

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

**AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS EM
PACIENTES INFECTADOS POR *Helicobacter pylori* E A
RELAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE DO HOSPEDEIRO**

SELMA MALUF TEIXEIRA

São Luís
2021

SELMA MALUF TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS EM
PACIENTES INFECTADOS POR *Helicobacter pylori* E A
RELAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE DO HOSPEDEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

São Luís

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Maluf Teixeira, Selma.

AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS EM PACIENTES
INFECTADOS POR *Helicobacter pylori* E A RELAÇÃO COM A
SUSCEPTIBILIDADE DO HOSPEDEIRO / Selma Maluf Teixeira. -
2021.

171 f.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2021.

1. Arginase. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Macrófagos.
4. Metaplasia. I. Fernandes do Nascimento, Flávia
Raquel. II. Título.

SELMA MALUF TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS EM
PACIENTES INFECTADOS POR *Helicobacter pylori* E A
RELAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE DO HOSPEDEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em ____/____/____ por:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Examinador)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira (Examinador)
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis (suplente)
Universidade Federal do Maranhão

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada. À minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos me ajudando e torcendo sempre pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Senhor da minha vida, por me sustentar e me guiar em todos os momentos da minha trajetória.

À minha família: meu pai (*in memoriam*), por todos os aprendizados e, em particular por me ajudar a direcionar minha vida com o seu dizer: “O importante é ser e não ter”; à minha mãe, que sempre vislumbrou os caminhos que eu deveria seguir; ao meu marido, por sempre ter acreditado em mim e por ter sido meu esteio nas horas que mais precisei; aos meus filhos, que muito me incentivaram e compreenderam os momentos de distanciamento familiar, necessários para cumprir esta missão.

À minha orientadora, professora Flávia, minha fada-madrinha, a quem digo: Tudo que você toca se transforma em algo melhor, como num passe de magia. E aos seus alunos atuais e futuros digo: sintam-se privilegiados por poderem usufruir não apenas dos conhecimentos, mas principalmente da conduta e da ética da professora Flávia.

Aqueles que acolheram a proposta deste estudo, colaborando em várias etapas dessa trajetória: à querida Martha e ao Dr. Gyl Eanes, que tornaram possível a execução da técnica de imunohistoquímica, crucial para nossa pesquisa; à professora Lucilene, que nos orientou na etapa de leitura das lâminas de imunohistoquímica. Assim como agradeço ao amigo e doutorando Douglas, que se disponibilizou tão gentilmente para auxiliar nessa etapa tão valorosa deste trabalho; aos amigos do Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia, Jefferson e Sônia, sempre prontos a nos ajudar, nos dando apoio em detalhes fundamentais; ao amigo e doutorando Eder e a aluna de iniciação científica Carol, que prontamente colaboraram na execução do ensaio da arginase no plasma.

A todos os professores de doutorado e às secretárias do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde da UFMA.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) por viabilizar as condições necessárias para cumprimento deste percurso acadêmico.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que se tornasse possível a realização deste projeto

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DO REFERENCIAL TEÓRICO .	vii
	LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO	ix
	LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 1	x
	LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO CAPÍTULO 2	xi
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiv
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	18
2.1.1	Histórico.....	18
2.1.2	Aspectos epidemiológicos	19
2.1.3	Características microbiológicas de <i>H. pylori</i>	21
2.1.3.1	Morfologia bacteriana	21
2.1.3.2	Fatores de virulência	21
2.1.3.3	Aspectos genéticos	24
2.1.4	Métodos diagnósticos	25
2.1.5	Aspectos histopatológicos da gastrite induzida por <i>H. pylori</i>	28
2.2	Macrófagos	31
2.2.1	Histórico do reconhecimento dos macrófagos.....	31
2.2.2	Macrófagos e suas funções.....	32
2.2.3	Produção de óxido nítrico, óxido nítrico sintase e superóxido dismutase..	34
2.2.4	Polarização de macrófagos	35
2.2.4.1	Histórico da terminologia polarização de macrófagos	35
2.2.4.2	Caracterização e funções dos subconjuntos de macrófagos M1 e M2.....	37
2.2.4.3	Arginina e dicotomia M1/M2	39
2.2.4.4	Polarização de macrófagos em infecções bacterianas.....	42
2.3	Polarização de macrófagos em infecção por <i>Helicobacter pylori</i>.....	44
3	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivo geral.....	50
3.2	Objetivos específicos.....	50

4	RESULTADOS.....	51
4.1	Capítulo 1 - Polarização de macrófagos em infecção por <i>Helicobacter pylori</i> : breve revisão.....	51
4.2	Capítulo 2 - Macrófagos M2 estão associados com densidade de <i>Helicobacter pylori</i> em pacientes com gastrite sem lesões pré- neoplásicas	82
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	APÊNDICE A – PRODUÇÃO DURANTE O CURSO	148
	APÊNDICE B – PRODUÇÃO DURANTE O CURSO	163
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS	165
	ANEXO B – APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFMA	168
	ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO ..	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Arg1 -	Arginase 1
Arg2 -	Arginase 2
CD -	Classe de diferenciação, do inglês “ <i>Cluster Differentiation</i> ”
CD4+ -	Células T auxiliares, do inglês “Auxiliary T cells”
CD8+ -	Células T citotóxicas, do inglês “Cytotoxic T cells”
COX-2 -	Ciclooxigenase 2, do inglês “Cyclooxygenase 2”
CXCL -	Ligante de quimiocinas
ERONs -	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio, do inglês “Reactive Oxygen and Nitrogen Species”
IL-12 -	Interleucina 12, do inglês “Interleukin 12”
IL-18 -	Interleucina 18, do inglês “Interleukin 18”
IL-1 β -	Interleucina 1 β , do inglês “Interleukin 1 β ”
IL-2 -	Interleucina 2, do inglês “Interleukin 2”
IL-23 -	Interleucina 23, do inglês “Interleukin 23”
IL-4 -	Interleucina 4, do inglês “Interleukin 4”
IL-6 -	Interleucina 6, do inglês “Interleukin 6”
INF-1 -	Interferon 1, do inglês “Interferon 1”
iNOS -	Óxido Nítrico Sintase Induzível, do inglês “ <i>Induced Nitric Oxide Synthase</i> ”
L-arg -	L-arginina, do inglês “L-arginine”
LPS -	Lipopolissacarídeo, do inglês “Lipopolysaccharide”
M1 -	Macrófagos polarizados para perfil M1
M2 -	Macrófagos polarizados para perfil M2
NO -	Óxido Nítrico, do inglês “ <i>Nitric Oxide</i> ”
O ₂ -	Ânion Superóxido, do inglês “Superoxide anion”
ODC -	Ornitina Descarboxilase, do inglês “Ornithine Decarboxylase”
ROS -	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês “ <i>Reactive Oxygen Species</i> ”
SMO -	Espermina Oxidase, do inglês “ <i>Spermine Oxidase</i> ”
SOD -	Superóxido Dismutase, do inglês “Superoxide Dismutase”
Th1 -	Th1- Célula Auxiliar tipo 1, do inglês “ <i>T helper 1</i> ”

Th2 -	Th1- Célula Auxiliar tipo 2, do inglês “ <i>T helper 2</i> ”
TLR -	Receptor tipo <i>Toll</i> , do inglês “ <i>Toll-like Receptors</i> ”

LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Microfotografia eletrônica da bactéria <i>H. pylori</i>	21
Figura 2. Fatores de virulência de <i>H. pylori</i>	24
Figura 3. Divisão histológica do Sistema de Sydney	30
Figura 4. Cascata de Pelayo Correa, um modelo para progressão histológica para câncer gástrico	31
Figura 5. Principais estados de polarização de macrófagos ativados	39

LISTA DE FIGURAS E TABELA DO CAPÍTULO 1

Figura 1. <i>H. pylori</i> interfere na ativação de macrófagos M1, pela indução de Arg2 e regulação positiva de poliaminas.....	64
Figura 2. <i>H. pylori</i> altera o perfil de polarização antimicrobiano induzindo TRPM2.....	65
Figura 3. <i>H. pylori</i> interfere no perfil de polarização de macrófagos pela indução de HO-1.....	66
Tabela 1. Artigos selecionados na pesquisa de revisão, no período de 2010 a 2019.	67

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO CAPÍTULO 2

Figura 1. Expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa gástrica de pacientes infectados com <i>H. pylori</i> (HP)	94
Figura 2. Associação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa e a densidade bacteriana, em pacientes infectados com <i>H. pylori</i> (HP)	96
Figura 3. Correlação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa e a densidade bacteriana, em pacientes infectados com <i>H. pylori</i> (HP)	98
Figura 4. Associação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos e a presença de lesões pré-neoplásicas, em pacientes infectados com <i>H. pylori</i> (HP)	100
Figura 5. Correlação entre expressão de marcadores de polarização M1 e M2 (iNOS e Arginase), (TNF- α e IL-10), (HLA-DR e CD163) na mucosa de pacientes infectados com (HP)	102
Figura 6. Associação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa e aspecto endoscópico, em pacientes infectados com <i>H. pylori</i> (HP)	104
Figura 7. Perfil de expressão de Arginase na mucosa gástrica e no plasma de pacientes com infecção por <i>H. pylori</i> (HP)	106
Figura 8. Correlação entre expressão de Arginase na mucosa e no plasma de pacientes com infecção por <i>H. pylori</i> (HP)	107
 Tabela 1. Características gerais dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de infecção por <i>H. pylori</i> e de infectados com e sem lesões pré-neoplásicas	90
Tabela 2. Análise clínica e endoscópica dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de infecção por <i>H. pylori</i> e de infectados com e sem lesões pré-neoplásicas	92
Tabela 3. Análise histopatológica da mucosa gástrica dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de infecção por <i>H. pylori</i> e de infectados com e sem lesões pré-neoplásicas.....	92

RESUMO

Helicobacter pylori é um dos patógenos mais prevalentes da espécie humana. A gastrite crônica induzida por *Helicobacter pylori* é um importante fator de risco para o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais e adenocarcinoma gástrico. A resposta imunológica da mucosa gástrica provocada pela bactéria é caracterizada pela presença de macrófagos. Estas células são consideradas importantes reguladores da resposta imune. De acordo com a via de ativação, os macrófagos podem desviar sua resposta para dois polos opostos, conhecidos como M1 e M2, que podem levar a desfechos clínicos variados em muitas doenças. No entanto, o perfil funcional dos macrófagos na infecção por *Helicobacter pylori* não é bem definido. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se a presença de *H. pylori* por si só poderia induzir a polarização dos macrófagos e se esta polarização estaria associada à maior carga bacteriana e a maior gravidade da resposta inflamatória da mucosa gástrica. Primeiramente, realizamos uma breve revisão bibliográfica abordando o tema avaliação da polarização dos macrófagos em infecção por *Helicobacter pylori*, na qual observamos poucos estudos sobre a infecção em humanos. Entre eles, um demonstrou perfil M1 em pacientes infectados com gastrite atrófica, indicando que a resposta excessiva ou a manutenção prolongada do perfil de polarização M1 pode levar a danos teciduais e contribuir para a patogênese da infecção. Além disto, abordamos os mecanismos de escape do patógeno às respostas imunes do hospedeiro. A seguir, investigamos a polarização de macrófagos em pacientes infectados por *H. pylori*, por meio de imunohistoquímica da mucosa gástrica. Um estudo transversal foi conduzido com 73 pacientes dispépticos submetidos à endoscopia digestiva alta e aos testes diagnósticos de *H. pylori* (teste da urease e histopatológico) em biópsias da mucosa gástrica. O diagnóstico endoscópico avaliou a presença de pangastrite leve ou pangastrite erosiva/úlcera péptica. A mucosa gástrica foi avaliada histologicamente para determinar a presença de atrofia, metaplasia (lesões pré-neoplásicas) e densidade de *H. pylori*. De todos os pacientes examinados, 36 foram *H. pylori* negativo e 37 *H. pylori* positivo. Os pacientes foram então separados em três grupos: um grupo *H. pylori* negativo (n=36), um grupo infectado por *H. pylori* sem lesões pré-neoplásicas (n=16) e outro grupo infectado com lesões pré-neoplásicas (n=21). Por meio da técnica de imunohistoquímica na mucosa gástrica, foi determinada a expressão de F4/80 (marcador de macrófagos) e de marcadores para os perfis de polarização M1 (iNOS, TNF, HLA-DR) e M2 (Arginase, IL-10, CD163). Além disto, foi feita dosagem da atividade de Arginase no plasma dos pacientes. Após a análise dos resultados foram realizadas análises de associação entre as variáveis. Observamos que os pacientes infectados por *H. pylori* apresentaram concentração maior de macrófagos marcados com Arginase e CD163, mas não apresentaram alterações dos marcadores de polarização iNOS, TNF- α , HLA-DR ou IL-10, sugerindo um perfil M2 de polarização. Macrófagos marcados com Arginase e CD163 estavam em maior número nos pacientes com alta carga bacteriana e com gastrite crônica sem lesões pré-neoplásicas, em relação aos controles. A expressão de IL-10 foi menor nos pacientes com maior densidade bacteriana. Expressão de Arginase foi maior na mucosa gástrica de pacientes infectados com gastrite erosiva/úlcera péptica que os controles com o mesmo diagnóstico. Não houve correlação entre expressão de Arginase na mucosa e a atividade no plasma.

Concluimos que uma das estratégias do *H. pylori* para escapar da resposta pró-inflamatória (M1) da mucosa é induzindo macrófagos M2. Desta forma, um ambiente inflamatório de baixo grau na mucosa gástrica, em resposta à infecção, pode ser favorável a persistência da bactéria. No entanto, a carga bacteriana pode ser um fator de desequilíbrio deste perfil tolerogênico. Além do mais, a ausência de correlação entre a expressão de Arginase sistêmica e na mucosa sugere que a bactéria promove a modulação da resposta imune e inflamatória no local da infecção. Uma maior compreensão do papel da polarização de macrófagos na gastrite crônica associada à infecção por *H. pylori* pode ajudar a entender a imunopatologia da infecção com *H. pylori* e apoiar futuras abordagens terapêuticas e diagnósticas.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; Macrófagos; Arginase; Atrofia; Metaplasia.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is one of the most prevalent pathogens of the human species. *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis is an important risk factor for the development of gastric and duodenal ulcers and gastric adenocarcinoma. The immune response of the gastric mucosa caused by the bacteria is characterized by the presence of macrophages. These cells are considered important regulators of the immune response. According to the activation pathway, macrophages can shift their response to two opposite poles, known as M1 and M2, which can lead to varied clinical outcomes in many diseases. However, the functional profile of macrophages in *Helicobacter pylori* infection is not well defined. Thus, the objective of this study was to investigate whether the presence of *H. pylori* per se could induce the polarization of macrophages and whether this polarization would be associated with a greater bacterial load and a greater severity of the gastric mucosal inflammatory response. First, we performed a brief bibliographic review addressing the theme of assessing the polarization of macrophages in *Helicobacter pylori* infection, in which we observed few studies on human infection. One of them demonstrated M1 profile in infected patients with atrophic gastritis, indicating that excessive response or prolonged maintenance of the M1 polarization profile can lead to tissue damage and contribute to the pathogenesis of the infection. In addition, we address the pathogen's escape mechanisms to host immune responses. Then, we investigated macrophages polarization in *H. pylori* infected patients by immunohistochemistry of gastric mucosa. A cross-sectional study was conducted with 73 dyspeptic patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy and diagnostic tests for *H. pylori* (urease and histopathological test) on biopsies of the gastric mucosa. The endoscopic diagnosis evaluated the presence of mild pangastritis or erosive pangastritis / peptic ulcer. The gastric mucosa was histologically evaluated to determine the presence of atrophy, metaplasia (pre-neoplastic lesions) and density of *H. pylori*. Of all the patients examined, 36 were *H. pylori* negative and 37 *H. pylori* positive. The patients were separated into three groups: a negative *H. pylori* group (n = 36), a group infected with *H. pylori* without pre-neoplastic lesions (n = 16) and another group infected with pre-neoplastic lesions (n = 21). Through the immunohistochemistry technique in the gastric mucosa, the expression of F4/80 (macrophage marker) and markers for the polarization profiles M1 (iNOS, TNF, HLA-DR) and M2 (Arginase, IL-10, CD163). In addition, Arginase activity was measured in patients' plasma. After analyzing the results, analyzes of the association between variables were performed. We observed that patients that *H. pylori* infected had a higher concentration of macrophages marked with Arginase and CD163, but did not show changes in the polarization markers iNOS, TNF- α , HLA-DR or IL-10, suggesting an M2 polarization profile. Macrophages marked with Arginase and CD163 were in greater numbers in patients with high bacterial load and chronic gastritis without pre-neoplastic lesions, compared to controls. IL-10 expression was lower in patients with higher bacterial density. Arginase expression was greater in the gastric mucosa of patients infected with erosive gastritis / peptic ulcer than controls with the same diagnosis. There was no correlation between Arginase expression in the mucosa and activity in the plasma. We conclude that one of the strategies of *H. pylori* to escape the pro-inflammatory response (M1) of the mucosa is to induce M2 macrophages. Thus, a low-grade inflammatory environment in the gastric mucosa, in response to infection, may be favorable for the persistence of the bacteria. However, bacterial load can be an imbalance factor in this tolerogenic

profile. Furthermore, the lack of correlation between the expression of systemic and mucosal Arginase suggests that the bacterium promotes the modulation of the immune and inflammatory response at the site of infection. A greater understanding of the role of macrophage polarization in chronic gastritis associated with *H. pylori* infection can help to understand the immunopathology of infection with *H. pylori* and support future therapeutic and diagnostic approaches.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Macrophage; Atrophy; Metaplasia; Arginase.

