; 27(2): 236-41.

Kroghfelt KA, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2005 set; 10: 5-13.

Kronsteiner B, Bassaganya-Riera J, Philipson N, Hontecillas R. Novel insights on the role of CD8<sup>+</sup> T cells and cytotoxic responses during *Helicobacter pylori* infection. *Gut Microbes.* 2014 may/jun; 5(3): 357-62.

Kuo SH, Cheng AL. *Helicobacter pylori* and mucosa-associated lymphoid tissue: what's new. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013 dec; 2013(1): 109-17.

Kusters JG, Van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006 jul; 19(3): 449-90.

Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. J Bras Patol Med Lab. 2003 dec; 39(4): 335-42.

Lee SY. Endoscopic gastritis, serum pepsinogen assay, and *Helicobacter pylori* infection. Korean J Intern Med. 2016 sep; 31(5): 835-44.

Lim SH, Kwon JW, Kim N, Kim GH, Kang JM, Park MJ, Yim JY, Kim HU, Baik GH, Seo GS, Shin JE, Joo YE, Kim JS, Jung HC. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Korea: nationwide multicenter study over 13 years. BMC Gastroenterol. 2013 jun; 13: 104-13.

Lin CC, Fang CL, Sun DP, Hseu YC, Uen YH, Lin KY, Lin YC. High expression of mitochondrial intermembrane chaperone TIMM9 represents a negative prognostic marker in gastric cancer. J Formos Med Assoc. 2016 oct; (16): 30202-9.

Longo DL, Fauci AS. Gastrenterologia e hepatologia de Harrison. 2th ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill; 2014. 600p.

Lopes AC. Clínica médica: diagnóstico e tratamento. v.2. São Paulo: Atheneu; 2013.

Lopes D, Nunes C, Martins MC, Sarmento B, Reis S. Eradication of *Helicobacter pylori*: past, present and future. J Control Release. 2014 sep; 189: 169-86.

Lv ZF, Wang FC, Zheng HL, Wang B, Xie Y, Zhou XJ, Lv NH. Meta-analysis: is combination of tetracycline and amoxicillin suitable for *Helicobacter pylori* infection? World J Gastroenterol. 2015 feb; 21(8): 2522-33.

Maciorkowska E, Kasacka I, Kondej-Muszynska K, Kaczmarek M, Kemon A. Cytotoxic lymphocytes (cd8<sup>+</sup>) in the antrum mucosa in children with chronic *Helicobacter pylori*-related inflammation before and after bacteria eradication. Rocznik Akad Med Białymst. 2004; 49(Suppl 1): 216-8.

Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 2002 jul; 297(5581): 573-8.

Mai UE, Perez-Perez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. *J. Clin. Invest.* 1991 mar; 87(3): 894-900.

Mana F, Vandebosch S, Miendje Deyi V, Haentjens P, Urbain D. Prevalence of and risk factors for *H. pylori* infection in healthy children and young adults in Belgium anno 2010/2011. *Acta Gastroenterol Belg.* 2013 dec; 76(4): 381-5.

Marcos-Pinto R, Carneiro F, Dinis-Ribeiro M, Wen X, Lopes C, Figueiredo C, Machado JC, Ferreira RM, Reis CA, Ferreira J, Pedroto I, Areias J. First-degree relatives of patients with early-onset gastric carcinoma show even at young ages a high prevalence of advanced OLGA/OLGIM stages and dysplasia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 jun; 35(12): 1451-9.

Marshall BJ, Barrett LJ, Prakash C, Mccallum RW, Guerrant RL. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology.* 1990 sep; 99(3): 697-702.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984 jun; 1(8390): 1311-5.

Martel CD, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012 jun. 13(6): 607-15.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 451-83.

Mata DR, Cordeiro Y, Lima FP, Silva TLN, Ceschini TL, Mendes CC, Bernardes CO, Andrade LC, Silva RBV, Ferreira EB. *Helicobacter pylori* e a gastrite: um estudo retrospectivo. *Rev Univ Vale Rio Verde.* 2016 ago/dez; 14(2): 696-706.

Mazzoleni LE, Mazzoleni F. Tratamento e retratamento do *Helicobacter pylori*. *Rev Bras Med.* 2010 may; 67(5): 153-64.

McNamara D, El-Omar E. *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of gastric cancer: a paradigm for host-bacterial interactions. *Dig Liver Dis.* 2008 jul; 40(7): 504-9.

Méndez-Tenorio A, Larios-Serrato V, Olguín-Ruiz GE, Sánchez-Vallejo CJ, Torres-López RC, Avilés-Jiménez F, Camorlinga-Ponce M, Torres J. Genome sequence of a *Helicobacter pylori* strain isolated from a mexican patient with intestinal gastric cancer. *Genome Announc.* 2014 jan/feb; 2(1): e01214-13.

Miendje Deyi VY, Vanderpas J, Bontems P, Van Den Borre C, De Koster E, Cadranel S, Burette A. Marching cohort of *Helicobacter pylori* infection over two decades (1988-2007): combined effects of secular trend population migration. *Epidemiol Infect.* 2011 apr; 139(4): 572-80.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000 jun; 164(12): 6166-73.

Mincis M. *Helicobacter pylori*: avanços e problemas. *Rev. Bras. Med.* 1999 jun; 56(6): 472-77.

Mincis M. *Helicobacter pylori*: vinte anos após sua redescoberta. *Rev. Bras. Med.* 2003 mar; 60(3): 97-100.

Misiewicz JJ. Current insights in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1995 jul; 7(7): 701-3.

Mobley HLT. *Helicobacter pylori* uréase. In: Achtman M, Suerbaum S, editors. *Helicobacter pylori*: molecular and cellular biology. Wymondham: Horizon Scientific Press; 2001. p.155-70.

Molnar B, Galamb O, Sipos F, Leiszter K, Tulassay Z. Molecular pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection: the role of bacterial virulence factors. *Dig Dis.* 2010 nov; 28(4-5): 604-8.

Monteiro JSDC, Oliveira SCPD, Reis Júnior JA, Gurgel CAS, Souza SCOMD, Pinheiro ALB, Santos JND. Effects of imiquimod and low-intensity laser ( $\lambda 660$  nm) in chemically induced oral carcinomas in hamster buccal pouch mucosa. *Lasers Med Sci.* 2013 may; 28(3): 1017-24.