1 INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa que coloniza seletivamente a mucosa gástrica humana (HARDBOWER *et al.*, 2014). O patógeno tem notável capacidade de colonização do hospedeiro, visto que infecta cerca de 44,3% da população mundial. No entanto, a taxa de prevalência é maior em países em desenvolvimento, que apresentam taxa de 50,8%, contrastando com a prevalência de 34,7% nos países desenvolvidos. Desta forma, a infecção por *H. pylori* pode ser uma referência para definir o status socioeconômico e de saúde de um país (ZAMANI *et al.*, 2018).

A infância é o período de maior risco de adquirir este patógeno (YOKOTA *et al.*, 2015), que pode persistir no ambiente gástrico ao longo da vida do hospedeiro, apesar da resposta imune e humoral (ABADI, 2017). A maioria dos infectados por *H. pylori* permanece assintomática (MUNGAZI *et al.*, 2018; BLASER; PARSONNET, 1994), apesar de desenvolver gastrite crônica (PEEK JR. *et al.*, 2010). A gastrite crônica induzida por *H. pylori* é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais, adenocarcinoma gástrico e linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) (WROBLEWSKI *et al.*, 2010; HAGYMÁSI; TULASSAY, 2014; PLUMMER *et al.*, 2016). O risco de doença varia em diferentes populações e está associado a complexas interações entre fatores do hospedeiro e do patógeno. Tais fatores incluem o genótipo do hospedeiro, que determina o tipo e intensidade da resposta imune, a heterogeneidade dos fatores de virulência de *H. pylori* e os fatores ambientais (DUNNE *et al.*, 2014).

Estudos anteriores sobre a patogênese da infecção com *H. pylori* têm avaliado o papel dos fatores de virulência bacterianos e a resposta do sistema imune na associação com diversos desfechos clínicos da infecção (HUANG *et al.*, 2016; MEJÍAS-LUQUE; GERHARD, 2017). Entretanto, ainda não se compreende bem por que apenas 15% dos infectados desenvolvem afecções clínicas (ATHERTON *et al.*, 2006). Apesar de *H. pylori* induzir respostas imunes do hospedeiro pró e anti-inflamatórias, imunoestimulatórias e imunomodulatórias, a bactéria persiste (ARNOLD *et al.*, 2012).

A persistência da infecção por *H. pylori* e a presença de inflamação crônica da mucosa gástrica do hospedeiro sugerem que a resposta imune do hospedeiro é inadequada para eliminar a bactéria (HARDBOWER et al., 2013).

Os macrófagos desempenham importante função na resposta do hospedeiro contra *H. pylori* por meio da produção de citocinas, quimiocinas, compostos microbicidas e pela fagocitose (GOBERT et al., 2002). Devido à capacidade de apresentar respostas funcionais polarizadas em relação a um estímulo inflamatório, os macrófagos foram classificados em M1 (resposta imune inata) e M2 (fase de resolução da inflamação). Os macrófagos M1 promovem resposta de linfócitos *T helper* 1 (Th1), são ativados por IFN- γ ou LPS e produzem citocinas inflamatórias (IL-12 e IL-23). Além de regular positivamente a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando à produção de óxido nítrico (NO), molécula importante para o controle de infecções, pela eliminação do agente infeccioso (WEISSER et al., 2013). Macrófagos M2 produzem resposta de linfócitos *T helper* 2 (Th2), são ativados por IL-4, IL-13 ou IL-10 e, além de produzirem pequenas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e grandes quantidades de IL-10, também regulam positivamente a produção de arginase (VERRECK et al., 2006).

O equilíbrio M1/M2 mantém a homeostase, enquanto o desequilíbrio induz a inflamação crônica e a doença (TARIQUE et al., 2015). No entanto, a participação destes tipos funcionais de macrófagos na infecção por *H. pylori* não é bem definido. Sendo assim, a hipótese deste estudo é que *H. pylori* induz polarização de macrófagos para um perfil regulador da inflamação M2 e que a quebra deste equilíbrio, leva a mudança de perfil do macrófago para M1 e ao agravamento das lesões gástricas. Este conhecimento pode ser importante para entender a patogênese de doenças associadas à infecção por *H. pylori* e apoiar futuras abordagens terapêuticas e diagnósticas.

Os resultados deste estudo foram apresentados na forma de dois artigos. O primeiro é uma revisão descritiva do tema e o segundo aborda a relação do perfil de polarização de macrófagos com a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Helicobacter pylori*. Assim como a relação do fenótipo funcional dos macrófagos com lesões pré-neoplásicas gástricas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecção por *Helicobacter pylori*

2.1.1 Histórico

Bactérias apresentando forma em espiral foram observadas no estômago humano desde o início do século 20 (KRIENITZ, 1906). No entanto, foram consideradas supercrescimentos bacterianos ou contaminantes de alimentos até o início dos anos 1980 (KUSTERS *et al.*, 2006). O anatomista Bizzozero (1893) observando mucosa gástrica de cães relatou “espiroquetas” que habitavam as glândulas gástricas e os canalículos das células parietais (FIGURA; ORDERDA, 1996). Posteriormente, esses micro-organismos foram identificados como *Helicobacter canis*, *Helicobacter felis* e *Helicobacter heilmannii* (BLASER, 1997).

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa descoberta por John Robin Warren em 1982 e cultivada por Barry Marshall, em 1983 a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica (MARSHALL; WARREN, 1984). Warren identificou em 135 amostras de biópsia gástrica humana um micro-organismo em forma de “S”, bem visível quando corado pela prata. No entanto, o que chamou a atenção de Warren foi o fato de que esse micro-organismo era mais numeroso em áreas de gastrite crônica ativa, o que o levou a associar o micro-organismo ao infiltrado de granulócitos (MARSHALL; WARREN, 1984).

Marshall e Warren (1985) utilizando o conhecimento de que estas bactérias se assemelhavam a espécies de *Campylobacter* em vez de espiroquetas utilizaram técnicas de isolamento de *Campylobacter* (microaerófila) para crescimento em meio ágar chocolate. O micro-organismo foi detectado após seis dias de cultura. Desta forma, cumpriram o segundo postulado de Koch que afirma que o germe deve ser obtido a partir do animal doente e crescer fora do corpo.

A fim de comprovar a patogenicidade do micro-organismo (terceiro e quarto postulado de Koch), Marshall participou como cobaia do seu experimento (MARSHALL; WARREN, 1985). Inicialmente, o médico gastroenterologista verificou

que a mucosa do seu estômago se apresentava histologicamente normal, após o que ingeriu um inóculo de *H. pylori*. Nos quatorze dias seguintes, desenvolveu quadro clínico característico de um episódio agudo de gastrite. A infecciosidade do agente foi confirmada com êxito, dez dias depois, quando a gastrite foi comprovada histologicamente e documentada por endoscopia (MARSHALL; WARREN, 1985). Morris e Nicholson (1987) reproduziram o experimento de Marshall. Os autores estabeleceram um efeito direto da infecção sobre a secreção de ácido.

A partir de então, cumprindo os postulados de Koch para associação entre gastrite e o patógeno gástrico humano *H. pylori*, Marshall e Warren (1985) alteraram profundamente o ponto de vista da microbiologia e afecções do estômago humano. A descoberta de *H. pylori* quebrou o dogma de que o estômago era um órgão estéril e introduziu o conceito que a infecção por *H. pylori* pode levar a uma variedade de doenças do trato gastrointestinal superior (MALFERTHEINER *et al.*, 2009).

A bactéria isolada foi denominada *Campylobacter pyloridis* pelos pesquisadores Marshall e Warren (1984), por motivos gramaticais foi designada mais tarde, *Campylobacter pylori* (MARSHALL; GOODWIN, 1987). Baseado em características ultraestruturais e genéticas, em 1989, seu nome foi alterado para *Helicobacter pylori* (GOODWIN *et al.*, 1989).

A princípio, *H. pylori* foi considerado um patógeno que coloniza o estômago humano e provoca resposta inflamatória, denominada pelos patologistas de gastrite crônica. Mais tarde, estudos observaram que a infecção por esta bactéria estava associada a gênese de úlcera péptica e linfoma gástrico associado ao tecido linfoide (MALT) (PETERSON, 1987; HAGYMÁSI; TULASSAY, 2014) e com maior risco de adenocarcinoma gástrico (WROBLEWSKI *et al.*, 2010; PLUMMER *et al.*, 2016).

2.1.2 Aspectos epidemiológicos

A infecção por *H. pylori* é uma das mais prevalentes da espécie humana. Estudo recente de revisão sistemática com metanálise demonstrou taxa de prevalência mundial da infecção por *H. pylori* de 44,3% (ZAMANI *et al.*, 2018). No entanto, difere de um país para outro e pode diferir entre os diferentes grupos étnicos, sociais ou etários dentro do mesmo país (MITCHELL, 2001; ZAMANI *et al.*, 2018). A

infecção é mais prevalente em países em desenvolvimento com taxa de 50,8% contrastando com a prevalência de 34,7% nos países desenvolvidos. Desta forma, a infecção por *H. pylori* pode ser uma referência para definir o status socioeconômico e de saúde de um país (ZAMANI *et al.*, 2018).

De fato, os fatores de risco mais importantes para a transmissão do patógeno incluem condições sanitárias precárias, ambientes insalubres e baixa escolaridade (QUEIROZ *et al.*, 2012; HOOI *et al.*, 2016). A infância é considerada o período de maior risco de adquirir este patógeno devido ao maior contato interpessoal neste estágio da vida (YOKOTA *et al.*, 2015). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a taxa de aquisição do patógeno pode atingir até 56% das crianças aos cinco anos de idade (PARENTE *et al.*, 2006).

Revisão sistemática com metanálise considerou a taxa de prevalência do Brasil de 71,3%. (HOOI *et al.*, 2016). A referida revisão avaliou 6 estudos brasileiros em adultos, publicados no período de 2000 a 2016. Entre eles, cita-se Zarteka *et al.* (2007), que demonstraram taxa de infecção de 65,3% em adultos assintomáticos, em São Paulo e outros cinco das regiões sul e sudeste do Brasil. No entanto, não foram avaliados estudos das regiões norte e nordeste e nem em crianças. Pode-se mencionar estudos da região amazônica que detectaram taxas de prevalências em adultos de 86,0% e 97,9% (CUNHA *et al.*, 2003; CARTÁGENES *et al.*, 2009). No nordeste do país, Rodrigues *et al.* (2006) realizaram uma pesquisa em crianças de baixa renda, com idade entre seis meses e 14 anos e detectaram taxa de prevalência de 55,8%. Hara *et al.* (2008) e Rabelo-Gonçalves *et al.* (2008) compararam crianças pertencentes a diferentes níveis socioeconômicos. Os autores demonstraram que o contágio ocorre mais precocemente e atinge taxas mais elevadas nas crianças com situação socioeconômica mais baixa e com condições sanitárias mais precárias. Os estudos epidemiológicos no Brasil são ainda escassos, não havendo evidências bem estabelecidas sobre a dinâmica da prevalência da infecção por *H. pylori* no país (COELHO *et al.*, 2018).

As vias de infecção mais aceitas atualmente incluem oral-oral e fecal-oral (ZAMANI *et al.*, 2018; BUI *et al.*, 2016). O ser humano é o principal reservatório de *H. pylori* e fonte primária de infecção (BUI *et al.*, 2016). Em países desenvolvidos, a transmissão oral-oral pode ser considerada a principal rota de transmissão, enquanto

em países em desenvolvimento predomina a rota fecal-oral, que inclui a via de contaminação ambiental (HERRERRA; PARSONNET, 2009). A água pode ser um fator de risco para infecção por *H. pylori* (ZATERKA *et al.*, 2007; AZIZ *et al.*, 2015). A rota gastro-oral pode ocorrer entre os indivíduos institucionalizados e crianças em creches (BROWN, 2000).

2.1.3 Características microbiológicas de *H. pylori*

2.1.3.1 Morfologia bacteriana

À microscopia ótica e eletrônica, a bactéria *H. pylori* é um bacilo gram negativo, de forma espiralada ou encurvada, cuja extensão varia de 0,5 a 1 μm de largura e 2,5 a 5 μm de comprimento; possui de 2 a 6 flagelos revestidos partindo de um único polo, sendo que cada um possui aproximadamente 30 μm de comprimento e 2,5 nm de espessura, móvel, não-esporulada e microaerófila (GRAHAM, 1998) (Figura 1).



Figura 1. Microfotografia eletrônica da bactéria *H. pylori*
Fonte: Spósito (2017).

2.1.3.2 Fatores de virulência

Os fatores microbianos facilitam a colonização, permitem localizar a infecção em nicho específico e estão envolvidos na patogênese de *H. pylori*. Para alcançar seus objetivos, *H. pylori* precisa realizar quatro etapas críticas: 1) Sobreviver em condições ácidas do estômago; 2) movimentar-se em direção às células do epitélio, por meio da motilidade mediada por flagelos; 3) ligar-se às células epiteliais por adesinas; 4) liberar toxinas que causam danos aos tecidos (ABADI, 2017).

O pH ácido da luz gástrica tem eficiente propriedade antibacteriana (ALGOOD; COVER, 2006). Entretanto, *H. pylori* secreta a enzima urease, de grande importância para o patógeno sobreviver ao ácido clorídrico do estômago (DEBOWSKI et al., 2017). A urease, proteína de alto peso molecular (500 a 600kDa), hidrolisa a ureia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, em amônia e dióxido de carbono (VOLAND et al., 2003). A amônia atua como receptor de íons hidrogênio, gerando pH neutro no periplasma bacteriano, o que confere ao patógeno, proteção aos efeitos deletérios da acidez gástrica (Figura 2). Além do mais, a arginase bacteriana, codificada pelo gene *rocF*, gera ureia a partir de L-arginina de macrófagos, que é utilizada pela urease para sintetizar amônia necessária para neutralizar o ácido gástrico (GOBERT et al., 2001).

Para evitar as condições ácidas na superfície do lúmen e obter nutrientes, o patógeno precisa mover-se para camadas mais profundas, atravessando a camada de muco viscoelástico que protege o epitélio gástrico (ABADI, 2017). A viscosidade do muco é dependente da acidez, quanto mais ácido o pH, mais denso se torna o muco. A urease liberada por *H. pylori* diminui a integridade do muco, facilitando a penetração do patógeno mediada por flagelos polares (BASSO et al., 2010). A presença dos flagelos polares permite ao *H. pylori* movimentar-se rapidamente (SUERBAUM, 1995). Estes movimentos são direcionados por meio de resposta quimiotática (MCGEE et al., 2005) (Figura 2). Mutantes defeituosos na produção de flagelos são incapazes de colonizar a mucosa gástrica (MCGEE et al., 2005). Além dos flagelos, a morfologia helicoidal da bactéria confere à mesma vantagem mecânica para penetrar na camada de muco viscoso do estômago (SYCURO et al., 2010).

A etapa final da associação do patógeno com a mucosa gástrica é a adesão. A adesão é mediada pelas adesinas expressas na membrana externa de *H. pylori*, entre elas, Baba, Saba, ALPA, AlpB, hopZ e OipA. A proteína BabA reconhece

e se liga ao receptor fucosilado Lewis b, expresso nas células epiteliais e está associada ao aumento do risco de câncer gástrico. A SabA, por sua vez, se liga aos receptores sialil-Lewis x e é importante na adesão e ativação de neutrófilos (YAMAOKA, 2008). Já a adesina OipA é capaz de ativar a sinalização intracelular induzindo a liberação de citocinas pro- inflamatórias (QADRI *et al.*, 2014). A aderência às células epiteliais gástricas é essencial para a patogênese da infecção, havendo correlação direta entre a fixação bacteriana e degeneração celular (HESSEY *et al.*, 1990; CHMIELA; KUPCINSKAS, 2019) (Figura 2). Entretanto, apenas 20% de *H. pylori* presentes na mucosa gástrica aderem à superfície de células epiteliais. A maioria exibe um tropismo para junções intercelulares e, ocasionalmente, para espaços intercelulares mais profundos (NECCHI *et al.*, 2007). Embora *H. pylori* tenha sido considerado por muito tempo um patógeno extracelular, estudos recentes têm evidenciado que a bactéria ocasionalmente pode invadir a célula epitelial. No entanto, o mecanismo de invasão permanece obscuro (TEREBIZNIK *et al.*, 2006; CHU *et al.*, 2010).

H. pylori também expressa lipopolissacarídeo (LPS), componente importante da membrana externa das bactérias gram-negativas (Figura 2). Contudo, modificações no lipídio A do LPS de *H. pylori* diminuiu a atividade endotóxica do LPS desta bactéria em relação ao de outras bactérias gram-negativas (MATSUYAMA *et al.*, 2001; QADRI *et al.*, 2014). O antígeno O do LPS de *H. pylori* expressa glicanos Le^x e Le^y, que estão estruturalmente relacionados com antígenos do grupo sanguíneo Lewis, encontrados em células epiteliais gástricas (ASPINALL; MONTEIRO, 1996). Este mimetismo pode resultar em tolerância imunológica contra os antígenos do patógeno ou na indução de auto-anticorpos que reconhecem células epiteliais gástricas (APPELMELK, 1997).