Moos V, Schmidt C, Geelhaar A, Kunkel D, Allers K, Schinnerling K, Loddenkemper C, Fenollar F, Moter A, Raoult D, Ignatius R, Schneider T. Impaired immune functions of monocytes and macrophages in Whipple's disease. *Gastroenterology*. 2010 jan; 138(1): 210-20.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 dec; 8(12): 958-69.

Muller LB, Fagundes RB, Moraes CC, Rampazzo A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia. *Arq Gastroenterol*. 2007 apr/jun; 44(2): 93-8.

Murphy CC, Sandler RS, Sanoff HK, Yang YC, Lund JL, Baron JA. Decrease in incidence of colorectal cancer among individuals 50 years or older after recommendations for population-based screening. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016 sep; S1542-3565 (16): 30618-8.

Nagy TA, Wroblewski LE, Wang D, Piazuolo MB, Delgado A, Romero-Gallo J, Noto J, Israel DA, Ogden SR, Correa P, Cover TL, Peek RM JR.  $\beta$ -Catenin and p120 mediate PPAR $\delta$ -dependent proliferation induced by *Helicobacter pylori* in human and rodent epithelia. *Gastroenterology*. 2011 aug; 141(2): 553-64.

Nam JH, Choi IJ, Cho SJ, Kim CG, Lee JY, Nam SY, Park SR, Kook MC, Nam BH, Kim YW. *Helicobacter pylori* infection and histological changes in siblings of young gastric cancer patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 jul; 26(7): 1157-63.

Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Gomes AT, Barreira R, Figueira P, Salgado C, Belo L, Peixoto A, Bravo JC, Bravo LE, Realpe JL, Plaisier AP, Quint WG, Ruiz B, Correa P, Van Doorn LJ. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol*. 2001 feb; 158(2): 647-54.

Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 jan; 105 (3): 1003-8.

Oliveira MAA. Sítios de fosforilação de tirosina da proteína cagA e genótipos cagE do *H. pylori* em pacientes com gastrite e úlcera péptica [tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas, Faculdade de Medicina; 2014.

Pajares JM, Gisbert JP. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. Rev Esp Enferm Dig. 2006 oct; 98(10): 770-85.

Parente JML, Parente MPPD. Contexto epidemiológico atual da infecção por *Helicobacter pylori*. GED Gastroenterol Endosc Dig. 2010 jul/set; 29(3): 86-9.

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer. 2001 sep; 37(Suppl 8): 4-66.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric carcinoma. N Engl J Med. 1991 oct; 325(16): 1127-31.

Pereira MG. Artigos científicos: como redigir, publicar e avaliar. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. 396p.

Piva MR, Souza LB, Martins-Filho PRS, Nonaka CFW, Santos TS, Andrade ESS, Piva D. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B expression. Oncol Lett. 2013 jun; 5(6): 1909-14.

Polk DB, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. Nat Rev Cancer. 2010 jun; 10(6): 403-14.

Rauws EA, Tytgat GN. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet. 1990 may; 335(8700): 1233-5.

Rocha DC. Influência da infecção pelo *Helicobacter pylori* sobre estado nutricional, sensação subjetiva de apetite e ingestão alimentar [dissertação]. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, Mestrado Acadêmico em Saúde Pública, Centro de Ciências da Saúde; 2013.

Rocha GA, Rocha AM, Silva LD, Santos A, Bocewicz AC, Queiroz Rd Rde M, Bethony J, Gazzinelli A, Corrêa-Oliveira R, Queiroz DM. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. Trop Med Int Health. 2003 nov; 8(11): 987-91.

Saha A, Hammond CE, Beeson C, Peek RM Jr, Smolka AJ. *Helicobacter pylori* represses proton pump expression and inhibits acid secretion in human gastric mucosa. Gut. 2010 jul; 59(7): 874-81.

Santoro R, Carboni F, Lepiane P, Ettore GM, Santoro E. Clinicopathological features and prognosis of gastric cancer in young european adults. Br J Surg. 2007 jun; 94(6): 737-42.

Santos H, Guerreiro H, Sousa D, Estevens J, Gonçalves AP, Carvalho AP, Inácio C, Faleiro ML, Dionísio L. *Helicobacter pylori* numa população dispéptica no Algarve: prevalência e caracterização genética. J Port Gastreterol. 2010 may/jun; 17(3): 102-7.

Schmausser B, Josenhans C, Endrich S, Suerbaum S, Sitaru C, Andrusis M, Brandlein S, Rieckmann P, Muller-Hermelink HK, Eck M. Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* Infection? Infect Immun. 2004 dec; 72(12): 6773-9.

Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. Gastroenterology. 2008 jun; 134(7): 1842-60.

Shanks Am, El-Omar Em. Helicobacter pylori infection, host genetics and gastric cancer. J Dig Dis. 2009 aug; 10(3): 157-64.

Shimada K, Nara S, Esaki M, Sakamoto Y, Kosuge T, Hiraoka N. Extended right hemihepatectomy for gallbladder carcinoma involving the hepatic hilum. Br J Surg. 2011 jan; 98(1): 117-23.

Shiu J, Blanchard TG. Dendritic cell function in the host response to *Helicobacter pylori* infection of the gastric mucosa. Pathog Dis. 2013 feb; 67(1): 46-53.

Siqueira JS, Lima PSS, Barreto AS, Quintans-Júnior LJ. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*: revisão. Rev Bras Anal Clin. 2007 jan/mar; 39(1): 9-13.

Smythies LE, Waites KB, Lindsey JR, Harris PR, Ghiara P, Smith PD. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN- $\gamma$ , gene-deficient mice. J Immunol. 2000 jul; 165(2): 1022-9.

Snelders HA. Are liquid crystals living organisms? Gewina. 1997; 20(3): 129-42.

Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorach CJ, Taylor JD, Rathbone BJ, Heatley RV, Axon AT. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*. 1991 nov; 32(11): 1415-8.

Souto R, Colombo AP. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *J Periodontol*. 2008 jan; 79(1): 97-103.

Steer HW. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol*. 1975 aug; 28(8): 639-46.

Stewart BW, Kleihues P, editors. World cancer report [Internet]. Lyon: IARC Press; 2003 [citado em 2016 Nov 27]. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/WorldCancerReport.pdf>

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002 oct; 347(15): 1175-86.

Suganuma M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takahashi A, Fujiki H. Human gastric cancer development with TNF- $\alpha$  inducing protein secreted from *Helicobacter pylori*. *Cancer Lett*. 2012 sep; 322(2): 133-8.