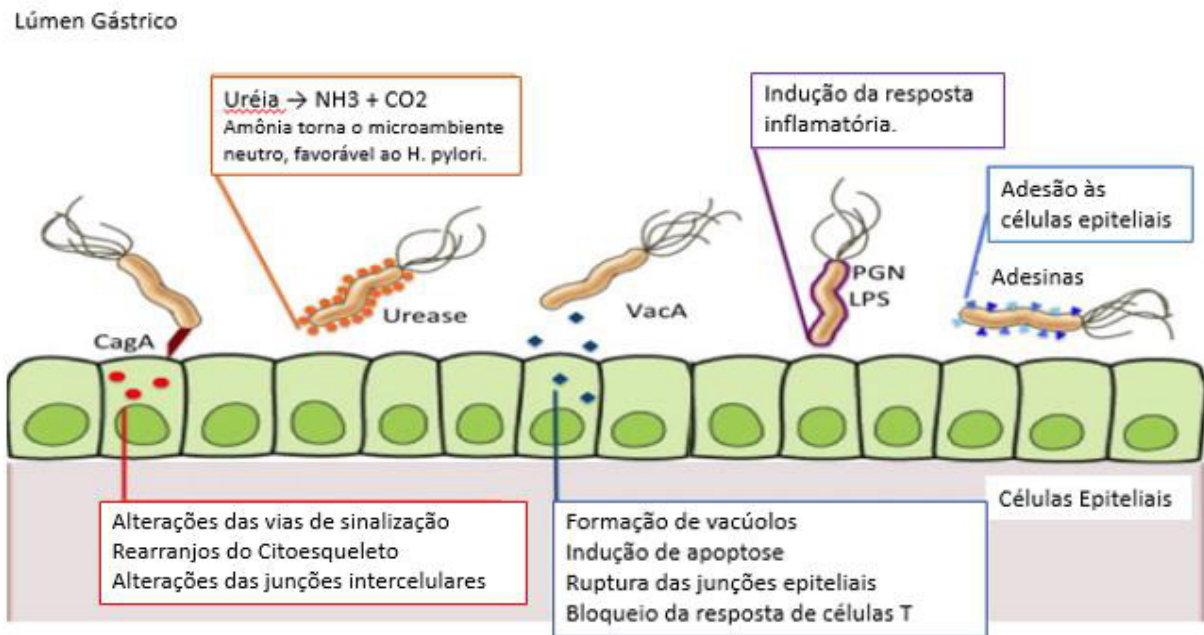


Figura 2. Fatores de virulência de *H. pylori*
 Fonte: Adaptado de Morales-Guerrero *et al.* (2013).

2.1.3.3 Aspectos genéticos

A grande diversidade genética de *H. pylori* dificulta a busca de fatores bacterianos envolvidos na patogênese. Vários locus genômicos que codificam fatores de virulência, tais como ilha de patogenicidade *cagA* (*cagPAI*), toxina de VacA, e adesina Bab2 têm sido fortemente associada a um risco aumentado de desenvolver úlcera péptica e câncer de estômago (GERHARD *et al.*, 1999).

O gene cepa-específico *citotoxin antigen associated* (*cagA*) foi o primeiro gene identificado no *H. pylori* e está fortemente associado ao risco para desenvolvimento de câncer gástrico (PEEK JR. *et al.*, 1999; WEN; MOSS, 2009, HUANG *et al.*, 2016). As cepas *cagA-positivas* tendem a ser mais virulentas e são encontradas em cerca de 60% das cepas ocidentais. O gene *cagA* é o marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag-PAI*), um elemento insercional de 40kb, que contém cerca de 31 genes (BLASER; BERG, 2001). Entre os genes integrantes da *cag-PAI*, existem genes homólogos aos de outras bactérias, os quais codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV. Este sistema tem como função injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (STEIN *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2016) (Figura 2).

A proteína VacA, ou “citotoxina vacuolizadora” é um fator de virulência de grande importância na patogênese de *H. pylori*. Esta proteína tem várias atividades celulares: vacuolização da célula, formação de canais na membrana, interrupção das funções endossomais e lisossomais, apoptose e imunomodulação. Todas as cepas são portadoras do gene *vacA* (gen da citotoxina vacuolizante), entretanto, apenas algumas cepas são produtoras da citotoxina vacuolizante. Estas cepas são mais comumente isoladas de pacientes com úlcera péptica, atrofia gástrica e câncer gástrico (ARTHERTON *et al.*, 2009) (Figura 2).

2.1.4 Métodos diagnósticos

A confirmação da presença de *H. pylori* pode ser baseada em dois grupos de testes, dependendo da técnica utilizada para coleta de amostras. Aqueles que necessitam de endoscopia digestiva alta para biópsias da mucosa gástrica são considerados invasivos, tais como, teste da urease, reação em cadeia de polimerase (RCP), histopatologia e cultura. Os não-invasivos incluem o teste respiratório com ureia marcada com isótopos de carbono (C^{13}), sorologia e pesquisa do antígeno fecal.

Considerando que a carga bacteriana gástrica de *H. pylori* diminui a partir do uso de agentes antimicrobianos e de drogas anti-secretoras, o Consenso Maastrich IV e o *American College of Gastroenterology Guideline* recomendam interromper o uso de Inibidores da bomba de prótons (IBP) duas semanas antes do teste e antimicrobianos quatro semanas antes do teste, o que permite que as bactérias possam repovoar o estômago e os testes anteriormente negativos (Teste respiratório, pesquisa de antígeno fecal, teste da urease, histopatologia e cultura) possam se tornar novamente positivos (MALFERTHEINER *et al.*, 2012). Descreve-se abaixo os testes diagnósticos invasivos e não-invasivos.

a) Teste da urease

Teste da urease é um método indireto que se baseia na presença da enzima urease, produzida por *H. pylori*. Fragmentos da mucosa gástrica são introduzidos imediatamente após a coleta em um substrato contendo ureia e um indicador de pH (vermelho fenol). A urease hidrolisa a ureia em amônia e bicarbonato,

com consequente aumento do pH e mudança da cor do meio, de amarelo para vermelho. A mudança de cor confere positividade ao teste (KOUMI *et al.*, 2011).

O 4º Consenso Brasileiro sobre *H. pylori* (COELHO *et al.*, 2018) recomenda para o teste da urease a coleta de um fragmento da mucosa do antro e outro da mucosa do corpo, tendo em vista que a colonização da bactéria poderá ocorrer de maneira não uniforme. O teste da urease é um método simples, pouco dispendioso e proporciona resultados rápidos (WANG *et al.*, 2015). Apresenta sensibilidade de 87-95 % e especificidade de 95% (ROY *et al.*, 2016). Várias preparações do teste da urease estão disponíveis no Brasil.

b) Histopatologia

A histopatologia é considerada o método padrão-ouro para a detecção da infecção por *H. pylori*. Além de avaliar a morfologia da mucosa gástrica, possibilita identificar alterações pré-malignas (MOON *et al.*, 2012).

A confiabilidade deste método depende essencialmente da localização e número de biópsias da mucosa gástrica e do nível de experiência do patologista (COSGUN *et al.*, 2016). O 4º Consenso Brasileiro sobre *H. pylori* (COELHO *et al.*, 2018) recomenda duas biópsias de antro e duas biópsias do corpo, da pequena e grande curvatura do estômago. A técnica de coloração com hematoxilina-eosina é a técnica mais comumente utilizada na prática clínica. Coloração adicional com Giemsa para facilitar a identificação bacteriana (BATTS *et al.*, 2013).

A imunohistoquímica é um método sensível e específico para detectar *H. pylori*, mas é demorado e caro (COSGUN *et al.*, 2016).

Tanto o teste da urease quanto a histopatologia são afetados pelo uso de agentes antimicrobianos, inibidores da bomba de prótons (IBP) e compostos contendo bismuto, que inibem a atividade de urease ou diminuem a carga bacteriana (MIDOLO; MARSHALL, 2000).

c) Reação de Cadeia Polimerase (RCP)

Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) é um método molecular realizado a partir de amostras de biópsias gástricas para diagnóstico de *H. pylori*. A sua grande vantagem reside no fato de permitir análises de diversidade, virulência e padrões de

resistência desta bactéria (CIRAK *et al.*, 2007). Apesar de apresentar elevada especificidade e sensibilidade (MENONI *et al.*, 2013), tem sido mais indicado para investigação científica, devido a seu alto custo.

d) Teste Sorológico

A infecção por *H. pylori* provoca uma resposta imunológica sistêmica levando à produção de anticorpos. O anticorpo IgG específico para *H. pylori* pode ser observado no sangue e urina a partir do vigésimo primeiro dia de infecção e permanecer presente por longo tempo após erradicação. Desta forma, tem valor limitado para diagnóstico de infecção aguda e confirmação da erradicação (HO; MARSHALL, 2000). Além do mais, a validação de um ensaio local é recomendada (MALFERTHEINER *et al.*, 2017).

Os testes sorológicos mais utilizados são imunoensaios enzimáticos (ELISAs), Ensaio imunocromatográfico (testes rápidos) e Ensaio de imunoblot. ELISA apresenta maior precisão em comparação com testes rápidos (BURUCOA *et al.*, 2013). A vantagem do teste sorológico é de ser o único teste que não é influenciado por mudanças locais do estômago que poderiam conduzir a uma diminuição da carga bacteriana e resultado falso negativo de outros testes (MALFERTHEINER *et al.*, 2017).

e) Teste Respiratório com Ureia marcada com C¹³

O teste respiratório com ureia marcada com isótopo radioativo estável C¹³ (¹³C-UBT) é o teste padrão ouro para diagnóstico não invasivo de infecção por *H. pylori*. Este teste tem excelente precisão, baixo custo e fácil execução (FERWANA *et al.*, 2015).

O princípio deste teste é baseado na atividade da urease de *H. pylori*. Na presença de *H. pylori*, a urease hidrolisa a ureia, liberando CO₂ marcado com C¹³, que é eliminado pela expiração (LOGAN; WALKER, 2001). O teste foi validado no Brasil para adultos e crianças com idade acima de 6 anos (KAWAKAMI *et al.*, 2002; LEAL *et al.*, 2011).

f) Pesquisa de Antígeno Fecal

O teste do antígeno fecal (TAF) identifica antígeno de *H. pylori* nas fezes por enzima imunoensaio com o uso de anticorpos policlonais ou monoclonais anti-*H. pylori*. A sensibilidade com anticorpo monoclonal é maior que com anticorpo policlonal (MANES *et al.*, 2005). TAF pode ser utilizado para pesquisar infecção em curso e para estabelecer a cura após a terapia (GISBERT; PAJARES, 2004).

2.1.5 Aspectos histopatológicos da gastrite induzida por *H. pylori*

A gastrite aguda associada a infecção por *H. pylori* pode ter resolução espontânea, de ocorrência rara em crianças (GRAHAM, 2004; PEREZ-PEREZ *et al.*, 2003) ou evoluir para gastrite crônica, predominante no antro inicialmente, podendo progredir para o corpo gástrico (SONNENBERG *et al.*, 2010). Gastrite crônica é condição fundamental para o desenvolvimento de úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma MALT (KUSTERS *et al.*, 2006).

Com a descoberta de *Helicobacter pylori* como a principal causa de inflamação gástrica foi elaborado o Sistema de Sydney para classificação de gastrite com o objetivo de uniformizar a descrição endoscópica e histopatológica da gastrite. O Sistema de Sydney original foi apresentado no *World Congress of Gastroenterology*, realizado em Sydney, na Austrália, no ano 1990 e publicado no *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, em 1991 (Figura 3). O Sistema apresentou uma matriz com divisões para histologia e endoscopia. A Divisão Histológica do Sistema Sydney permitiu classificar os parâmetros histológicos, identificar a distribuição topográfica e declara a etiopatogenia da gastrite. Três padrões morfológicos são reconhecidos: gastrite aguda, gastrite crônica e formas especiais (PRICE, 1991).

O diagnóstico de gastrite aguda refere-se a presença predominante de neutrófilos, com mínimo ou nenhum aumento de células mononucleares. Geralmente é uma condição transitória, o que torna o seu diagnóstico histológico raro. Outras características como edema, hemorragia e erosões são comuns. Na gastrite crônica, ocorre acréscimo de células mononucleares na lâmina própria, sem outros padrões

organizados que defina como uma forma específica de gastrite (PETERSON *et al.*, 1987; LAINE; WEINSTEIN, 1989).

O Sistema considerou os seguintes índices morfológicos importantes para monitorar o regime terapêutico e a história natural da gastrite: inflamação crônica, atividade neutrofílica, atrofia, metaplasia intestinal e densidade de organismos semelhantes ao *H. pylori*. A esses fatores morfológicos é aplicada uma escala padrão de graduação, que considera os graus leve, moderado e acentuado (PRICE, 1991).

Os índices morfológicos anteriormente citados são assim classificados: 1. Inflamação crônica - refere-se a presença de linfócitos e monócitos na lâmina própria e classifica a gastrite como crônica. A intensidade do infiltrado inflamatório pode ser graduado conforme escala padrão (PRICE, 1991); 2. Atividade - no contexto da gastrite crônica refere-se à densidade de neutrófilos na lâmina própria, fossas gástricas e epitélio da superfície (PRICE, 1991). A infiltração envolvendo até um terço das fossas gástricas e da superfície é definida como atividade leve; entre um terço e dois terços, moderada e mais de dois terços, como severa ou acentuada. A atividade está particularmente relacionada à presença de *H. pylori* (PRICE, 1991); 3. Atrofia é a perda de glândulas especializadas do antro ou corpo gástrico. A dificuldade de avaliação da perda leve de glândulas, especialmente na presença de inflamação separando as glândulas, fez com que fosse considerado apenas dois graus da escala padrão (STOLTE; MEINING, 2001); 4. Metaplasia intestinal é designada como a substituição do epitélio superficial, foveolar e/ou glandular na mucosa oxíntica ou antral pelo epitélio intestinal, constituído de células de Paneth, caliciformes e enterócitos (SONG *et al.*, 2015). De acordo com o Sistema Sydney, a graduação da metaplasia é feita conforme a regra dos terços (PRICE, 1991).

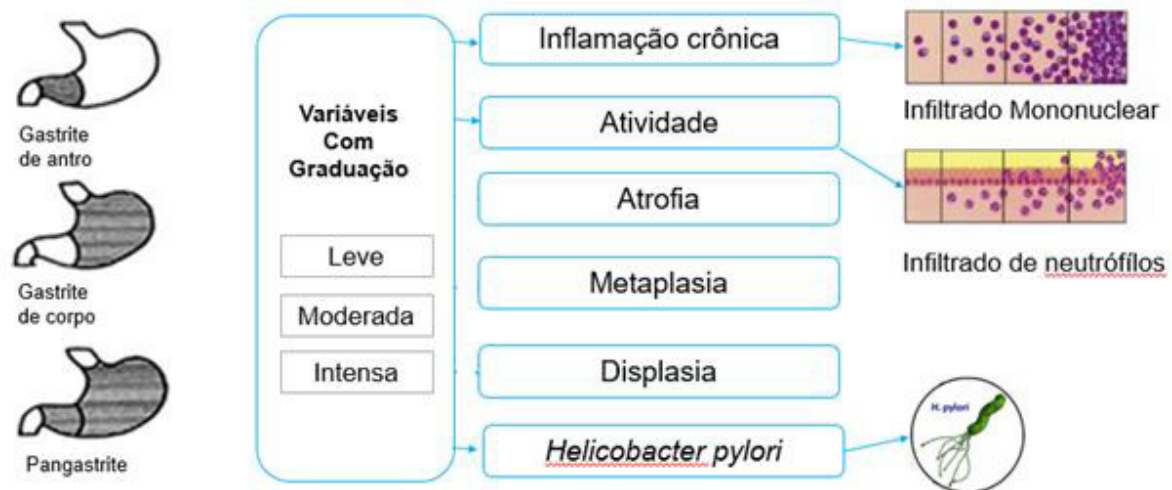


Figura 3. Divisão histológica do Sistema de Sydney
 Fonte: Adaptado de Sipponen e Price (2011).

H. pylori é considerado o agente etiológico mais importante para o desenvolvimento do câncer gástrico. Foi classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) carcinógeno tipo I (ISHAQ; NUNN, 2015). A patogênese da progressão de lesões pré-cancerosas para câncer gástrico do tipo intestinal foi descrita na cascata inflamatória com potencial cancerígeno, proposta por Correa *et al.* (1975) (Figura 4). Na cascata proposta, a inflamação crônica ativa é a primeira alteração histopatológica. O início da cascata pode ocorrer pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, resultantes da inflamação crônica, que podem causar danos ao DNA (DÍAZ *et al.*, 2017). Alterações subsequentes são atrofia, metaplasia intestinal, displasia de baixo e alto grau e por fim, adenocarcinoma. A incidência anual de câncer gástrico associada a atrofia e metaplasia intestinal varia de 0 a 10%, de acordo com Revisão sistemática de Bae e Kim (2016).

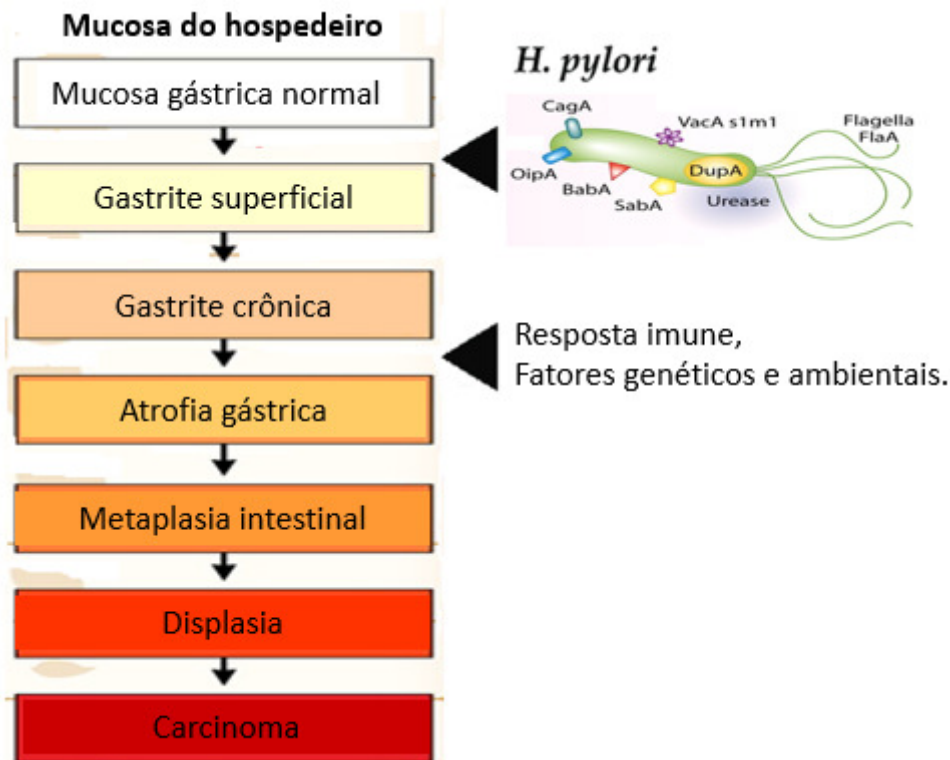


Figura 4. Cascata de Pelayo Correa, um modelo para progressão histológica para câncer gástrico
 Fonte: Adaptado de Huang *et al.* (2019).

2.2 Macrófagos

2.2.1 Histórico do reconhecimento dos macrófagos

Macrófagos são células do sistema imune inato fundamentais para o controle de processos infecciosos e inflamatórios, para o desenvolvimento e cicatrização de tecidos e para manutenção da homeostase do organismo (EPELMAN *et al.*, 2014).

O termo “macrófago” que significa “macro” = grande e “fago” = comedor foi introduzido por Elie Metchnikoff, em 1882 (STEFATER *et al.*, 2011; DIVANGAHI *et al.*, 2015). O biólogo russo observou células dotadas de capacidade de ingestão de partículas infecciosas, que se mostraram importantes na luta contra microrganismos invasores. Desta forma, descreveu também o mecanismo denominado de fagocitose (PACHECO, 2012). Estas células foram nomeadas como fagócitos e divididas em dois subtipos, de acordo com o tamanho: macrófagos e micrófagos (polimorfonucleares). Atualmente, consideram-se quatro tipos de células fagocíticas: os monócitos, os

macrófagos, as células dendríticas e os neutrófilos (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007; PACHECO, 2012). Os monócitos circulam no sangue periférico e, ao alcançarem os tecidos, têm a capacidade de se diferenciar em macrófagos e células dendríticas, (APPELBERG, 2005; CARDOSO, 2012).

Durante muito tempo, sustentou-se a hipótese de que os macrófagos residentes em tecidos na idade adulta surgiriam apenas da diferenciação de monócitos sanguíneos derivados da medula óssea (VAN FURTH *et al.*, 1972). No entanto, essa hipótese tem sido contestada diante das diferenças morfológicas e funcionais observadas entre essas células (EPELMAN *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado existência de duas origens distintas de macrófagos teciduais. A maioria dos macrófagos residentes em tecidos adultos são derivados do saco vitelino, durante o desenvolvimento embrionário. Estas células são extremamente estáveis, não requerem reposição de monócitos ou de qualquer outro precursor para manter as funções homeostáticas vitais (DAVIES *et al.*, 2013; EPELMAN *et al.*, 2014). Os macrófagos teciduais de origem embrionária têm um papel muito mais proeminente no reparo do que as células derivadas de monócitos recrutadas recentemente (LAVINE *et al.*, 2014). Por outro lado, macrófagos derivados de monócitos circulantes auxiliam principalmente na defesa do hospedeiro (DIVANGAHI *et al.*, 2015). Os macrófagos residentes de origem embrionária são caracterizados por níveis elevados de expressão do marcador de macrófago F4/80, enquanto os macrófagos diferenciados de monócitos sanguíneos derivados da medula óssea expressam níveis mais baixos de F4/80 e altos níveis de CD11b. Observou-se também que os macrófagos residentes em tecidos derivados do saco vitelino e derivados de adultos coexistem em muitos órgãos diferentes (GALLI *et al.*, 2011; STEFATER *et al.*, 2011; DAVIES *et al.*, 2013; DIVANGAHI *et al.*, 2015).

2.2.2 Macrófagos e suas funções

Macrófagos são células imunes componentes do sistema fagocítico mononuclear. Estas células estão distribuídas em quase todos os tecidos do organismo, embora sejam mais abundantes no trato gastrointestinal, fígado, baço, vias aéreas superiores e cérebro (PACHECO, 2012). Caracterizam-se pela

heterogeneidade e plasticidade, por apresentarem funções específicas em cada órgão ou tecido e se adaptarem a ambientes mutáveis (ZELLFORSCH *et al.*, 2012).

Os macrófagos participam da resposta do hospedeiro contra patógenos invasores diretamente pelo processo da fagocitose ou indiretamente pela regulação das respostas de outras células imunes.

O mecanismo de fagocitose se inicia a partir da interação entre receptores do macrófago e a partícula invasora, a qual é internalizada em vesículas denominadas fagossomos. O fagossoma se funde com lisossomas, onde as enzimas hidrolíticas, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e várias proteínas antimicrobianas, como a defensina, contribuem para a degradação microbiana (APPELBERG, 2005; PACHECO, 2012). O reconhecimento de diversos estímulos pelos macrófagos é realizado por meio de Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), expressos na superfície ou no citoplasma dos macrófagos. Existem receptores para reconhecimento de microrganismos, para frações do complemento, para citocinas, para imunoglobulinas e outros. A colaboração entre as diferentes famílias de receptores influencia a resposta macrofágica (GEISSMANN *et al.*, 2010). A família de receptores *Toll-like* (TLRs) reconhecem componentes derivados de patógenos (KAWAI, AKIRA, 2010). Em humanos, são reconhecidos 10 tipos de TLRs, que são específicos para diferentes padrões de moléculas associados a patógenos (PAMPS). Os receptores TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem lipoproteínas; TLR3 identifica RNA de fita dupla (ds); TLR4 reconhece LPS; TLR5 reconhece flagelina; TLR7 e TLR8 reconhecem RNA (SS) de cadeia simples; e TLR9 está implicado no reconhecimento de DNA (TAKEDA; AKIRA, 2005).

Os macrófagos são células apresentadoras de antígenos para linfócitos T, comportando-se, assim como efetores da resposta adaptativa. A apresentação de antígenos se faz por meio de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presentes na superfície do macrófago. A interação do macrófago com células TCD4⁺ se dá quando partículas estranhas ao hospedeiro se acoplam às moléculas do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) e com células TCD8⁺, quando as partículas se conjugam às moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I (MHC I) (YANG *et al.*, 2014).

Sinais presentes nos diversos microambientes, derivados de patógenos, células danificadas ou linfócitos ativados induzem fenótipos funcionais distintos dos

macrófagos, permitindo que os macrófagos desempenhem múltiplos papéis na resposta inflamatória e na reparação do tecido (MURRAY; WYNN, 2011).

2.2.3 Produção de óxido nítrico, óxido nítrico sintase induzível e superóxido dismutase pelos macrófagos

Quando os fagócitos são expostos a estímulos bacterianos, ocorre aumento marcante de metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (BHATTACHARYYA *et al.*, 2002), com o objetivo de fornecer energia para a fagocitose (BABIOR, 1978). NO é um radical livre gasoso, facilmente difusível nos líquidos corporais e tecidos, altamente reativo, com meia vida fisiológica de segundos a minutos dependendo da sua concentração e condições químicas ambientais (DUSSE *et al.*, 2003). Nos macrófagos, a síntese de NO resulta da ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que converte o aminoácido L-arginina em outro aminoácido, L-citrulina (ROBBINS; GRISHAM, 1997). A L-citrulina pode ser convertida em dois metabólicos: nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), que por serem facilmente mensurados, são adotados como meio indireto da produção de NO (DUSSE, 1998).

A ação citotóxica do NO resulta da sua ação direta ou cooperativa com intermediários reativos de oxigênio, secretados simultaneamente em macrófagos ativados. A ação tóxica conjunta de NO e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas, que pode produzir dano ao DNA do patógeno, mas também pode afetar a célula produtora de NO e sua vizinhança (ROBBINS; GRISHAM, 1997).

O ânion superóxido é um radical livre, produto de redução enzimática parcial de uma molécula de O_2 pela enzima NADPH-oxidase. O_2^- , produzido por macrófagos ativados, age no centro do fagossomo, mas pode ser liberado no citoplasma e causar danos a membrana celular. Ao ser liberado para o citosol, o O_2^- é convertido a H_2O_2 por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), presente na membrana e na parte interna do invólucro do fagossomo. Mesmo não sendo um radical, H_2O_2 também pode causar danos celulares. Por ação da catalase e do sistema glutathion-peroxidase-glutathion-redutase, H_2O_2 é convertido em oxigênio (O_2) e água

(H₂O) (BARBOSA et al., 2010). A enzima SOD, produzida pelos macrófagos, faz parte de um grupo de metaloenzimas com função de proteger a célula hospedeira da ação tóxica do ânion superóxido (SZETO; HAZEL, 2006).

H. pylori pode induzir a expressão de iNOS por macrófagos de infiltrados inflamatórios crônicos da mucosa gástrica. Fatores de patogenicidade como urease e lipopolissacarídeos podem influenciar o nível de expressão de iNOS (GOBERT *et al.*, 2004).

2.2.4 Polarização de macrófagos

2.2.4.1 Histórico da terminologia polarização de macrófagos

Os macrófagos são caracterizados por notável plasticidade, o que lhes permite a aquisição de fenótipos funcionais distintos, em resposta a estímulos e sinais microambientais encontrados em cada tecido específico (SICA; MANTOVANI, 2012). A polarização ou ativação de macrófagos é um processo pelo qual estas células moldam e agrupam as respostas de acordo com os estímulos percebidos e montam um fenótipo específico (TARIQUE *et al.*, 2015).

A base do conceito de ativação de macrófagos partiu das observações de Elie Metchnikoff, em 1905, que demonstraram que os macrófagos de animais infectados tinham uma capacidade elevada de matar bactérias (MOGHADDAM *et al.*, 2018). A partir de então, o desafio dos estudos posteriores era elucidar os mecanismos pelos quais os macrófagos tornaram-se mais eficazes na eliminação de bactérias. Após décadas, Mackaness, em 1962, introduziu o termo ativação de macrófagos para descrever a atividade antimicrobiana aprimorada de macrófagos em um contexto de infecção bacteriana (MOGHADDAM *et al.*, 2018). North (1973), em estudo sobre a atividade de macrófagos na resistência adquirida a bactérias intracelulares, observou que havia outros fatores celulares independentes, não apenas humorais, que poderiam promover resistência à infecção. O autor notou um espectro de alterações morfológicas e funcionais na atividade antibacteriana de macrófagos que não podiam ser transferidas passivamente no soro (NORTH, 1973). Na mesma época, David (1973) identificou os linfócitos como as principais células

antígeno-específicas responsáveis pela ativação microbicida de macrófagos e consequente transferência de resistência contra famílias de diversas bactérias intracelulares (DAVID, 1973). Posteriormente, Nathan *et al.* (1983), conseguiram demonstrar que a citocina Interferon γ (IFN- γ), produzida pelos linfócitos, era um fator-chave para ativar macrófagos em repouso, tornando-os mais eficientes na apresentação de antígenos, na secreção de mais citocinas pró-inflamatórias e de mediadores tóxicos, além de intensificar a fagocitose mediada por complemento (NATHAN *et al.*, 1983). Este primeiro tipo de ativação antimicrobiana de macrófagos ficou conhecido como ativação clássica de macrófagos (NATHAN *et al.*, 1983).

Estudos subsequentes foram direcionados para a população de células T. Embora os linfócitos T já tivessem sido divididos em células T auxiliares e células T citotóxicas (CANTON, 1975), Mosmann e Coffman (1989) revisaram as diferentes funções e secreção de citocinas entre dois tipos de células T auxiliares clonadas (Th) e propuseram o conceito de Th1 e Th2. Estudos iniciais sobre o papel da interleucina-4 (IL-4) na ativação de macrófagos mostraram que esta citocina, produzida principalmente pelas células Th2, podia converter macrófagos em um estado de ativação especial, distinta da ativação induzida por IFN- γ . Neste tipo de ativação, IL-4 inibiu a explosão oxidativa (produção de espécies reativas de oxigênio) e a produção de IL-1 β e IL-8 (ABRAMSON; GALLIN, 1990). Também foi observado que a IL-4 induziu a expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) (CAO *et al.*, 1989). Experimentos com a Interleucina 13 (IL-13) demonstraram que esta citocina induziu efeitos redundantes e não redundantes aos da IL-4 em macrófagos (MCKENZIE *et al.*, 1993). A partir destas observações juntamente com a descoberta da regulação positiva do receptor de manose de macrófagos (MRC1) como um marcador específico de macrófagos ativado por IL-4 / IL-13, foi proposto pela primeira vez, em 1992, o conceito de macrófagos ativados alternativamente (STEIN *et al.*, 1992).

Mais tarde, Mills *et al.* (2000) propuseram a terminologia M1 e M2 baseados na investigação do metabolismo da arginina dos macrófagos. Os autores observaram que macrófagos provenientes de linhagens de camundongos que exibem padrão Th1 (C57BL/6) e padrão Th2 (Balb/c) apresentaram diferenças qualitativas em sua capacidade de responder aos estímulos inflamatórios. E correlacionaram com

diferenças de respostas observada entre linfócitos Th1 e Th2. A partir do metabolismo da arginina, os macrófagos M1 classicamente ativados produziram um radical livre gasoso multifuncional, o óxido nítrico tóxico (NO), enquanto os macrófagos M2 alternativamente ativados produziram as poliaminas tróficas, envolvidas na reparação tecidual (MILLS *et al.*, 2000). Baseando-se nesse achado, a comunidade científica chegou ao consenso de que os macrófagos M1 (ativados classicamente) apresentam funções inflamatórias e os macrófagos M2 (ativados alternativamente) apresentam funções anti-inflamatórias (MANTOVANI *et al.*, 2004; RÓSZER, 2015). O termo “polarização de macrófagos” refere-se ao fenômeno de dois fenótipos diferentes M1 / M2, que representam dois extremos do espectro de ativação de macrófagos (MOSSER; EDWARDS, 2008; BISWAS *et al.*, 2012).

2.2.4.2 Caracterização e funções dos subconjuntos de macrófagos M1 e M2

A polarização dos macrófagos em fenótipos distintos depende da diversidade de estímulos microambientais, de citocinas produzidas e da duração da exposição ao estímulo (TARIQUE *et al.*, 2015).

Duas subpopulações principais de macrófagos com diferentes funções foram descritas em humanos e camundongos com base na expressão de seus marcadores da superfície celular, produção de fatores específicos e atividades biológicas: macrófagos classicamente ativados M1 considerados pró-inflamatórios e macrófagos alternativamente ativado ou anti-inflamatório M2 (TARIQUE *et al.*, 2015) (Figura 5).

Macrófagos M1 participam predominantemente na proteção a agentes patogênicos intracelulares e a células cancerígenas devido a intensa atividade citotóxica e a resposta imune que desencadeiam (SOLINAS *et al.*, 2009; GEISSMANN *et al.*, 2010).

A polarização de macrófagos M1 é induzida por citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α . No processo de ativação, IFN- α controla a expressão de genes de macrófagos que codificam receptores de citocinas, marcadores de ativação celular e moléculas de adesão celular. A ativação clássica pode ocorrer pelo reconhecimento de Lipopolissacarídeo (LPS) via receptor *toll-like* (TLR) 4. Fator de estimulação de

colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) também é capaz de induzir a polarização dos macrófagos para o fenótipo M1 (MARTINEZ; GORDON, 2014).

Como os macrófagos de perfil M1 são orientados para respostas inflamatórias agudas, caracterizam-se pela produção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, ciclooxigenase-2 (COX-2) e várias quimiocinas que, da mesma forma, induzem a ativação da resposta Th1 como CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13 e CXCL16; CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL15, CCL11, CCL19, CCL20 e CX3CL1 (BEYER *et al.*, 2012; VOGEL *et al.*, 2014).

Adicionalmente, estes macrófagos aumentam a atividade antimicrobiana e antitumoral pela regulação positiva de óxido nítrico (NO) e superóxidos (ROS) e pelo aumento da produção de peptídeos antibacterianos (SICA; MANTOVANI, 2012). A produção de NO em macrófagos M1 ocorre pela indução da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para produção de óxido nítrico a partir da L-arginina (ARNOLD *et al.*, 1977).

A expressão do marcador CD68 e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 nos macrófagos polarizados M1 evidenciam a importante atividade fagocítica deste fenótipo. A capacidade de apresentação de antígeno dos macrófagos M1 é indicada pela expressão de altos níveis do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) (CLARK *et al.*, 2007).

Por estarem implicados no início e na sustentação da inflamação, macrófagos M1 podem trazer dano tecidual induzido por ROS. Para inibir a resposta inflamatória crônica, mecanismos regulatórios são induzidos por agentes anti-inflamatórios dos macrófagos M2, contribuindo para a reparação tecidual, remodelação, vasculogênese e, finalmente, retorno à homeostase (BASHIR *et al.*, 2016).