Suzuki H, Saito Y, Hibi T. *Helicobacter pylori* and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: updated review of clinical outcomes and the molecular pathogenesis. *Gut Liver*. 2009 jun; 3(2): 81-7.

Sycuro LK, Wyckoff TJ, Biboy J, Born P, Pincus Z, Vollmer W, Salama NR. Multiple peptidoglycan modification networks modulate *Helicobacter pylori* cell shape, motility, and colonization potential. *PLoS Pathog*. 2012 mar; 8(3): e1002603.

Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006 may; 118(1): 1-9.

Tabassam FH, Graham DY, Yamoaka Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal reorganization. *Cell Microbiol*. 2008 apr; 10(4): 1008-20.

Tan MP, Pedersen J, Zhan Y, Lew AM, Pearse J, Wijburg OLC, Strugnell RA. CD8 T cells are associated with severe gastritis in *helicobacter pylori* infected mice in the absence of CD4 T cells. *Infect Immun*. 2008 mar; 76(3): 1289-97.

The Eurogast Study Group. An international association *Helicobacter pylori* infection and gastric câncer. *Lancet*. 1993 may; 341(8857): 1359-62.

The Helicobacter Foundation. *Epidemiology* [Internet]. Citado em 2016 Nov 27. Disponível em: <http://www.helico.com/epidemiology.html>

Tonelli E, Freire LMS. Doenças infecciosas na infância e adolescência. 2th ed. São Paulo: Medsi, 2000. p.656-657.

Torbenson M, Abraham SC, Boitnott J, Yardley JH, Wu TT. Autoimmune gastritis: distinct histological and immunohistochemical findings before complete loss of oxyntic glands. *Mod Pathol*. 2002 feb; 15(2): 102-9.

Torrezini T, Athanazio DA. Imunovigilância e imunoedição de neoplasias: implicações clínicas e potencial terapêutico. *Rev Bra Cancerol*. 2008 jan/mar; 54(1): 63-77.

Uberti AF. Urease de *Helicobacter pylori*: atividade pró-inflamatória e efeitos em células epiteliais gástricas [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia; 2014.

Uno K, Iijima K, Shimosegawa T. Gastric cancer development after the successful eradication of *Helicobacter pylori*. *World J Gastrointest Oncol*. 2016 mar; 8(3): 271-81.

Valenzuela MA, Canales J, Corvalán AH, Quest AFG. *Helicobacter pylori*-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2015 dec; 21(45): 12742-56.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T-cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 jul; 8(7): 523-32.

Vilaichone RK, Mahachai V, Shiota S, Uchida T, Ratanachu-Ek T, Tshering L, Tung NI, Fujioka T, Moriyama M, Yamaoka Y. Extremely high prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Bhutan. *World J Gastroenterol*. 2013 may; 19(18): 2806-10.

Voland P, Weeks DL, Marcus EA, Prinz C, Sachs G, Scott D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 jan; 284(1): 96-106.

Wang SK, Zhu HF, He BS, Zhang ZY, Chen ZT, Wang ZZ, Wu GL. CagA+ *H. pylori* infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007 jun; 13(21): 2923-31.

Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983 jun; 321(8336): 1273-5.

Watanabe T, Tsuge H, Imagawa T, Kise D, Hirano K, Beppu M, Takahashi A, Yamaguchi K, Fujiki H, Suganuma M. Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-alpha inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 jun; 136(6): 911-21.

Watanabe Y, Kurata JH, Mizuno S, Mukai M, Inokuchi H, Miki K, Ozasa K, Kawai K. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: a nested case-control study in a rural area of Japan. *Dig Dis Sci*. 1997 jul; 42(7): 1383-7.

Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*. 2006 feb; 16(1): 3-15.

Who. Preventing chronic diseases: a vital investment [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2010 [citado em 2016 Nov 27]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43314/1/9241563001\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43314/1/9241563001_eng.pdf)

Wise SP 3rd, Doenges JP, Hungate JI Jr, Vielhaber DP. Peptic ulcer in military personnel; management in the outpatient clinic. *U S Armed Forces Med J*. 1955 apr; 6(4): 500-10.

Yamagata H, Kiyohara Y, Aoyagi K, Kato I, Iwamoto H, Nakayama K, Shimizu H, Tanizaki Y, Arima H, Shinohara N, Kondo H, Matsumoto T, Fujishima M. Impact of *Helicobacter pylori* infection on gastric cancer incidence in a general Japanese population: the hisayama study. *Arch Intern Med*. 2000 jul; 160(13): 1962-8.

Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*. 2002 aug; 123(2): 414-24.

Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 nov; 7(11): 629-41.

Yan S, Li B, Bai ZZ, Wu JQ, Xie DW, Ma YC, Ma XX, Zhao JH, Guo XJ. Clinical epidemiology of gastric cancer in Hehuang valley of China: a 10-year epidemiological study of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2014 aug; 20(30): 10486-94.

Zhang M, Liu M, Luther J, Kao JY. *Helicobacter pylori* directs tolerogenic programming of dendritic cells. Gut Microbes. 2010 sep/oct; 1(5): 325-9.

Zhu Y, Zhou X, Wu J, Su J, Zhang G. Risk factors and prevalence of *Helicobacter pylori* infection in persistent high incidence area of gastric carcinoma in yangzhong city. Gastroenterol Res Pract. 2014 jan; 10 pages.

Zorzetto V, Maddalo G, Basso D, Farinati F. Immunotherapy for gastric premalignant lesions and cancer. Immunotherapy. 2012 jun; 4(6): 587-99.

Zullo A, Hassan C, Repici A, Bruzzese V. *Helicobacter pylori* eradication and reflux disease onset: did gastric acid get "crazy". World J Gastroenterol. 2013 feb; 19(6): 786-9.

## ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS IMUNE EM GASTRITES E NEOPLASIAS GÁSTRICAS ASSOCIADAS COM INFECÇÕES CAUSADAS PELA BACTÉRIA *Helicobacter pylori*.

**Pesquisador:** Joana Tavares

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 41240815.3.0000.5558

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.126.700

**Data da Relatoria:** 24/06/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

Vide parecer anterior

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Vide parecer anterior

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Vide parecer anterior

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A proponente adequou o projeto em todos os pontos conforme sugerido por este CEP no parecer substanciado, excetuando-se o ponto relativo ao uso do material armazenado e à justificativa para dispensar o TCLE.

A proponente informa na sua resposta ao parecer substanciado que os tecidos conservados em blocos de parafina encontram-se sob a guarda de um laboratório particular, não tendo sido originalmente coletados para fins de pesquisa e que, por esse motivo, não estariam sujeitos às disposições da CONEP sobre pesquisa em material armazenado. Nesse sentido, compreende-se que as amostras foram armazenadas para atender às regulamentações vigentes do sistema de saúde e não para fins de pesquisa.

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 1.126.700

A regulamentação citada no parecer consubstanciado que foi ampliada e aprimorada na resolução 441 de 2011 de fato fazem referência ao uso de material coletado e armazenado para fins de pesquisa e o seu possível uso posterior. Na interpretação da letra morta da resolução supracitada não cabe qualquer consideração para uso de material armazenado que originalmente não tenha sido coletado para fins diferentes. No entanto, parece-me que na interpretação do espírito da referida norma, seria ilógico torná-la sem efeito para um cenário que apresenta ainda maior vulnerabilidade para os sujeitos dos quais os tecidos foram obtidos: leia-se essas pessoas nunca tiveram a oportunidade de se pronunciar em relação à possibilidade de uso desse material. Sendo assim, acredito que, salvo melhor juízo, a proponente tem sim que justificar em termos éticos o uso pretendido do material armazenado e a dispensa do TCLE. Não me parece razoável simplesmente dizer que os blocos de parafina estão no laboratório tal e que não foram coletados para fins de pesquisa e que por isso mesmo tem-se carta branca para utilizá-los da forma proposta. Se esse fosse o entendimento, certamente não haveria possibilidade de concordar em termos éticos com a proposta. No entanto, acredito que a pesquisa possa ser realizada desde que o processo de reflexão leve à explicitação dos argumentos de natureza ética que a justificam.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide parecer anterior.

Foi acrescentada a carta de anuência do laboratório particular que detém a guarda do material que pretende ser estudado.

**Recomendações:**

1. Complementar a documentação com uma justificativa ampla do uso do material, dado que não foi coletado para fins de pesquisa.
2. Apresentar a justificativa para a dispensa do TCLE, pois existe, como afirmado pela pesquisadora proponente, informação individual que poderia permitir o contato com as pessoas das quais as biópsias foram extraídas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Atender às recomendações acima.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 1.126.700

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprovou o projeto de pesquisa, dispensando o TCLE.

BRASILIA, 26 de Junho de 2015

---

Assinado por:  
Diaulas Costa Ribeiro  
(Coordenador)

## ANEXO B - Artigo

Conforme exigência do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, segue o artigo, na íntegra, como produto dessa dissertação de mestrado submetido a revista **INFECTION AND IMMUNITY**, número de controle IAI00992-16.

### **CORRELATION BETWEEN CD8<sup>+</sup> T LYMPHOCYTE DENSITY AND *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION INTENSITY IN GASTRITIS**

Joana Teresa Diniz Carvalho Tavares<sup>1</sup>, Eliza Carla Barroso Duarte<sup>2</sup>, Flávia Aparecida de Oliveira<sup>3</sup>, Aline de Araújo Freitas<sup>3</sup>, Gabriela Mota do Carmo<sup>3</sup>, Florêncio Figueiredo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Masters Student in Medical Sciences, School of Medicine, University of Brasilia, Brasília, Brazil;

<sup>2</sup> Department of Pathology, School of Medicine, University of Brasilia, Brasília, Brazil;

<sup>3</sup> Department of Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil.

#### **Correspondence:**

Eliza Carla Barroso Duarte, Faculdade de Medicina, Subárea de Patologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Sala: B2 148/8. Brasília (DF) — Brazil — CEP 70910-900. Tel:(+ 55 61) 3107-1813. Email: elizacbduarte@gmail.com

#### **ABSTRACT**

Infection by the bacterium *Helicobacter pylori* occurs throughout the world. The prevalence of this pathogen varies according to the development level of different countries and is associated with various gastric diseases. The presence of bacteria in the gastric mucosa induces an active inflammatory response that leads to different degrees of damage in the gastric mucosa, including atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia and gastric carcinoma. Bacilli may or may not be detectable in the mucosa in such cases. These pathological manifestations are associated with tumorigenesis in the gastric mucosa. Several effects can be observed following acute inflammation, including increased permeability of the gastric epithelium, continued exposure to the *H. pylori* antigen, the recruitment of T cells and the production of antibodies by B cells. In the present work, we assessed the

presence of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with gastritis and gastric adenocarcinoma, with or without concurrent infection by *H. pylori*. We verified the progression of the inflammatory response to the colonization of the gastric mucosa by *H. pylori*. We identified cell migration mechanisms, which appear to be associated with the release of bacillus antigens in the microenvironment established during the course of infection. We observed the participation of inflammatory cells in the eradication of bacilli, as well as the presence of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes that can apparently exercise two functions, namely, modulating inflammation and participating in oncogenic mechanisms. These results show that the colonization of the gastric mucosa by *H. pylori* leads to an inflammatory response and promotes changes in lymphocyte populations. These important mechanisms that participate in the eradication of bacilli also play a role in the establishment of gastric carcinoma.

**KEYWORDS:** Gastritis, Gastric Adenocarcinoma, T CD8 Lymphocytes, *Helicobacter pylori*.

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* was isolated and cultivated for the first time in 1983 (WARREN & MARSHALL, 1983) from mucosa samples of patients with gastric ulcers. The isolated bacterial concentrate was found to induce transient gastritis, and colonization of the gastric mucosa is associated with the induction of an inflammatory response (MARSHALL et al., 1985). This discovery made it possible to better understand gastric mucosa diseases, such as chronic gastritis, peptic ulcers and epithelial and lymphoid neoplasms (OLIVEIRA, 2014).

The *H. pylori* bacterium is Gram-negative, flagellated, spiral, and microaerophilic and produces enzymes that allow its adaptation in the gastric epithelium. The colonization of the mucosa depends on the establishment of a neutral environment that primarily results from the conversion of urea into ammonia and carbon dioxide (MOBLEY et al., 2001).