A polarização M2 ocorre em resposta a sinais de citocinas IL-4 e IL-13. Outras citocinas, como IL-33 e IL-25 amplificam a ativação de macrófagos M2 pela produção de citocinas Th2 (O'SHEA *et al.*, 2010). A regulação positiva de citocinas e quimiocinas, como IL-10, TGF- β , CCL1, CCL17, CCL18, CCL22 e CCL24 também atrai macrófagos não polarizados para polarizar no estado M2 (YANG *et al.*, 2014; GORDON, MARTINEZ-POMARES, 2017). Os Macrófagos M2 são caracterizados

pela expressão de marcadores de superfície como CD 163, receptor de manose CD 206, CD 209, FIZZ1 e Ym1 / 2. Os macrófagos M2 estão envolvidos no processo de prevenção de infecções, na reparação de tecidos, na angiogênese e na imunomodulação (MANTOVANI *et al.*, 2013).

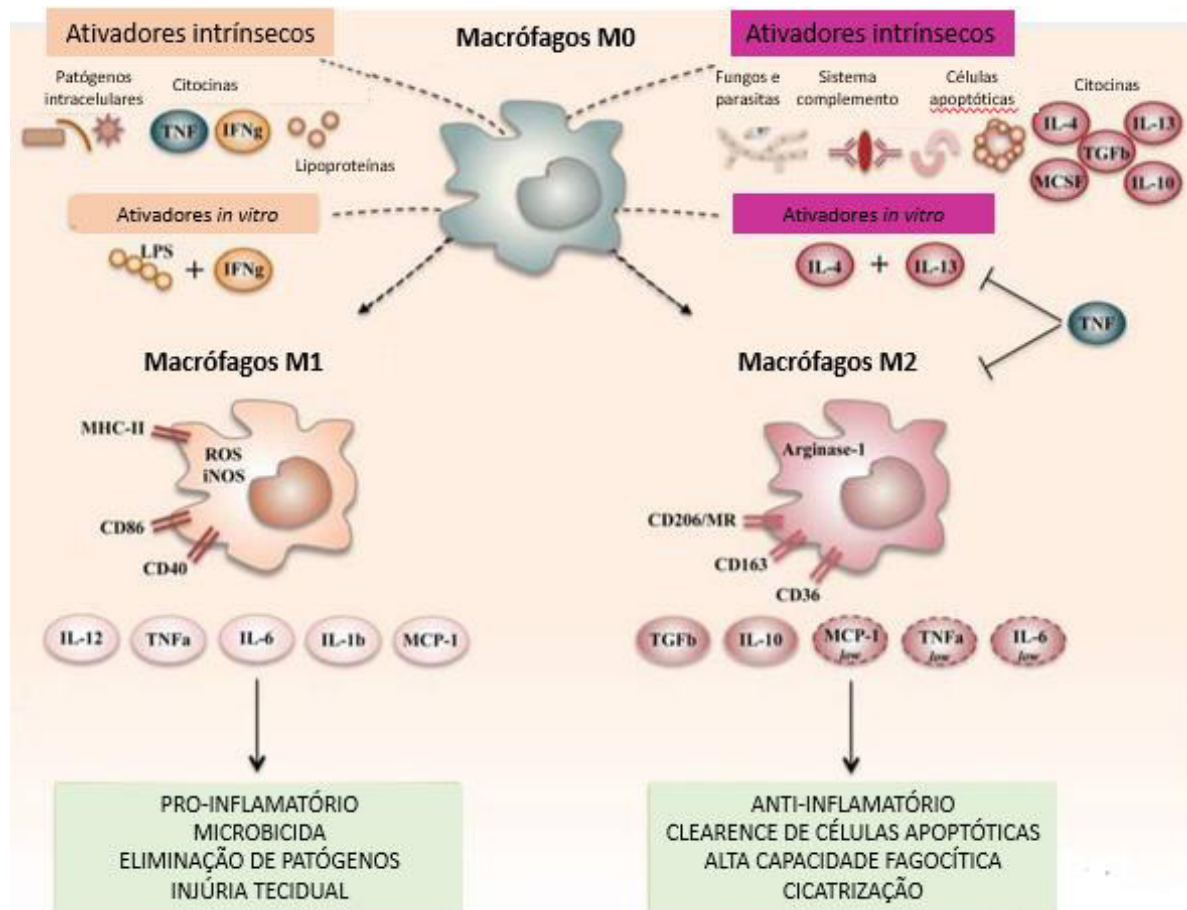


Figura 5. Principais estados de polarização de macrófagos ativados
Fonte: Adaptado de Atri *et al.* (2018).

2.2.4.3 Arginina e dicotomia M1/M2

A polarização dos macrófagos pode ser definida pela forma como metabolizam a L-arginina. Macrófagos M1 metabolizam a L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para produzir NO, que tem ação microbicida, ao passo que macrófagos M2 metabolizam a L-arginina pela arginase 2 (Arg2) para produzir L-ornitina, molécula precursora de poliaminas, putrescina, espermidina, espermina e L-prolina envolvidas em processo de reparação tissular e proliferação celular (WEISSER *et al.*, 2014). Sendo assim, a arginina desempenha papel

fundamental durante a ativação de macrófagos e é capaz de determinar o destino da ativação celular.

O conceito da dicotomia M1/M2 empregando como referência a via de metabolização de arginina, baseou-se em análises de feridas cicatrizantes (MILLS; LEY, 2014). Diante da complexidade de conhecimentos para diferenciar estado funcional dos macrófagos, como marcadores de superfície de macrófagos, requisitos de ativação, elementos de transdução de sinal e regulação de genes, o emprego da expressão arginase versus iNOS tornou-se válida para explicar como o organismo lida com ferimentos. O parâmetro arginase versus iNOS pode explicar situações diversas tais como controle de infecção versus cronicidade ou morte devido a infecção, bem como cicatrização de tecidos versus fibrose exagerada, entre outras (MILLS; LEY, 2014). De um modo geral, macrófagos M1 agem como células pró-inflamatórias (“modo combate”) e macrófagos M2 como células anti-inflamatórias (“modo de cura”) (MURRAY; WYNN, 2011).

A arginina é um aminoácido semi-essencial para humanos, obtida pela ingestão alimentar ou derivada da quebra de proteínas celulares ou ainda pelo neo-síntese renal, a partir da citrulina, também conhecido como eixo intestino-renal para síntese de arginina (WINDMUELLER *et al.*, 1981). No processo de neo-síntese, as proteínas ingeridas são degradadas até arginina, que pode ir para o ciclo da ureia no fígado, ou transformada no epitélio intestinal em ornitina que é convertida em citrulina. A citrulina é transportada para os rins e convertida em arginina (KONTUREK; KONTUREK, 1995). Em macrófagos M1, a arginina é convertida em óxido nítrico e citrulina. A citrulina, de forma cíclica, pode ser convertida em arginina (MACMICKING *et al.*, 1997). O processo de ressíntese da arginina, pelo macrófago M1 é importante para garantir suprimento suficiente de arginina para síntese prolongada de NO em infecções que limitam a disponibilidade da arginina (QUALLS *et al.*, 2012). Macrófagos M1 sintetizam NO a partir da arginina por meio da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (ARNOLD *et al.*, 2014). A transcrição do gene de iNOS é induzida por citocinas pró-inflamatórias, produtos microbianos e hipóxia, enquanto citocinas anti-inflamatórias suprimem a transcrição de iNOS (MODOLELL *et al.*, 1995).

NO recém-produzido contribui para a resposta do hospedeiro contra patógenos ou células tumorais. No entanto, a iNOS uma vez induzida é capaz de

produzir NO por longo tempo e a produção excessiva de NO leva à toxicidade celular e danos aos tecidos (LASKIN, 2009). Na infecção com *H. pylori*, NO reage rapidamente com radicais superóxidos gerados endogenamente, como o ânion superóxido. O estresse oxidativo nas células infectadas contribui para o desenvolvimento de doenças gástricas, incluindo câncer gástrico (BUTCHER *et al.*, 2017; GOBERT; WILSON, 2017).

Em macrófagos M2, a arginina é metabolizada pela enzima arginase, gerando ornitina e ureia. No citosol, a ornitina é convertida em putrescina pela ornitina-descarboxilase (ODC) (ASIM *et al.*, 2010). E nas mitocôndrias, ornitina é convertida em prolina pela ornitina-aminotransferase (LI *et al.*, 2002). A putrescina pode ser metabolizada pela enzima espermidina sintase (SRM) gerando espermidina. A enzima espermina sintetase (SMS) converte espermidina em espermina. Espermina pode ser convertida de volta a espermidina por meio da espermina oxidase (SMOX) (PEGG, 2009). O metabolismo da poliaminas é um processo essencial para a vida de mamíferos. As poliaminas putrescina, espermidina e espermina participam do crescimento, proliferação e diferenciação celular (PEGG, 2009). A produção das poliaminas é regulado pela enzima ODC. A expressão de ODC é regulada por infecções bacterianas (GOGOI *et al.*, 2016; GOBERT *et al.*, 2004). Recentemente, tem sido demonstrado que os níveis de poliaminas podem afetar a transcrição e estabilidade do DNA por meio de alterações das histonas e da estrutura da cromatina (SINGH *et al.*, 2008).

A arginase se apresenta em duas isoformas: Arginase 1 (Arg 1), abundante no fígado e é importante para o ciclo da ureia, e a arginase II (Arg2) é abundante no rim e localiza-se nas mitocôndrias (LI *et al.*, 2007). Ambas, catalisam a mesma reação bioquímica, mas diferem na expressão celular, na regulação específica do tipo de célula e na localização subcelular (MUNDER, 2009).

As enzimas arginase e iNOS competem pelo mesmo substrato arginina (WU; MORRIS, 1998) e como consequência diversas interações cruzadas inibitórias ocorrem entre as duas vias metabólicas da arginina, entre elas: as duas isoformas de arginase são inibidas pelo produto intermediário da síntese de NO, N- hidróxi- L- arginina (NOHA) (HECKER *et al.*, 1995); em macrófagos M2, a arginase restringe a tradução de iNOS pela depleção da arginina (EL-GAYAR *et al.*, 2003);

poliaminas também podem inibir a síntese de NO (SOUTHAN *et al.*, 1994). A expressão de iNOS induzida por LPS é aprimorada pela inibição da síntese de poliaminas por meio da ODC (BAYDOUN; MORGAN, 1998). A espermina suprime a indução de iNOS e do transportador de arginina CAT-2 (MÖSSNER *et al.*, 2001).

Apesar de antagonistas endógenos, arginase e iNOS podem ser co-expressos. iNOS tem mais afinidade pela arginina, mas a atividade máxima da arginase ou taxa catalítica é maior que a da iNOS, sugerindo que similar taxa de utilização de L-arginina em concentrações fisiológicas (WU; MORRIS, 1998).

A ativação de macrófagos requer a captação de arginina exógena para a síntese de proteínas, produção de óxido nítrico por ativação clássica e produção de poliaminas e prolina por ativação alternativa (MARTINEZ *et al.*, 2006). O meio extracelular é a principal fonte de arginina, que é transportada através da membrana plasmática para interior do macrófago por vários sistemas de transporte (CLOSS *et al.*, 2004). Entre eles, a família de transportadores catiônicos de aminoácidos (CAT) é bem caracterizada. Macrófagos expressam CAT-1 em condições de repouso e CAT-2 após ativação clássica e alternativa (CHATURVED *et al.*, 2010). As atividades dos macrófagos são moduladas de acordo com a disponibilidade intracelular da L-arginina (COMALADA *et al.*, 2012). Portanto, a resposta de macrófagos também pode ser regulada pela etapa de captação da arginina.

2.2.4.4 Polarização de macrófagos em infecções bacterianas

A principal função dos macrófagos é a resposta contra infecções bacterianas, virais e parasitárias. A participação dessas células são fundamentais no resultado da infecção para o hospedeiro (MURRAY; WYNN, 2011; WYNN *et al.*, 2013). Os macrófagos expressam uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões na membrana e no citoplasma, mediadores intracelulares e moléculas secretoras envolvidas no reconhecimento e destruição de microrganismos invasores, além da regulação de outras células imunológicas (TAYLOR *et al.*, 2005). No processo infeccioso, a resposta inflamatória dos macrófagos compreende quatro etapas ordenadas: reconhecimento da infecção por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) de macrófagos, recrutamento de monócitos circulantes e/ou proliferação *in situ* de macrófagos residentes no tecido infectado, eliminação de

patógenos e conversão para células supressoras, restauração da homeostase tecidual (GORDON; MARTINEZ-POMARES, 2017). Ao invadir o hospedeiro os patógenos são reconhecidos por PRRs expressos na membrana ou no citoplasma dos macrófagos e inclui os receptores tipoToll (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs). TLRs reconhecem componentes derivados de patógenos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (KAWAI; AKIRA, 2010, 2011). Funcionalmente, pertencem à família dos TLRs, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 eTLR6, presentes na membrana plasmática, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão dentro de vesículas intracelulares (KAWAI; AKIRA, 2011). Ambos os receptores utilizam a proteína adaptadora My88 para iniciar a sinalização celular, ativando fatores de transcrição, como NF- κ B e MAPquinasas, levando a fagocitose e liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, dando início a resposta inflamatória (KAWAI; AKIRA, 2011).

Os macrófagos residentes em tecidos não são suficientes para manter a resposta inflamatória. Dessa forma, o aporte de macrófagos no local da infecção pode ser alcançado pelo recrutamento de monócitos inflamatórios, por meio de quimiocinas e também pela proliferação *in situ* de macrófagos, que pode ser induzida pela citocina IL-4 (SHI; PAMER, 2011).

Após serem reconhecidos, os peptídeos de antígenos são fagocitados, degradados e apresentados à superfície do macrófago pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II), permitindo a ativação de linfócitos T CD4⁺ ou conjugados com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I), interagindo com células T citotóxicas, CD8⁺ (KOPPENSTEINER *et al.*, 2012). A ativação de linfócitos T induz a secreção de citocinas, que por sua vez vão modular a atividade macrofágica (BERGMAN; DÉLIOS, 2010). Linfócitos T ativados podem se diferenciar em fenótipos T auxiliares (Th1), Th2, Th17 e reguladores (Treg) de acordo com o ambiente local das citocinas (WILSON; CRABTREE, 2007). Geralmente, a maioria dos patógenos intracelulares induz respostas Th1, enquanto as bactérias extracelulares estimulam respostas do tipo Th2. A resposta Th1 está associada ao perfil pró-inflamatório enquanto a resposta Th2 induz forte resposta humoral (LINDHOLM *et al.*, 1998).

Para se diferenciar em fenótipos funcionais distintos, os macrófagos respondem aos estímulos do microambiente, como produtos microbianos, células

apoptóticas ou células efectoras da imunidade adaptativa ativadas (MURRAY *et al.*, 2014). A resposta comum de macrófagos à infecção bacteriana envolve a ativação robusta do fenótipo M1 na fase inicial, resultando na produção de grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios, capazes de combater microorganismos invasores e ativar a imunidade adaptativa (WYNN *et al.*, 2013). A persistência da resposta inflamatória mediada por macrófagos M1, sem mecanismos de controle, pode gerar uma tempestade de citocinas, que contribuem para a patogênese da sepse grave (STEARNs-KUROSAWA *et al.*, 2011). Para evitar o excesso de resposta inflamatória, os macrófagos entram em processo de apoptose ou polarizam-se para o fenótipo M2, que auxilia no reparo tecidual (MURRAY; WYNN, 2011). Por outro lado, o fenótipo M2 pode induzir um estado de tolerância ao patógeno e estabelecer estado de portador ou pode progredir para um estado imunossupressor, tornando o hospedeiro mais suscetível à reinfeção, resultando em recaída (SICA *et al.*, 2015). Os macrófagos têm a capacidade de alternar entre os estados de polarização de acordo com o estímulo detectado (ITALIANI *et al.*, 2014). É necessário um equilíbrio entre os dois fenótipos de polarização de macrófagos para manutenção da homeostase do hospedeiro (TARIQUE *et al.*, 2015).

2.3 Polarização de macrófagos em infecção por *Helicobacter pylori*

a) Papel dos macrófagos na infecção por *Helicobacter pylori*

Na infecção provocada por *H. pylori*, a resposta imune do hospedeiro raramente resulta na eliminação da bactéria, que pode persistir infectando o hospedeiro por toda a vida (MUNGAZI *et al.*, 2018; ATHERTON; BLASER, 2009).

A mucosa gástrica normal de adultos e crianças sem infecção por *H. pylori* é preenchida por pequeno número de macrófagos (KRAUSS-ETSCHMANN *et al.*, 2005). Em resposta a infecção por *H. pylori*, macrófagos são as primeiras células recrutadas para a lâmina própria (SUZUKI *et al.*, 2002) e estão associadas à gravidade da gastrite (KRAUSS-ETSCHMANN *et al.*, 2005). Kaparakis *et al.* (2008) demonstraram que a eliminação transitória de macrófagos de camundongos C57BL/6, durante o período inicial de infecção reduziu significativamente a inflamação gástrica,

destacando o papel-chave dos macrófagos para patogenicidade da gastrite associada ao *H. pylori*. Desta forma, a evasão da resposta imune inata e adaptativa é uma das características da infecção por *H. pylori*, que induz uma inflamação crônica capaz de progredir para adenocarcinoma gástrico (WILSON; CRABTREE, 2007; PEEK JR. *et al.*, 2010; HARDBOWER *et al.*, 2014).