The prevalence of *H. pylori* infection varies by country and population groups within the same nation. This variability is based on differential exposure through diet and is influenced by environmental factors (McCOLL & EL-OMAR, 2002). Typically acquired in childhood, *H. pylori* infection occurs less in adults but may remain present for life (SUERBAUM &

MICHETTI, 2002). Despite the high infection rate, most infected individuals do not present any symptoms (BARBOSA & SCHINONNI, 2011).

The observed inflammatory process is associated with a superficial chronic gastritis that can progress to chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplastic changes of the gastric mucosa and gastric carcinoma (FIGUEIREDO et al., 2002).

The histopathologic evaluation is characterized by granulocyte and lymphocyte infiltrates (ANDO et al., 2006). This acute inflammation seems to cause the increased permeability of the gastric epithelium and continuous exposure to bacterial antigens, likely contributing to the development of the host's immune response against *H. pylori*. Thus, the presence of this bacterium in the gastric mucosa can induce a specific microenvironment that results from inflammatory response-induced damage, which is likely modulated by the immune response.

Local evidence, such as the presence of pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-8), an increase in Th1 and Th2 cell numbers in the peripheral blood and the presence of regulatory T cells, suggest the importance of chronic inflammation in the response mechanism to *H. pylori* (WANG et al., 2007; KANG et al., 2009; SUGANUMA et al., 2012). The adaptive immune response to *H. pylori* is characterized by the induction of T CD4<sup>+</sup> cells mediated by Th1 and regulatory T cells (ZHANG et al., 2010). Recent data demonstrate an association between the colonization by *H. pylori* and increased T CD8<sup>+</sup> cells, with the development of gastric ulcers (KRONSTEINER et al., 2014; HELMIN-BASA et al., 2011; TABASSAM et al., 2008).

Gastric cancer appears to evolve from inflammatory diseases, such as atrophic gastritis, intestinal metaplasia and dysplastic changes. As such changes are also present during the course of infection by *H. pylori*, there is apparently a correlation between the bacterium and gastric cancer (PARSONNET et al., 1991; YAMAGATA et al., 2000).

Given this evidence, the objective of the present study was to evaluate the presence of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in gastritis and gastric adenocarcinomas patients with and without infection by *H. pylori*.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

The samples analyzed were chosen by convenience in the period from March 2014 to April 2016, with the following clinical cases: (i) 22 cases of inactive antrum gastritis (IAG); (ii) 26 cases of mild active antral gastritis (MAAG); (iii) 25 cases of moderate/severe active antral gastritis (MSAG); and (iv) 14 cases of gastric adenocarcinoma (GA).

### Immunohistochemistry

T CD8 lymphocytes and *H. pylori* were identified using antibodies against LT CD8 (clone 236AE7; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; at 1:100). For the immunohistochemical assessments, successive 5  $\mu\text{m}$  cross-sections were acquired and mounted on silanized slides (Dako, Carpinteria, CA, USA). The tissue sections were then deparaffinized, rehydrated, and immersed in EDTA buffer (pH 9.0) for 25 minutes. The slides were cooled for 30 min at room temperature, washed in distilled water (2 times for 5 min each) and then incubated in 3% hydrogen peroxide for 10 min. The slides were subsequently washed in distilled water (twice for 5 min each), washed in 0.1% T-TBS for 5 min and incubated with blocking solution (5% bovine serum albumin in T-TBS) for 1 h at room temperature. After removing the blocking solution, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted to the above -mentioned concentration. The sections were then incubated with the Universal Dako LSAB kit (K0690). Diaminobenzidine substrate was added to the sections for 5 min, and the reaction was monitored under a microscope. Lastly, the slides were counterstained with hematoxylin and mounted. Negative controls were obtained by the omission of the primary antibody, which was replaced with 1% PBS-BSA and pre-immune mouse serum (X501-1, Dako). The immunohistochemical expression of the antibody was evaluated using an AXIOLAB-ZEISS microscope (40x objective lenses) (Shinjuku, Tokyo, Japan). A total area of 0.09614 mm<sup>2</sup> was evaluated for each sample.

Microscopic fields with strong staining were selected, and the immunohistochemical expression data were expressed as the mean and standard error.

## RESULTS

### Histopathological assessment

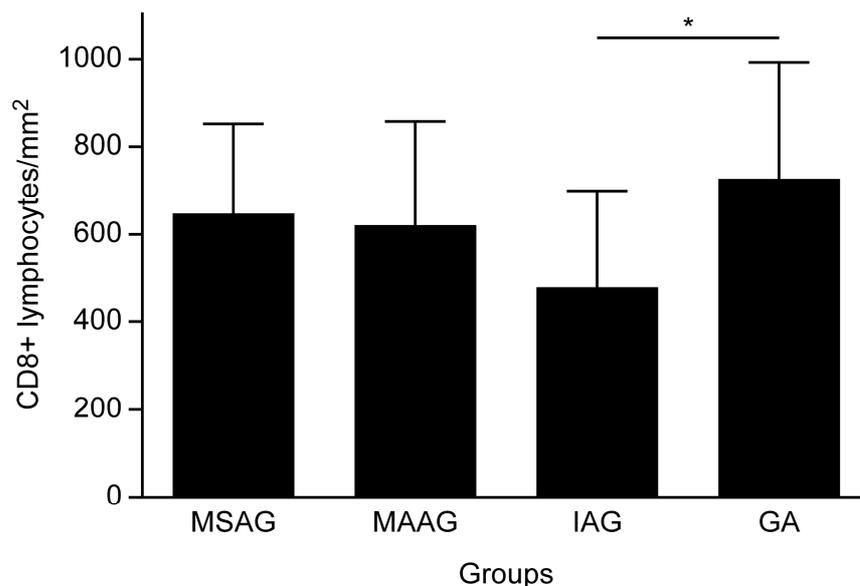
After evaluation of the slides using hematoxylin-eosin (H&E), it was possible to observe the histopathological characteristics of the samples. Cases of inactive gastritis were characterized by foveolar hyperplasia (17 cases); enlargement of the lamina propria, with an increased population of mononuclear cells; an absence of injury in the glandular lining epithelium (22 cases); lymphoid accumulations (5 cases); and the absence of bacillary forms of *H. pylori*. The mild active gastritis cases, in addition to foveolar hyperplasia, showed enlargement of the lamina propria, with mild intensity mono- and polymorphonuclear inflammatory cell infiltrates (26 cases); lymphoid accumulation (16 cases); follicular lymphoid hyperplasia (6 cases); and the absence of bacillary forms of *H. pylori*. The cases of moderate/severe active gastritis showed the characteristics observed in the cases of mild active gastritis but with moderate or acute inflammatory infiltrates in the lamina propria. Tissue injury was also observed in the glandular lining epithelium, as was the formation of microabscesses (25 cases). These cases additionally exhibited lymphoid accumulation (5 cases), follicular lymphoid hyperplasia (15 cases), and the presence of bacilli suggestive of *H. pylori*. The gastric adenocarcinoma cases (14 cases) were represented by two histological types, diffuse or tubular pattern, with seven cases in each group. The diffuse pattern was characterized by infiltration of the lamina propria with individual atypical cells having well-defined borders, broad homogeneous or vacuolated (signet ring-like) cytoplasm and pleomorphic hyperstained nuclei; these cells were commonly mitotic. The tubular pattern was represented by tubular structures lined by atypical cells with well-defined borders, homogeneous cytoplasm and pleomorphic and hyperstained nuclei; these cells were also commonly mitotic.