A interação entre *H. pylori* e macrófagos pode ocorrer diretamente, quando as bactérias atravessam a barreira epitelial e alcançam a lâmina própria ou indiretamente, através da liberação de produtos bacterianos (ITO *et al.*, 2008). O reconhecimento pelo sistema imune inato de antígenos derivados de *H. pylori* é precoce e mediada por receptores tipo *Toll* (TLRs) e proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NOD). Embora a resposta imune adquirida na infecção por *H. pylori* seja constituída de linfócitos Th1 e Th2, os perfis de citocinas indicam predomínio de uma resposta Th1 (ITOH *et al.*, 1999). A ativação de linfócitos por macrófagos pode ser mediada pela secreção de IL-12. A produção de IL-12 na mucosa gástrica está associada ao desenvolvimento de úlceras pépticas na infecção por cepas de *H. pylori* *cag*⁺ (VINAGRE *et al.*, 2018). Também foi descrito, em infecção humana por *H. pylori*, aumento da produção de IL-17, citocina expressa por células T auxiliares 17 (Th 17) (PARK *et al.*, 2005). IL-17 desempenha um papel mediador na resposta inflamatória do hospedeiro contra patógenos bacterianos, especialmente nas superfícies mucosas (OUYANG *et al.*, 2008). Na mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* também foram encontrados níveis elevados de células T reguladoras (Tregs). O recrutamento de células Tregs para o local da infecção pode limitar a resposta inflamatória (LUNDGREN *et al.*, 2005).

b) Polarização de macrófagos e mecanismos de evasão de *H. pylori*

A participação dos tipos funcionais de macrófagos na infecção por *H. pylori* não é bem definido. Alguns autores têm demonstrado perfil misto M1/M2 de polarização de macrófagos na gastrite não complicada e perfil M1 em lesão pré-neoplásica, caracterizado por um aumento da expressão gênica de iNOS na mucosa gástrica (QUIDING-JÄRBRINK *et al.*, 2010). Sendo assim, observa-se que interferir na ativação dos macrófagos é uma das estratégias empregadas pela bactéria para garantir a persistência da infecção.

Produtos de *H. pylori* interferem na ativação de macrófagos por meio de várias estratégias com o intuito de modular as respostas do hospedeiro e garantir a persistência da infecção. Um mecanismo antimicrobiano essencial para o hospedeiro é a produção de NO por meio da enzima iNOS (BOGDAN *et al.*, 2001). *H. pylori* induz a expressão e atividade de iNOS, demonstrado em macrófagos *in vivo* e *in vitro* (CHATURVEDI *et al.*, 2010; GOBERT *et al.*, 2002). No entanto, apesar da expressão de iNOS na mucosa infectada por *H. pylori*, nota-se que a resposta imune dependente de NO não é vigorosa o suficiente para eliminar a bactéria, que persiste infectando o hospedeiro (CHATURVEDI *et al.*, 2010). Esse fato ficou evidente quando camundongos com deleção genética de iNOS infectados por *H. pylori* apresentaram níveis de colonização bacteriana semelhantes aos de camundongos selvagens (HARDBOWER *et al.*, 2016).

Uma parte da ineficiência do NO, poderia ser pela ação da arginase bacteriana, RocF, que compete pelo substrato L-arginina (CHATURVEDI *et al.*, 2007; GOBERT *et al.*, 2011). Por outro lado, *H. pylori* intacto ou fatores derivados de *H. pylori* são potentes ativadores da enzima antagonista endógena de iNOS, Arg2 e não de Arg 1, (GOBERT *et al.*, 2002; LEWIS *et al.*, 2010, 2011). A regulação positiva de Arg2 é um mecanismo pelo qual *H. pylori* prejudica a atividade antimicrobiana dos macrófagos, restringindo o processo de síntese do NO. Lewis *et al.* (2010, 2011) observaram em macrófagos estimulados por *H. pylori*, *in vitro* e em tecido gástrico de gastrite por *H. pylori*, em camundongos, que a indução da Arg2 por *H. pylori*, promoveu a redução da síntese do NO e que isso ocorreu devido a atenuação na tradução de iNOS. Os autores observaram que houve piora da inflamação gástrica e diminuição da colonização bacteriana em macrófagos murinos com deleção de Arg2, infectados por *H. pylori* (LEWIS *et al.*, 2011).

Posteriormente, Hardbower *et al.* (2016) demonstraram que a deleção de Arg2 resultou na regulação positiva compensatória da síntese e do catabolismo das poliaminas gástricas durante a infecção por *H. pylori*, os quais poderiam contribuir para o aumento da inflamação gástrica e a diminuição da carga bacteriana, independente de iNOS, observada em tecidos gástricos de camundongos com deleção genética de Arg2 e deleção conjunta de Arg2 e iNOS, infectados cronicamente com *H. pylori*. Os autores relataram que o efeito de deleção de Arg2,

em camundongos infectados cronicamente, afetou especificamente a ativação de macrófagos M1, avaliada por meio da expressão de citocina e quimiocinas. No entanto, os marcadores do perfil M2 e do Mregs não foram alterados. Os autores concluíram que Arg2 contribui para a evasão imune de *H. pylori*, restringindo a ativação de macrófagos M1 e pelo metabolismo compensatório das poliaminas. Assim, a indução de Arg2 por *H. pylori* pode inibir a capacidade do macrófago de eliminar a bactéria, além de induzir um perfil funcional dos macrófagos menos inflamatório, favorável a permanência da bactéria no hospedeiro.

Estudo de revisão de Chaturvedi *et al.* (2012) sugeriu os mecanismos pelos quais o metabolismo das poliaminas desregulam a resposta imune do hospedeiro diante da infecção por *H. pylori*. Os autores referem que a indução da enzima espermina oxidase (SMO) por *H. pylori* leva a apoptose de macrófago. O catabolismo da espermina em espermidina, por SMO, leva a liberação de ROS, que despolariza a membrana mitocondrial do fagócito, seguida da liberação de citocromo-c no citosol, ativação de caspase-3 e apoptose de macrófagos (CHATURVEDI *et al.*, 2004).

A bactéria também evita a ação antimicrobiana do NO por meio da indução da enzima ornitina descarboxilase (ODC). Estudos em macrófagos estimulados por *H. pylori* têm demonstrado aumento da expressão e da atividade de ODC (GOBERT *et al.*, 2002; CHATURVEDI *et al.*, 2004). A revisão de Chaturvedi *et al.* (2012) destacou a indução de ODC por *H. pylori* em macrófagos inibe a tradução de iNOS e consequente redução na síntese do NO. De fato, Hardbower *et al.* (2017) observaram que a infecção por *H. pylori* leva a indução de ODC em macrófagos humanos. Adicionalmente, os autores demonstraram em macrófagos murinos, que ODC regula negativamente a ativação M1 na infecção por *H. pylori* e que essa regulação resulta de alterações na estrutura da cromatina, que impede a transcrição gênica pró-inflamatória.

Outra estratégia pela qual *H. pylori* consegue evadir-se da resposta imune dos macrófagos está relacionada ao canal iônico receptor de potencial transitório melastatina 2 (TRPM2). TRPM2 é um canal não seletivo de cálcio expresso na membrana de fagócitos e que atua como um sensor de estresse oxidativo. Fagócitos expressando TRPM2 respondem a espécies reativas de oxigênio (ROS) secretada em locais inflamatórios, liberando citocinas e quimiocinas, importantes para resolução da

inflamação (YAMAMOTO *et al.*, 2008). Estudando TRPM2 na infecção por *H. pylori*, Beceiro *et al.* (2017) demonstraram que a ausência de TRPM2, em macrófagos murinos cocultivados com *H. pylori*, *in vitro*, intensificou a gastrite induzida por *H. pylori* e reduziu a colonização bacteriana. Além de ter desencadeado uma produção aumentada de mediadores inflamatórios e promover polarização M1 de macrófagos, indicando que TRPM2 tem função reguladora e anti-inflamatória. Os autores sugerem que *H. pylori* ativa o TRPM2 em macrófagos para evitar o dano oxidativo provocado pelos fagócitos. Desta forma, *H. pylori* poderia desviar o perfil de polarização antimicrobiano M1, garantindo a sua permanência no hospedeiro. Além de induzir uma inflamação gástrica leve, característica chave da imunopatogênese da bactéria.

A gastrite crônica induzida por *H. pylori* é considerada importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (PEEK; CRABTREE, 2006). Um mecanismo que induz a carcinogênese a partir de processos inflamatórios crônicos é a produção excessiva de radicais livre de oxigênio e nitrogênio. Hemeoxigenase1 (HO-1) é uma enzima com propriedades antioxidantes e constitui um marcador indireto para estresse oxidativo (WEIS *et al.*, 2009). Gobert *et al.* (2014) observaram que a expressão de HO-1 estava aumentada em células mononucleares gástricas de pacientes humanos e macrófagos de camundongos infectados com cepas *H. pylori cagA*⁺. Os autores demonstraram que a deleção genética do *hmx-1* em camundongos infectados com *H. pylori* aumentou a gastrite histológica, que foi associada com respostas aumentadas de M1 / Th1 / Th17, diminuição da resposta de Mreg e redução da colonização de *H. pylori*. Assim, o recrutamento de macrófagos reguladores (Mreg) poderia ser uma estratégia pela qual *H. pylori* regula negativamente a resposta inflamatória do hospedeiro.

Entre os fatores do hospedeiro associados a neoplasia do trato intestinal tem sido estudada a enzima metaloproteinase-7 da matriz (MMP7). MMP7 é uma enzima proteolítica que pode modificar o microambiente da matriz extracelular e promover destruição e remodelamento tecidual (OMAR *et al.*, 2015). Krakowiak *et al.* (2015) (Tabela 1) avaliaram o papel da MMP7 na infecção por *H. pylori*. Os autores observaram que a ausência de MMP7 em macrófagos promoveu polarização de macrófagos para perfil M1 e agravamento das lesões do tecido gástrico, sugerindo que o MMP7 exerce um papel restritivo na lesão gástrica induzida por *H. pylori* e no

desenvolvimento de lesões pré-malignas pela supressão da polarização dos macrófagos M1. Assim, ao induzir MMP7, *H. pylori* consegue mitigar a resposta imune do hospedeiro pela supressão da ativação de macrófago inflamatório, contribuindo para a persistência da bactéria.

Entre os fatores de virulência da bactéria, as cepas cagA+ de *H. pylori* são as que apresentam maior risco de neoplasia gástrica. O sistema de secreção de *H. pylori* cag tipo IV pode translocar o peptidoglicano da bactéria para a célula do hospedeiro, onde é reconhecido pelo receptor domínio de oligomerização de união a nucleotídeos (Nod1) (WATANABE *et al.*, 2010). A expressão de Nod1 foi significativamente diminuída em tecidos de câncer gástrico em comparação com gastrite isolada (SUAREZ *et al.*, 2019). Considerando também a importância de *H. pylori* para a carcinogênese gástrica, Suarez *et al.* (2019) estudaram o papel do Nod1 no câncer induzido por *H. pylori*. Os autores demonstraram, em dois modelos murinos de deficiência genética de Nod1, que a ausência de Nod1 aumenta a intensidade da inflamação e as lesões pré-neoplásicas gástricas em resposta à infecção com *H. pylori*. *In vitro*, o estudo demonstrou mudança de perfil de polarização M2 dos macrófagos deficientes em Nod1, antes da infecção, para perfil M1/M2, após infecção com *H. pylori* e sugerem que este fenótipo misto observado em macrófagos com deleção de Nod1 pode tornar a resposta de macrófagos ineficientes para direcionar perfil Th1 ou Th2, resultando em padrão mais acentuado de inflamação. Além do mais, mudanças de perfis funcionais de macrófagos em um nicho inflamado pode alterar significativamente o risco de carcinogênese (PIAZUELO, *et al.*, 2019). Desta forma, os autores concluíram que na infecção com *H. pylori*, a indução de Nod1 pode exercer seu papel restritivo, alterando a polarização dos macrófagos, levando assim à evasão imune e persistência microbiana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se infecção por *H. pylori* induz a *polarização* dos macrófagos por si só e se esta polarização está relacionada com a gravidade da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Capítulo 1 - Realizar revisão sobre polarização de macrófagos e infecção por *Helicobacter pylori*.
- Capítulo 2 - Investigar se a maior gravidade da infecção por *Helicobacter pylori* está associada com polarização de macrófagos.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo 1 - Polarização de macrófagos em infecção por *Helicobacter pylori*: breve revisão

Artigo a ser submetido no periódico Journal of Immunology, Qualis A1 em Medicina 1, Fator de Impacto 4.718.

Selma Maluf^{1,2}, Antonio Marcus de Andrade Paes³, Flávia Raquel F Nascimento^{4,5} *

¹ Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil.

² Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil.

³ Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Maranhão.

⁴ Laboratório de Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil.

⁵ Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil.

* Autor de correspondência

E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br (FRFN)

RESUMO

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa, que infecta cerca de 45% da população mundial. A maioria dos infectados por *H. pylori* permanece assintomática, apesar de evoluir para gastrite crônica. A gastrite crônica induzida por *Helicobacter pylori* é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais, adenocarcinoma gástrico e linfoma de tecido linfoide associado à mucosa. A persistência da infecção e a presença de inflamação crônica da mucosa gástrica do hospedeiro sugerem que a resposta imune do hospedeiro é inadequada para eliminar a bactéria. Os macrófagos desempenham importante função na resposta imune do hospedeiro contra *H. pylori*. A participação dos tipos funcionais de macrófagos na infecção por *H. pylori* não é bem definido. Sendo assim, esta revisão tem como foco o estudo da polarização dos macrófagos na infecção por *H. pylori* e a relação com os desfechos clínicos. A busca foi realizada nos bancos de dados de PUBMED/MEDLINE, Base de dados da literatura Latino Americana, em Ciência da Saúde (LILACS- BIREME/BVS) e SCIELO. Entender a patogênese de doenças associadas à infecção por *H. pylori* pode ser importante para apoiar futuras abordagens terapêuticas e diagnósticas.

Descritores: *Helicobacter pylori*, Macrófagos, Gastrite crônica, Arginase, Óxido Nítrico Sintase.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a gram-negative bacterium, which infects about 45% of the world's population. Most *H. pylori*-infected people remain asymptomatic, despite progressing to chronic gastritis. Chronic gastritis is considered an important risk factor for the development of gastric and duodenal ulcers, gastric adenocarcinoma and lymphoma of mucosal associated lymphoid tissue. The persistence of *H. pylori* infection and the presence of chronic inflammation of the host gastric mucosa suggests that the host immune response is inadequate to eliminate the bacterium and that it still allows a tolerogenic environment conducive to the pathogen to maintain a chronic inflammatory process. Macrophages play an important role in host defense against *H. pylori*. The involvement of functional types of macrophages in *H. pylori* infection is not well defined. Therefore, this review focuses on the study of macrophages polarization in *H. pylori* infection and the relationship with clinical outcomes. The search was carried out in the databases of PUBMED / MEDLINE, Database of Latin American literature, in Health Science (LILACS- BIREME / BVS) and SCIELO. Understanding the pathogenesis of diseases associated with *H. pylori* infection may be important to support future therapeutic and diagnostic approaches.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Macrophage, Chronic gastritis, Arginase, Nitric Oxide Synthase.

INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa muito bem sucedida no processo de colonização da mucosa gástrica humana, uma vez que infecta 44,3% da população mundial (ZAMANI *et al.*, 2018). Geralmente, a infecção é adquirida durante a infância e raramente é eliminada espontaneamente (ABADI, 2017). A gastrite crônica induzida por *H. pylori* (PEEK *et al.*, 2010; DOOLEY *et al.*, 1989) não causa sintomas na maioria dos indivíduos infectados (MUNGAZI *et al.*, 2018), no entanto, está associada ao risco aumentado para desenvolvimento de úlcera duodenal, úlcera gástrica, adenocarcinoma gástrico e linfoma de tecido linfoide associado a mucosa (MALT) (WROBLEWSKI *et al.*, 2013; HAGYMÁSI *et al.*, 2014; PLUMMER *et al.*, 2016).

A susceptibilidade às doenças associadas à infecção por *H. pylori* varia em diferentes populações e está associada a fatores do hospedeiro, que determinam o tipo e intensidade da resposta imune, aos componentes bacterianos específicos da cepa e fatores ambientais ((DUNNE *et al.*, 2014). Apesar da resposta imune e humoral, a infecção por *H. pylori* pode persistir no ambiente gástrico ao longo da vida do hospedeiro (ABADI *et al.*, 2017). A persistência da infecção sugere falência da resposta imune do hospedeiro para eliminar a bactéria e a presença de inflamação crônica da mucosa gástrica apoiam a ideia de disfunção da resposta imune (HARDBOWER *et al.*, 2013).

Entre as células do sistema imune, os macrófagos desempenham importantes funções para o controle de infecções e homeostase tecidual e estão envolvidos nos desfechos clínicos de diversas doenças (MURRAY; WYNN, 2011). Diante da capacidade versátil dos macrófagos frente a estímulos inflamatórios, estas células foram classificadas, didaticamente, em dois fenótipos funcionais, relacionados a suas funções principais: Macrófagos M1 (combater/lutar) e Macrófagos M2 (curar/restaurar). Os macrófagos dominantes, M1 ou M2, direcionam os linfócitos T para respostas Th1 ou Th2, respectivamente. Desta forma, amplificam positivamente os macrófagos dominantes, estabilizando o fenótipo no cenário da inflamação ou infecção (MILLS, 2012). O equilíbrio M1/M2 mantém a homeostase, enquanto o

desequilíbrio induz a inflamação crônica e a doença (TARIQUE *et al.*, 2015). A participação destes tipos funcionais de macrófagos na infecção por *H. pylori* não é bem definido. Sendo assim, esta revisão busca discutir os mecanismos pelos quais a polarização dos macrófagos na infecção por *H. pylori* podem se relacionar com os desfechos clínicos dos pacientes. Estes conhecimentos poderão ajudar a compreender a patogênese de doenças associadas à infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de futuras abordagens terapêuticas e diagnósticas.

MÉTODOS

Foram utilizados os bancos de dados de PUBMED/MEDLINE e Base de dados da literatura Latino Americana, em Ciência da Saúde (LILACS- BIREME/BVS) e SCIELO, nos quais foram selecionados artigos que abordam os principais aspectos imunológicos da infecção por *H. pylori* relacionados à polarização dos macrófagos.

A pesquisa abrangeu artigos originais e de revisão, no período de 2010 a 2019, publicados na língua inglesa. Foram utilizados como termos de pesquisas: *Helicobacter pylori* AND macrophage AND polarization. Após exclusão de um dos artigos duplicados nas listas dos bancos de dados, foram encontrados 14 manuscritos. Destes, 3 foram excluídos por versar sobre lactobacilos e 1 sobre fitoterápicos. Foram incluídos 10 estudos.

FATORES DE *H. pylori* ASSOCIADOS À COLONIZAÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA

H. pylori é um bacilo gram negativo, de forma espiralada, não-esporulada e microaerófila (GRAHAM, 1998). A capacidade da bactéria para colonizar a mucosa gástrica pode ser atribuída a produção de fatores de virulência específicos, sem os quais a habilidade de colonização de *H. pylori* fica prejudicada (ALGOOD; COVER, 2006).

Muitos dos patógenos ingeridos diariamente pelo homem não são bem sucedidos na colonização devido ao pH ácido da luz gástrica, considerado uma das mais eficientes barreiras biológicas contra infecção bacteriana. No entanto, *H. pylori* possui a enzima urease, que tem ação essencial como fator de colonização. A urease hidrolisa a ureia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, em amônia. A

neutralização do pH da área circundante confere proteção temporária ao patógeno dos efeitos nocivos da acidez gástrica. (VOLAND *et al.*, 2003). Além disso, o aumento do pH, diminui a viscosidade da mucina presente na camada de muco, o que permite a bactéria se movimentar na camada mucosa por meio de flagelos polares (CELLI *et al.*, 2009). *H. pylori* deficiente na produção de flagelos são incapazes de colonizar a mucosa gástrica (MCGEE *et al.*, 2005). Estes movimentos da bactéria são direcionados por meio de resposta quimiotática em direção a camada de muco adjacente às células epiteliais, onde o pH é mais neutro (MCGEE *et al.*, 2005). Mutantes defeituosos em fatores quimiotáticos estão associados com inflamação reduzida e respostas defeituosas de células T efectoras, provavelmente pela redução do número de bactérias próximas às células epiteliais gástricas (WILLIAMS *et al.*, 2007; JOHNSON; OTTEMANN, 2018).

A etapa final da associação do micro-organismo com a mucosa gástrica é a adesão. A adesão é mediada pelas adesinas expostas na superfície da célula bacteriana, como Baba, Saba, ALPA, AlpB, hopZ e OipA (LIVER *et al.*, 1998). A aderência às células epiteliais gástricas é essencial para o desenvolvimento da doença havendo correlação direta entre a fixação bacteriana e degeneração celular (HESSEY *et al.*, 1990). No entanto, apenas 20% de *H. pylori* presentes na mucosa gástrica se aderem à superfície de células epiteliais, com uma maioria exibindo um tropismo para junções intercelulares e, ocasionalmente, para espaços intercelulares mais profundos (NECCHI *et al.*, 2007).

H. pylori pode distribuir-se de maneira focal, segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica (WARREN; MARSHALL, 1984), localizando-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio da superfície ou das fovéolas, em íntimo contato com a membrana luminal das células epiteliais que revestem a mucosa gástrica. Embora *H. pylori* tenha sido considerada por muito tempo uma bactéria extracelular, estudos têm evidenciado que o patógeno ocasionalmente invade a célula epitelial, embora o mecanismo não seja bem compreendido. Uma vez dentro da célula epitelial gástrica, *H. pylori* multiplica-se e protege-se da ação dos antibióticos, o que contribui para a persistência da infecção bacteriana (CHU *et al.*, 2010).

Outros fatores bacterianos participam da persistência da bactéria e da indução de doenças. Lipopolissacarídeo (LPS), expresso na membrana externa de *H.*

pylori, pode induzir uma tolerância imunológica contra os antígenos do patógeno ou de auto-anticorpos que reconhecem células epiteliais gástricas, frequentemente observadas em pacientes com gastrite crônica ativa (APPELMELK, 1997). As enzimas catalase e superóxido dismutase, expressas por todas as cepas de *H. pylori*, participam da neutralização da ação oxidativa de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) produzidos por macrófagos e neutrófilos, promovendo a sobrevivência da bactéria (BENOIT; MAIER, 2016). O fator de virulência de *H. pylori*, a proteína arginase, expressa pelo gene *roc F*, hidrolisa a L-arginina em L-ornitina e ureia. Esta última serve como substrato para enzima urease de *H. pylori*, para produção de amônia, necessária para neutralizar o ácido gástrico (KIM *et al.*, 2013). A proteína CagA de *H. pylori* atua como antígeno altamente imunogênico. Essa proteína é injetada na célula hospedeira, via sistema de secreção do tipo IV, induzindo alterações nas vias do metabolismo da célula hospedeira, resultando em diferentes graus de resposta inflamatória (STEIN *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2016). A toxina de VacA tem sido fortemente associada a um risco aumentado de desenvolver úlcera péptica e câncer de estômago (BLASER; BERG, 2001).

RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori*

A resposta imune do tecido gástrico provocada por *Helicobacter pylori* raramente resulta na eliminação da bactéria, que pode permanecer infectando o hospedeiro por toda a vida (ABADI, 2017). A infecção por *H. pylori* induz resposta inflamatória na mucosa gástrica com a participação de neutrófilos, macrófagos, células plasmáticas, eosinófilos e linfócitos, incluindo células maiores: CD4+ e CD8+ (O'KEEF; MORAN, 2008; ALGOOD; COVER, 2006).

O local onde ocorre o início da resposta imune ao *H. pylori* ainda não está bem definido. *H. pylori* interage diretamente com as células mielóides, quando as bactérias atravessam a barreira epitelial e alcançam a lâmina própria ou indiretamente, através da liberação de produtos bacterianos (ITO *et al.*, 2008).

O reconhecimento pelo sistema imune inato de antígenos derivados de *H. pylori* é precoce e mediada por receptores tipo *Toll* (TLRs) e proteínas com domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NOD), expressos em células

apresentadoras de antígeno (APCs). A ativação destes receptores gera resposta imune adaptativa celular e humoral (BERGMAN; DÉLIOS, 2010). O contato da bactéria com monócitos e outras APCs permite ativação e recrutamento de linfócitos. Linfócitos T CD4 + virgens (T CD4 +) podem se diferenciar em fenótipos T auxiliares (Th1), Th2, Th17 e reguladores (Treg) de acordo com o ambiente local das citocinas (WILSON et al., 2007). Células T auxiliares 1 (Th1) induzem resposta celular, opsonização, anticorpos fixadores de complemento e estão associadas com resposta pró-inflamatória por meio da produção de interleucinas IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-8 e TNF- α (TUMMALA et al., 2004). Em contraste, células T auxiliares 2 (Th 2) estão associadas a produção de Interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- β e induzem forte resposta humoral (LINDHOLM et al., 1998). Geralmente, a maioria dos patógenos intracelulares induz respostas Th1, enquanto as bactérias extracelulares estimulam respostas do tipo Th2. Apesar da resposta imune adquirida a infecção por *H. pylori* ser constituída de linfócitos Th1 e Th2, os perfis de citocinas indicam predomínio de uma resposta Th1. Em infecção humana por *H. pylori* foi descrito aumento da produção de IL-17, citocina expressa por células T auxiliares 17 (Th 17) (PARK et al., 2005). IL-17 desempenha um papel mediador na resposta inflamatória do hospedeiro contra patógenos bacterianos, especialmente nas superfícies mucosas (OUYANG et al., 2008). Em mucosa gástrica de pacientes infectados com *H. pylori* também foram encontrados níveis elevados de células Tregs. O recrutamento de células Tregs para o local da infecção pode limitar a resposta inflamatória (LUNDGREN et al., 2005). A persistência de *H. pylori* no hospedeiro é atribuída à capacidade de fatores bacterianos de induzir uma resposta regulatória subjacente.

Interações entre *H. pylori* e células epiteliais gástricas levam à ativação e translocação de fator nuclear kappa B (NF- κ B) para o núcleo e alteração na transcrição de genes nas células epiteliais, tendo papel importante sobre indução de vários processos inflamatórios (GLOCKER et al., 1998). Produção de IL-8 por células epiteliais leva ao recrutamento de macrófagos, que podem fagocitar as bactérias opsonizadas e produzir ERONs, o que contribui para a disfunção da célula epitelial (FARINATI et al., 1998; OBST et al., 2000).

Macrófagos teciduais são encontrados em número significativamente aumentado em biópsias de mucosa gástrica de humanos persistentemente infectados por *H. pylori* (SUZUKI et al., 2002; ALGOOD et al., 2006; KAPARASKI et al., 2008). Macrófagos participam como ativadores da imunidade adquirida durante infecção com *H. pylori*, como por exemplo, por meio da secreção de IL-12. A produção de IL-12 na mucosa gástrica está associada ao desenvolvimento de úlceras pépticas na infecção por cepas de *H. pylori* *cag*⁺ (VINAGRE et al., 2018). Macrófagos podem desempenhar papel na amplificação da resposta inflamatória pela produção de citocinas, como IL-1, TNF- α e IL-6 (AMEDEI et al., 2006). A secreção de IL-6 por macrófagos pode estar envolvida na perpetuação da resposta inflamatória ao *H. pylori* (ODENBREIT et al., 2006).

POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células fagocíticas da imunidade inata essenciais para o combate de partículas invasoras, promoção de reparo tecidual e homeostase do organismo (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Na inflamação, os macrófagos têm três funções principais: apresentação de antígenos em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), para reconhecimento de linfócitos T; fagocitose e imunomodulação através da produção de diferentes tipos de citocinas e fatores de crescimento (WYNN et al., 2013).

Ao serem recrutados para o local de infecção ou para a célula morta, os macrófagos precisam ser ativados para realizar suas funções. Sinais presentes nos diversos microambientes derivados de patógenos, tecidos lesionados ou células efetoras da imunidade adaptativa ativadas induzem perfis genéticos diferentes na diferenciação dos macrófagos, orientando os estados de polarização funcional dos macrófagos (MURRAY et al., 2014).

Em humanos e em camundongos foram descritos dois subconjuntos funcionais de macrófagos, de acordo com a expressão de seus marcadores de superfície celular, produção de fatores específicos e atividades biológicas, denominados macrófagos M1 classicamente ativados ou inflamatórios e M2 alternativamente ativados ou anti-inflamatórios (MILLS et al., 2000).

Macrófagos M1 polarizam-se por citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α , ou pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), via ativação de STAT1 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 1). A análise do perfil de expressão gênica mostrou que macrófagos de fenótipo M1 secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23, TNF- α e IFN tipo I; e várias quimiocinas, bem como ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e baixos níveis de IL-10 (SICA; MANTOVANI, 2012; VOGEL *et al.*, 2014; ITALIANI *et al.*, 2014). O perfil fenotípico de macrófagos M1 induz a ativação da resposta Th1, facilita a fagocitose mediada pelo complemento e a inflamação do tipo I, além de alta capacidade de apresentação de antígenos e pela fagocitose de detritos de matriz nas fases iniciais da cicatrização (VOGEL *et al.*, 2014; ITALIANI *et al.*, 2014). Portanto, funcionalmente os macrófagos M1 caracterizam-se por atividade antimicrobiana e antitumoral. Participam da eliminação de agentes infecciosos por meio da ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) e subsequente geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MURRAY *et al.*, 2014).

Macrófagos M2 são tipicamente induzidos pelas citocinas Th2, IL-4 e IL-13 via ativação de STAT6. A polarização induzida por IL-13 pode ser amplificada pela citocina IL-33, citocina da família IL-1 (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2009). A polarização M2 também pode ser induzida por IL-10, via ativação de STAT3 (WANG *et al.*, 2014) e pela citocina IL-21 (HASHIMOTO-KATAOKA *et al.*, 2015). Macrófagos M2 possuem um perfil de citocinas anti-inflamatórias, caracterizado por baixa produção de IL-12 e alta produção de IL-10 e TGF- β . Além da produção de quimiocinas que recrutam linfócitos Th2 e células T reguladoras, como CCL17, CCL22 e CCL24 (MARTINEZ *et al.*, 2006). Adicionalmente, regulam positivamente arginase-1 (Arg-1), Ym1 e Fizz, quitinase 1 (CHIA1) e molécula semelhante à resistina alfa (RETNLA) (MARTINEZ; GORDON, 2014). Macrófagos M2 estão associados a secreção de fatores angiogênicos como IL-8, VEGF e EGF4 e aumento do receptor de manose (CD206). Bem como, reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e ROS (KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2009). Funcionalmente, macrófagos M2 promovem a reparação tecidual e a cicatrização de feridas, realizam a depuração de células apoptóticas, combatem parasitas intestinais, possuem propriedades pró-

angiogênicas e pró-fibróticas (JETTEN *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2015). Assim como, participam da formação e progressão tumoral (BELGIOVINE *et al.*, 2016). Macrófagos M2 também têm sido caracterizados pela expressão funcional de marcadores de ativação alternativos e inclui quatro subconjuntos: M2a, induzido por IL-4 ou IL-13; M2b, induzido por complexos imunes e agonistas de receptores TLR ou IL-1; e M2c, induzido por IL-10 e hormônios glicocorticoides; M2d é induzido por agonistas de TLR por meio do receptor de adenosina (CHISTIAKOV *et al.*, 2015; MANTOVANI *et al.*, 2010).

A polarização dos macrófagos pode ser definida pela forma como metabolizam a L-arginina. Macrófagos M1 metabolizam a L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) para produzir NO, que tem ação microbicida, ao passo que macrófagos M2 metabolizam a L-arginina pela arginase 2 (Arg2) para produzir L-ornitina, molécula precursora de poliaminas putrescina, espermidina, espermina e L-prolina envolvidas em processo de reparação tissular e proliferação celular (WEISSER *et al.*, 2013).

Embora, os macrófagos sejam essenciais para controle de infecções e reparo da lesão associada à inflamação, também podem contribuir para danos nos tecidos, durante infecções e doenças inflamatórias (BASHIR *et al.*, 2016). Quando um órgão é afetado por infecção ou inflamação grave, os macrófagos exibem primeiro o fenótipo M1 para liberar TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-23 contra o estímulo, no entanto, a persistência da fase M1 pode causar danos aos tecidos. Para suprimir a inflamação, os macrófagos M2 secretam quantidades elevadas de IL-10 e TGF- β , contribuindo para a reparação tecidual, remodelação, vasculogênese e, finalmente, retorno à homeostase (TARIQUE *et al.*, 2015).

Devido à plasticidade funcional, os macrófagos podem mudar de um fenótipo para outro. Macrófagos M1 expostos a sinais M2 ou vice-versa são capazes de se reprogramar e reverter o perfil de polarização (SICA; MANTOVANI, 2012). A dicotomia de fenótipos de polarização M1/M2 tem origem em modelos animais, no entanto, em humanos, a linha de separação entre macrófagos semelhantes a M1 (*M1-like*) e semelhantes a M2 (*M2-like*) não tem limites nítidos (XU *et al.*, 2013).

Recentemente, tem sido descrito uma população de macrófagos supressores, que participam durante as respostas imunes inatas e adaptativas,

limitando a inflamação. Os macrófagos reguladores (Mreg), produzem IL-10 após estimulação com lipopolissacarídeos (LPS) (SUZUKI *et al.*, 2016) e estão associados à tolerância de transplantes de órgãos sólidos (HUTCHINSON *et al.*, 2011).

POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM DOENÇAS INFECCIOSAS

A ativação de macrófagos tem papel chave na resposta a patógenos bacterianos (GALGANI *et al.*, 2004). Ao serem ativados por patógenos, os macrófagos induzem um fenótipo pró-inflamatório (M1), com a liberação de citocinas, quimiocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para promover a eliminação do patógeno (WEISSER *et al.*, 2013). No entanto, para evitar danos teciduais do hospedeiro e controlar a resposta pró-inflamatória, os macrófagos são induzidos por estímulos microambientais para um fenótipo anti-inflamatório (M2) no sentido de promover reparação tecidual. Os macrófagos têm a capacidade de alternar entre os estados de polarização de acordo com o estímulo detectado (ITALIANI *et al.*, 2014). É necessário um equilíbrio entre os dois fenótipos de polarização de macrófagos para manutenção da homeostase do hospedeiro (TARIQUE *et al.*, 2015).