### Assessment of *H. pylori* presence in gastric samples

The immunohistochemical assessment for the presence of *H. pylori* revealed the absence of bacilli in samples of inactive gastritis, mild active gastritis and gastric adenocarcinoma. In the cases of moderate/severe active gastritis, immunopositive bacilli were observed in 1: mild (+/++++) (08 cases), 2: moderate (+/++++) (08 cases) and 3: considerable (+/++++) (09 cases).

### Immunohistochemical assessment of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte density in gastric samples

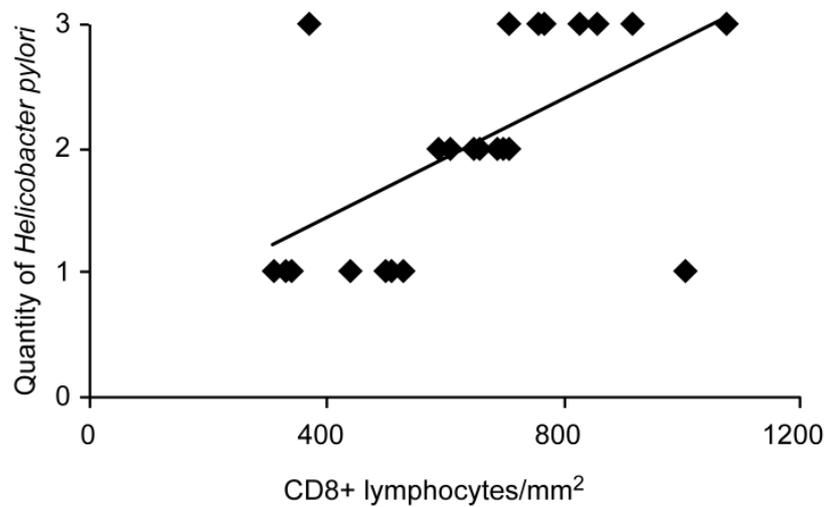
The immunohistochemical assessment for the density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes among the groups studied, inactive gastritis and mild active gastritis, moderate/severe active gastritis and gastric adenocarcinoma, revealed a significant difference between inactive gastritis and gastric carcinoma ( $p=0.012$ ). A greater density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was observed in gastric carcinoma when compared with inactive gastritis.



**FIG 1** Comparison of the density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes among the groups. MSAG=moderate/severe active gastritis, MAAG=mild active gastritis, IAG=inactive gastritis and GA=gastric adenocarcinoma (\*  $p<0.05$ )

## Comparison between the density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and the quantity of *Helicobacter pylori*

When comparing the quantity of *H. pylori* bacilli among the cases of moderate/severe active gastritis, a positive and statistically significant correlation was observed.



**FIG 2** Correlation between the density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and the quantity of *H. pylori* in patients with moderate/severe active gastritis. \* rS= 0.67 p≤0.001. Quantity of *Helicobacter pylori*: 1: mild (+/++++), 2: moderate (++)/++++ and 3: considerable (+++/++++)

## DISCUSSION

We observed that the presence of *H. pylori* bacilli is associated with a progressive inflammatory response of the gastric mucosa, characterized by the presence of polymorpho- and mononuclear inflammatory cells. As described above, *H. pylori* promotes the migration of leukocytes to the gastric mucosa, with the participation of chemical mediators, cytokines and chemokines, demonstrating the importance of inflammation in the control of infection (BROIDE et al., 2007; FARAH & KHAMISY-FARAH, 2014; FEHLINGS et al., 2012). As these injuries became more intense, we observed a positive correlation with the quantity of bacilli. Thus, our results confirm the ability of this bacterium to promote an inflammatory response of the gastric mucosa. According to the literature, *H. pylori* can induce a series of morphological changes with different clinical expressions, from gastritis,

gastric ulcer, intestinal metaplasia, dysplastic changes and neoplasms (CHERDANTSEVA et al., 2014; MULLER et al., 2007). However, most patients with an infection remain asymptomatic (LADEIRA et al., 2003). The diversity of clinical manifestations arising from infection by *H. pylori* is associated environmental, bacterial and host factors, as demonstrated by Marshall (1995). These results were obtained from the induction of infection by *H. pylori* in healthy individuals. Histopathological studies have demonstrated that in patients infected by *H. pylori*, gastric mucosa lesions are characterized by inflammatory cells that migrate from blood vessels to the lamina propria. In these cases, injury of the glandular lining epithelium results in the release of SabA and HP-NAP (neutrophil-activating protein) antigens of the bacillus. This cell migration occurs in response to IL-8 via receptors of the chemokines CXCR1 and CXCR2 (BÄCKHED et al., 2003; SCHMAUSSER et al., 2004). Although there is evidence of the participation of *H. pylori* antigens in leukocyte migration via the action of chemokines and cytokines, the efficiency of this pathway in the eradication of bacilli, which often remain latent, is not established. Recent studies show that one of the explanations for maintenance of mucosa colonization by *H. pylori* is the ability of the bacterium to inhibit the receptors of CXCR1 and CXCR2, consequently reducing the migration of polymorphonuclear leukocytes. Therefore, the bacterium can become a permanent resident of the gastric mucosa, demonstrating the complexity of the evolution of the clinical manifestations of *H. pylori* infection (ALGOOD & COVER, 2006; BÄCKHED et al., 2003; SCHMAUSSER et al., 2004).

As our results demonstrate, due to colonization by *H. pylori*, the inflammatory infiltrate in the lamina propria of active gastritis cases contains varying numbers of macrophages and lymphocytes as well as polymorphonuclear leukocytes. Macrophages play a fundamental role in defense against infectious agents (FEHLINGS et al., 2012; MAI et al., 1991; MILLS et al., 2000; MOOS et al., 2010), and their interaction with pathogens results in the production and secretion of substances capable of promoting a microbicidal response. However, when macrophages interact with *H. pylori*, nitric oxide production is blocked due to the presence of arginase released by the bacillus (ALGOOD & COVER, 2006). These findings demonstrate the

complexity of the inflammatory response against this bacillus. Moreover, the interaction of macrophages with *H. pylori* paradoxically inhibits the synthesis of nitric oxide, which is normally one of the main pathways in the microbicidal activity of these cells. This inhibition results in the maintenance of the bacilli in the gastric mucosa. Therefore, inflammatory response events, in addition to contributing to the elimination of this pathogen, can also participate in events that facilitate the perpetuation of infection (BUSSIÈRE et al., 2005).

In our results, we also found that along with the polymorphonuclear leukocytes and mononuclear phagocytes, monocytes and macrophages, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are also present. As the inflammatory response intensified in the antral gastric mucosa, there was also a progressive increase in the number of these lymphocytes. In moderate/severe active gastritis cases, we also observed a positive and significant correlation between the amount of *H. pylori* bacilli and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes density. This result demonstrates that in addition to the inflammatory response to *H. pylori* in the gastric mucosa, an immune response is established, as described in the literature (CHEN et al., 2011; JANG, 2010; KRONSTEINER et al., 2014). It is unclear if the same immune events modulate inflammation and elimination of the bacteria. If the effectiveness of the inflammatory response is dependent on modulatory mechanisms, it can be concluded that cellular immunity plays a primary role in this process. For this reason, clinical studies emphasize the relevance of T lymphocytes in both the severity of *H. pylori* infection and in the control of gastritis.

Our analysis, specifically in relation to the evaluated cases of gastric adenocarcinomas, revealed discreet inflammatory leukocyte infiltrates, an absence of *H. pylori* and a high density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. These results were statistically significant when compared with inactive gastritis. In addition, a high density of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was observed in the cases of active gastritis; however, this effect was not statistically significant. Although a high percentage of individuals infected by *H. pylori* remain asymptomatic, many infected patients present different gastric manifestations, including gastric cancer (AXON, 2014; UNO & SHIMOSEGAWA, 2016; YAN et al., 2014). The connection between *H. pylori* and cancer is mediated by

inflammatory events (BRESCIANI et al., 2011; BARBOSA & SCHINONNI, 2011). The inflammatory response, in general, may require certain modulatory events, with the participation of different subpopulations of lymphocytes, such as CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (AMEDEI et al., 2012). In our results, the participation of these cells was evident given that we observed a progressive elevation in their numbers with increasing disease severity (i.e., from inactive to active gastritis) as well as with an increased intensity of inflammation. However, it will be necessary to evaluate the roles of T CD4<sup>+</sup> cells and humoral immunity in modulating the inflammatory response of the gastric mucosa to *H. pylori*.

As we observed, the density of T CD8<sup>+</sup> cells was high in all cases of gastric cancer. These cells, according to our understanding, have two basic functions: (i) acting as cytotoxic T cells to promote the elimination of bacilli; and (ii) modulating the inflammatory response, which is important for controlling infection. The release of a number of *H. pylori* antigens is important in terms of the former function. Many of these antigens are responsible for cell migration and establishment of an inflammatory response, as well as other mechanisms involved in the transformation of gastric mucosa epithelial cells to adenocarcinoma (BARBOSA & SCHINONNI, 2011; AMEDEI et al., 2012). Reports in the literature demonstrate that *H. pylori* can induce oncogenic transformation (ZORZETTO et al., 2012). Transgenic mice expressing *H. pylori* antigens develop several types of cancer, including gastric cancer (OHNISHI et al., 2008). In addition, the association between *H. pylori* and MALT-type lymphoma has been established (KUO & CHENG, 2013; SUZUKI et al., 2009). Therefore, carcinogenic activity can be attributed to this bacterium. The pathogenesis of neoplasms involves immunity-related mechanisms. Given this fact, we believe that with the progression of the *H. pylori* infection and the establishment of the inflammatory response, CD8<sup>+</sup> T lymphocyte numbers increase and are present in cases of neoplasia.

In the present study, we observed a progression of the inflammatory response to the colonization of the gastric mucosa by *H. pylori*. We identified cellular migration mechanisms. This effect was apparently associated with the release of antigens of the bacillus in the microenvironment established

during the course of infection. We also observed the participation of inflammatory cells in the eradication of bacilli and the presence of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which can exert two functions: modulating inflammation and participating in oncogenic mechanisms. However, a better assessment of the correlation between *H. pylori*, the inflammatory response and cellular immunity in the establishment of gastric cancer is still necessary.

## REFERENCES

Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. Clin Microbiol Rev. 2006 out; 19(4): 597-613.

Amedei A, Bella CD, Silvestri E, Prisco D, D'Elis MM. T cells in gastric cancer: friends or foes. Clin Dev Immunol. 2012 mar; 10 pages.

Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006 jan; 12(2): 181-6.

Axon A. *Helicobacter pylori* and public health. Helicobacter. 2014 set; 19(Suppl 1): 68-73.

Bäckhed F, Torstensson E, Seguin D, Richter-Dahlfors A, Rokbi B. *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-8 receptor expression in the human gastric epithelium. Infect Immun. 2003 jun; 71(6): 3357-60.

Barbosa JA, Schinonni MI. *Helicobacter pylori*: associação com câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. R Ci Med Biol. 2011 sep/dec; 10(3): 254-62.

Bresciani C, Latif I, Coser RB, Yagi O, Deutsch CR, Mucerino D, Zilberstein B, Cecconello I. Determinação histopatológica da presença do *Helicobacter pylori* em câncer gástrico. Arq Bras Cir Dig. 2001 jan/mar; 24(1): 59-63.

- Broide E, Sandbank J, Scapa E, Kimchi NA, Shapiro M, Lerner A. The immunohistochemistry profile of lymphocytic gastritis in celiac disease and *Helicobacter pylori* infection: interplay between infection and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2007 jan; 6 pages.
- Bussi re FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA Jr, Wilson KT. Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. *J Biol Chem.* 2005 jan; 280(4): 2409-12.
- Chen JG, Xia JC, Liang XT, Pan K, Wang W, Lv L, Zhao JJ, Wang QJ, Li YQ, Chen SP, He J, Huang LX, Ke ML, Chen YB, Ma HQ, Zeng ZW, Zhou ZW, Chang AE, Li Q. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *Int J Biol Sci.* 2011 jan; 7(1): 53-60.
- Cherdantseva LA, Potapova OV, Sharkova TV, Belyaeva YY, Shkurupy VA. Association of *Helicobacter pylori* and iNOS production by macrophages and lymphocytes in the gastric mucosa in chronic gastritis. *J Immunol Res.* 2014 sep; 4 pages.
- Farah R, Khamisy-Farah R. Association of neutrophil to lymphocyte ratio with presence and severity of gastritis due to *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Lab Anal.* 2014 may; 28(3): 219-23.
- Fehlings M, Drobbe L, Moos V, Viveros PR, Hagen J, Beigier-Bompadre M, Pang E, Belogolova E, Churin Y, Schneider T, Meyer TF, Aebischer T, Ignatius R. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. *Infect Immun.* 2012 aug; 80(8): 2724-34.
- Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho-Sim es M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002 nov; 94(22): 1680-7.
- Helmin-Basa A, Michalkiewicz J, Gackowska L, Kubiszewska I, Eljaszewicz A, Mierzwa G, Bala G, Czerwionka-Szaflarska M, Prokurat A, Marszalek A. Pediatric *Helicobacter pylori* infection and circulating T-lymphocyte activation and differentiation. *Helicobacter.* 2011 feb; 16(1): 27-35.
- Jang TJ. The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *Pathol Res Pract.* 2010 jan; 206(1): 34-8.

- Kang JM, Kim N, Lee DH, Park JH, Lee MK, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effects of genetic polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases in Korea. *J Clin Gastroenterol*. 2009 may/jun; 43(5): 420-8.
- Kronsteiner B, Bassaganya-Riera J, Philipson N, Hontecillas R. Novel insights on the role of CD8<sup>+</sup> T cells and cytotoxic responses during *Helicobacter pylori* infection. *Gut Microbes*. 2014 may/jun; 5(3): 357-62.
- Kuo SH, Cheng AL. *Helicobacter pylori* and mucosa-associated lymphoid tissue: what's new. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013 dec; 2013(1): 109-17.
- Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *J Bras Patol Med Lab*. 2003 dec; 39(4): 335-42.
- Mai UE, Perez-Perez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. *J Clin Invest*. 1991 mar; 87(3): 894-900.
- Marschall BJ, McGeachie DB, Rogers PA, Glancy RJ. *Campylobacter pylori* infection and gastroduodenal disease. *Med J UST*. 1985; 142(8): 439-44.
- Marshall BJ. *Helicobacter pylori*: the etiologic agent for peptic ulcer. *JAMA*. 1995 oct; 274(13): 1064-6.
- McCull KE, El-Omar E. How does *H. pylori* infection cause gastric cancer? *Keio J Med*. 2002 dec; 51(Suppl 2): 53-6.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 jun; 164(12): 6166-73.
- Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001.
- Moos V, Schmidt C, Geelhaar A, Kunkel D, Allers K, Schinnerling K, Loddenkemper C, Fenollar F, Møter A, Raoult D, Ignatius R, Schneider T. Impaired immune functions of monocytes and macrophages in Whipple's disease. *Gastroenterology*. 2010 jan; 138(1): 210-20.

Muller LB, Fagundes RB, Moraes CC, Rampazzo A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia. *Arq Gastroenterol*. 2007 apr/jun; 44(2): 93-8.

Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 jan; 105 (3): 1003-8.

Oliveira MAA. Sítios de fosforilação de tirosina da proteína cagA e genótipos cagE do *H. pylori* em pacientes com gastrite e úlcera péptica [tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas, Faculdade de Medicina; 2014.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 oct; 325(16): 1127-31.

Schmausser B, Josenhans C, Endrich S, Suerbaum S, Sitaru C, Andrusis M, Brandlein S, Rieckmann P, Muller-Hermelink HK, Eck M. Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* infection? *Infect Immun*. 2004 dec; 72(12): 6773-9.

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002 oct; 347(15): 1175-86.

Suganuma M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takahashi A, Fujiki H. Human gastric cancer development with TNF- $\alpha$  inducing protein secreted from *Helicobacter pylori*. *Cancer Lett*. 2012 sep; 322(2): 133-8.

Suzuki H, Saito Y, Hibi T. *Helicobacter pylori* and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: updated review of clinical outcomes and the molecular pathogenesis. *Gut Liver*. 2009 jun; 3(2): 81-7.

Tabassam FH, Graham DY, Yamoaka Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal reorganization. *Cell Microbiol*. 2008 apr; 10(4): 1008-20.

Uno K, Iijima K, Shimosegawa T. Gastric cancer development after the successful eradication of *Helicobacter pylori*. *World J Gastrointest Oncol*. 2016 mar; 8(3): 271-81.

- Wang SK, Zhu HF, He BS, Zhang ZY, Chen ZT, Wang ZZ, Wu GL. CagA+ *H. pylori* infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007 jun; 13(21): 2923-31.
- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983 jun; 321(8336): 1273-5.
- Yamagata H, Kiyohara Y, Aoyagi K, Kato I, Iwamoto H, Nakayama K, Shimizu H, Tanizaki Y, Arima H, Shinohara N, Kondo H, Matsumoto T, Fujishima M. Impact of *Helicobacter pylori* infection on gastric cancer incidence in a general Japanese population: the hisayama study. *Arch Intern Med*. 2000 jul; 160(13): 1962-8.
- Yan S, Li B, Bai ZZ, Wu JQ, Xie DW, Ma YC, Ma XX, Zhao JH, Guo XJ. Clinical epidemiology of gastric cancer in Hehuang valley of China: a 10-year epidemiological study of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 aug; 20(30): 10486-94.
- Zhang M, Liu M, Luther J, Kao JY. *Helicobacter pylori* directs tolerogenic programming of dendritic cells. *Gut Microbes*. 2010 sep/oct; 1(5): 325-9.
- Zorzetto V, Maddalo G, Basso D, Farinati F. Immunotherapy for gastric premalignant lesions and cancer. *Immunotherapy*. 2012 jun; 4(6): 587-99.