Revisão de Mège *et al.* (2011) avaliou estudos que empregaram métodos de expressão gênica de alto rendimento para análise de perfil fenotípico dos macrófagos em doenças infecciosas (Tabela 1). Os autores observaram discrepâncias dos perfis de polarização de macrófagos entre estudos *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, o perfil de polarização dos macrófagos em doenças infecciosas pode estar relacionado ao microambiente inflamatório. De fato, Atri *et al.* (2018) destacaram a complexidade da polarização de macrófagos durante doenças infecciosas, enfatizando que a linha de separação da dicotomia M1/M2 em modelos animais, não é óbvia em humanos e que existe um *continuum* entre os extremos de perfis funcionais (Tabela 1). Os autores relataram que tem sido proposto uma polarização *M1-like* em doenças inflamatórias, enquanto em doenças bacterianas, virais e parasitárias crônicas, tem sido proposta uma polarização *M2-like*. A Infecção humana por *H. pylori* foi caracterizada por perfil misto M1/M2 de polarização de macrófagos na gastrite não complicada e perfil M1 em lesão pré-neoplásica, identificado por um aumento da expressão gênica de iNOS na mucosa gástrica, segundo Quiding-Järbrink *et al.* (2010) (Tabela 1). Estes dados sugerem que a resposta excessiva ou a manutenção

prolongada do perfil de polarização M1 pode levar a danos teciduais e contribuir para a patogênese da infecção com *H. pylori*.

POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS E INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori*

Os patógenos, para sobreviver, desenvolvem mecanismos para evitar a resposta antimicrobiana dos macrófagos. A seguir, discorre-se as estratégias empregadas por *H. pylori*.

H. pylori interfere na ativação de macrófagos atenuando a síntese de NO e regulando positivamente as vias de metabolismo de poliaminas

Produtos de *H. pylori* interferem na ativação de macrófagos por meio de várias estratégias com o intuito de modular as respostas do hospedeiro e garantir a persistência da infecção. Um mecanismo pelo qual *H. pylori* prejudica a atividade antimicrobiana dos macrófagos é restringindo o processo de síntese do NO. Gobert *et al.* (2001, 2011) consideraram que a arginase bacteriana, RocF leva a depleção de L-arginina disponível para a produção de NO. Lewis *et al.* (2010) observaram em experimento *in vitro*, em macrófagos estimulados por *H. pylori*, que a indução da Arg2 por *H. pylori* promoveu a redução da síntese do NO e que isso ocorreu devido a atenuação na tradução de iNOS. Os autores demonstraram que a ativação de Arg2 restringiu a disponibilidade de L-arginina intracelular para a tradução de iNOS. Lewis *et al.* (2011) observaram, em modelo murino, que a ausência de Arg2 promoveu o aprimoramento da ativação de macrófagos M1, uma vez que camundongos com deleção de Arg2 apresentaram grau de inflamação da mucosa gástrica mais intenso e redução da colonização de *H. pylori* em relação aos camundongos selvagens. Estes autores levantaram a hipótese de que seus achados eram devido ao aprimoramento da tradução de iNOS e produção de NO (Figura 1). Para confirmar a hipótese de Lewis *et al.* (2011), Hardbower *et al.* (2016) observaram, em modelos murinos de infecção com *H. pylori*, que a ausência simultânea de Arg2 e iNOS levou a um grau mais intenso de inflamação gástrica e redução da colonização bacteriana, em relação aos camundongos selvagens, semelhante ao observado na deleção apenas de Arg2

(Tabela 1) (Figura 1). Estes achados levaram os autores a sugerir que o papel da Arg2 na imunopatogênese por *H. pylori* não depende de iNOS. Deste modo, a indução de Arg2 por *H. pylori* poderia ser um mecanismo de redução da capacidade do macrófago para eliminar a bactéria. Além disso, um perfil funcional dos macrófagos menos inflamatório é favorável a permanência da bactéria no hospedeiro.

Hardbower *et al.* (2016) demonstraram também que a deleção de Arg2 regulou positivamente as vias de metabolismo de poliaminas em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos, uma vez que observaram níveis significativamente aumentados de espermina no tecido gástrico destes modelos murinos com deleção genética de Arg2 (Tabela 1) (Figura 1). Os autores sugeriram que a regulação compensatória da síntese e do catabolismo das poliaminas gástricas durante a infecção por *H. pylori* poderia contribuir para o aumento da inflamação gástrica e diminuição da carga bacteriana independente de iNOS. A explicação potencial para tal fato poderia estar relacionado a viabilidade dos macrófagos. Neste sentido, Chaturvedi *et al.* (2012), em uma revisão, relataram os mecanismos pelos quais o metabolismo das poliaminas desregulam a resposta imune do hospedeiro diante da infecção por *H. pylori* (Tabela 1). Os autores referem que a ativação da enzima espermina oxidase (SMO) por *H. pylori* leva a apoptose de macrófago. O catabolismo da espermina em espermidina, por SMO, leva a liberação de ROS, que despolarizam a membrana mitocondrial do fagócito, seguida da liberação de citocromo-c no citosol, ativação de caspase-3 e apoptose de macrófagos (CHATURVEDI *et al.*, 2004). Assim, outro mecanismo empregado por *H. pylori* para evadir-se da resposta dos macrófagos inclui o aumento do catabolismo de poliaminas, seguido de apoptose de macrófagos.

A bactéria também evita a ação antimicrobiana do NO por meio da indução da enzima ornitina descarboxilase (ODC). A revisão de Chaturvedi *et al.* (2012) destacou que a indução de ODC por *H. pylori* em macrófagos inibe a tradução de iNOS e consequente redução na síntese do NO (Tabela 1). De fato, Hardbower *et al.* (2017) demonstraram que a ausência de ODC em macrófagos de camundongos infectados com *H. pylori* desencadeou produção aumentada de marcadores de polarização de macrófagos M1 e aumento da intensidade da inflamação do tecido gástrico destes modelos murinos com deleção de ODC. Adicionalmente, os autores

demonstraram que a Infecção por *H. pylori* levou a regulação positiva de ODC na mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* (Tabela 1). Estes autores indicaram que macrófagos M1 estavam associados a inflamação gástrica mais intensa e sugeriram que *H. pylori* inibe a ativação de macrófagos M1 pela indução de ODC. Desta maneira, a indução de ODC poderia ser outra forma de fuga de *H. pylori* à resposta inflamatória do hospedeiro.

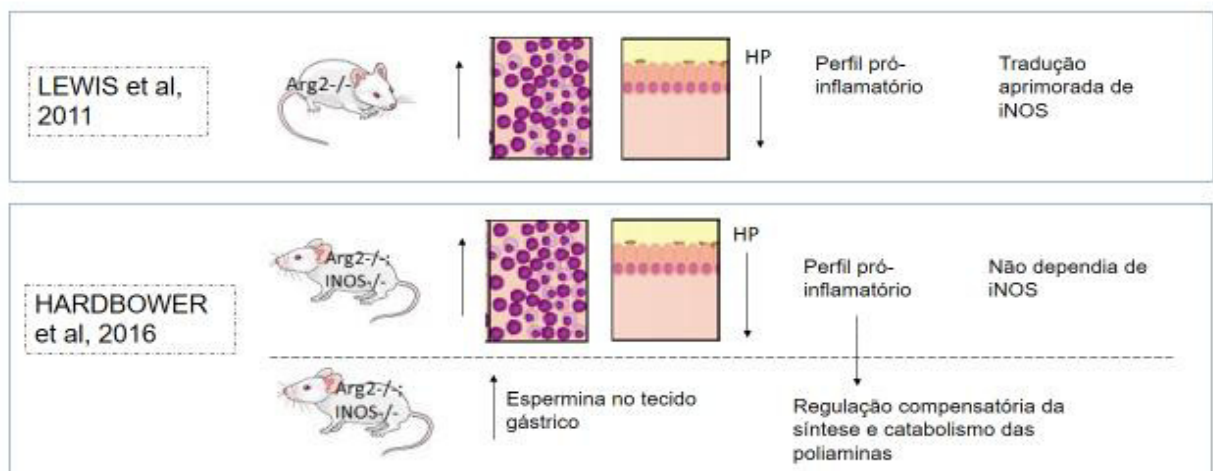


Figura 1. *H. pylori* interfere na ativação de macrófagos M1, pela indução de Arg2 e regulação positiva de poliaminas. Lewis et al.(2011) observaram que camundongos com deleção genética de Arg2, infectados por *H. pylori*, apresentaram no tecido gástrico, grau de inflamação mais intenso e redução da colonização de *H. pylori* em relação aos camundongos selvagens. Os autores deduziram que o perfil pró-inflamatório era devido a tradução aprimorada de iNOS e consequente produção de NO. Hardbower et al. (2016) demonstraram que a deleção genética simultânea de Arg2 e iNOS levou a um perfil pró-inflamatório da mucosa gástrica, semelhante ao observado na deleção apenas de Arg2, mostrando que estes achados não dependiam de iNOS. O acúmulo de Espermina no tecido gástrico deste modelo, fez com que Hardbower et al. (2016) sugerissem que o perfil pró-inflamatório poderia ser pela regulação compensatória de síntese e catabolismo de poliaminas.

H. pylori altera o perfil de polarização antimicrobiano induzindo TRPM2

Outra estratégia pela qual *H. pylori* consegue evadir-se da resposta imune dos macrófagos está relacionada ao canal iônico receptor de potencial transitório melastatina 2 (TRPM2). TRPM2 é um canal não seletivo de cálcio expresso na membrana de fagócitos e que atua como um sensor de estresse oxidativo. Fagócitos expressando TRPM2 respondem a espécies reativas de oxigênio (ROS) secretada em

locais inflamatórios, liberando citocinas e quimiocinas, importantes para resolução da inflamação (YAMAMOTO *et al.*, 2008). Estudando TRPM2 na infecção por *H. pylori*, Beceiro *et al.* (2017) demonstraram que a ausência de TRPM2, em macrófagos murinos cocultivados com *H. pylori*, *in vitro*, desencadeou uma produção aumentada de mediadores inflamatórios e promoveu polarização M1 de macrófagos, indicando que TRPM2 tem função reguladora e anti-inflamatória (Tabela1) (Figura 2A). Adicionalmente, a ausência de TRPM2 intensificou a gastrite induzida por *H. pylori* e reduziu a colonização bacteriana (Figura 2B). Os autores sugeriram que *H. pylori* ativa o TRPM2 em macrófagos para evitar a função antimicrobiana mediada por oxidantes durante a infecção. Desta maneira, pela indução de TRPM2 de macrófagos, *H. pylori* poderia desviar o perfil de polarização antimicrobiano M1, garantindo a sua sobrevivência.

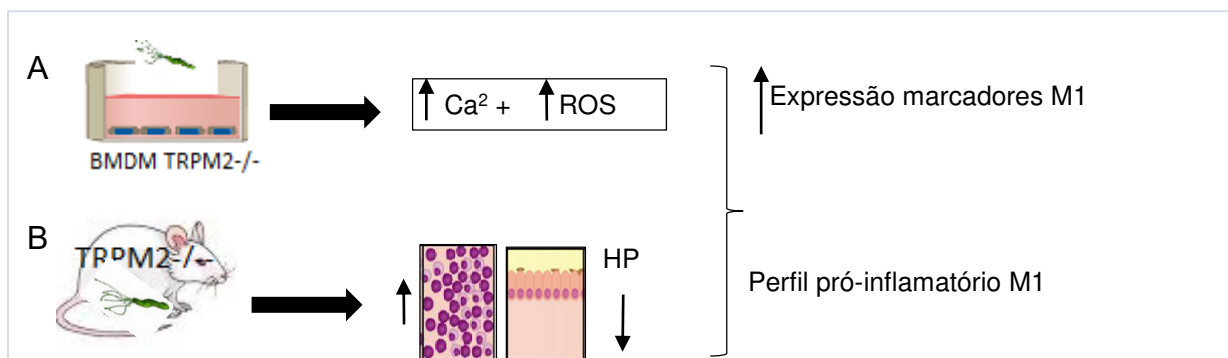


Figura 2. *H. pylori* altera o perfil de polarização antimicrobiano induzindo TRPM2. Beceiro *et al.* (2017) (Figura 2A) demonstraram que macrófagos derivados de camundongos com deleção genética de TRPM2 (BMDM TRPM2^{-/-}) cocultivados com *H. pylori*, *in vitro*, desencadearam sobrecarga intracelular de cálcio e aumento de espécies reativas de oxigênio(ROS), favorecendo perfil de polarização M1. (Figura 2B) Adicionalmente, a ausência de TRPM2 intensificou a gastrite induzida por *H. pylori* e reduziu a colonização bacteriana em tecido gástrico do modelo murino.

H. pylori interfere no perfil de polarização de macrófagos pela indução de HO-1

A gastrite crônica induzida por *H. pylori* é considerada importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (PEEK; CRABTREE, 2006). Um mecanismo que induz a carcinogênese a partir de processos inflamatórios crônicos é a produção excessiva de radicais livre de oxigênio e nitrogênio. Hemeoxigenase1 (HO-1) é uma enzima com propriedades antioxidantes e constitui um marcador indireto para estresse oxidativo (WARGENER *et al.*, 2003). Gobert *et al.* (2014)

observaram expressão aumentada de HO-1 em células mononucleares gástricas de humanos e macrófagos de camundongos infectados com cepas *H. pylori cagA*⁺ (Tabela 1). Os autores demonstraram aumento da expressão de marcadores M1 em macrófagos peritoneais de camundongos com deleção genética do *hmox-1*, infectados por *H. pylori* e redução da expressão de macrófagos reguladores (Mreg). Adicionalmente, observaram aumento da gastrite histológica e redução da colonização bacteriana (Figura 3). Assim, a indução de HO-1 pode ser outra forma que *H. pylori* modula a resposta inflamatória dos macrófagos, favorecendo um perfil regulador e sua sobrevivência.

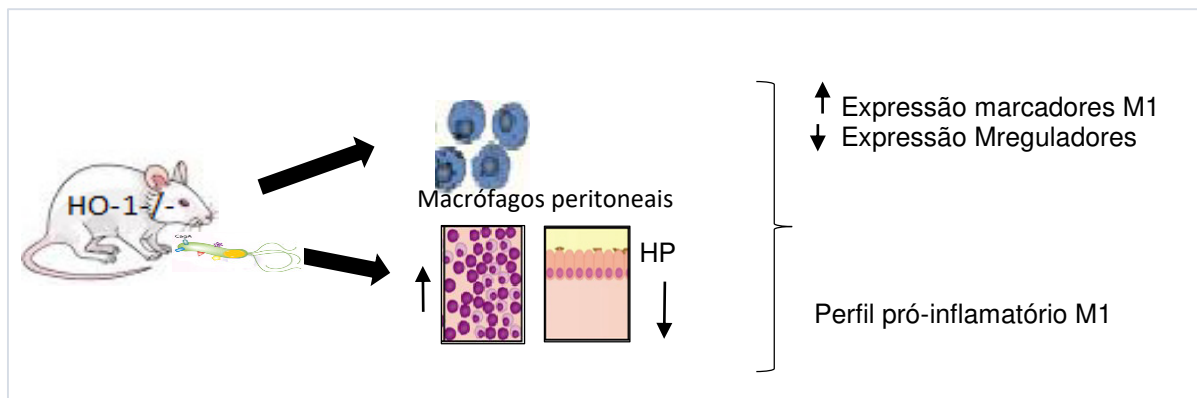


Figura 3. *H. pylori* interfere no perfil de polarização de macrófagos pela indução de HO-1. Gobert *et al.* (2014) demonstraram aumento da expressão de marcadores M1 em macrófagos peritoneais de camundongos com deleção genética do *hmox-1* (HO-1), infectados por *H. pylori* e redução da expressão de macrófagos reguladores (Mreg). Adicionalmente, observaram aumento da gastrite histológica e redução da colonização bacteriana no tecido gástrico deste modelo murino.

H. pylori promove ativação de macrófagos pela indução de MMP7

Entre os fatores do hospedeiro associados a neoplasia do trato intestinal tem sido estudada a enzima metaloproteinase-7 da matriz (MMP7). MMP7 é uma enzima proteolítica que pode modificar o microambiente da matriz extracelular e promover destruição e remodelamento tecidual (OMAR *et al.*, 2015). Krakowiak *et al.* (2015) avaliaram o papel da MMP7 na infecção por *H. pylori* (Tabela 1). Os autores observaram que a ausência de MMP7 em macrófagos, promoveu polarização de macrófagos para perfil M1 e agravamento das lesões do tecido gástrico, sugerindo que o MMP7 exerce um papel restritivo na lesão gástrica induzida por *H. pylori* e no

desenvolvimento de lesões pré-malignas pela supressão da polarização dos macrófagos M1. Assim, ao induzir MMP7, *H. pylori* consegue atenuar a resposta pró-inflamatória do hospedeiro, contribuindo para a persistência da bactéria.

H. pylori altera o perfil de polarização pela indução de Nod1

Entre os fatores de virulência da bactéria, as cepas cag A+ de *H. pylori* são as que apresentam maior risco de neoplasia gástrica. O sistema de secreção de *H. pylori* cag tipo IV pode translocar o peptidoglicano da bactéria para a célula do hospedeiro, onde é reconhecido pelo receptor domínio de oligomerização de união a nucleotídeos (Nod1) (ANDO *et al.*, 2006). A expressão de Nod1 foi significativamente diminuída em tecidos de câncer gástrico em comparação com gastrite isolada (SUAREZ *et al.*, 2015). Considerando também a importância de *H. pylori* para a carcinogênese gástrica, Suarez *et al.* (2019) estudaram o papel do Nod1 no câncer induzido por *H. pylori* (Tabela 1). Os autores demonstraram, em dois modelos murinos de deficiência genética de Nod1, que a ausência de Nod1 aumentou a intensidade da inflamação e as lesões pré-neoplásicas gástricas em resposta à infecção com *H. pylori*. O estudo *in vitro* demonstrou mudança de perfil de polarização M2 dos macrófagos deficientes em Nod1, antes da infecção, para perfil M1/M2, após infecção com *H. pylori* e sugerem que este fenótipo misto observado em macrófagos com deleção de Nod1 pode tornar a resposta de macrófagos ineficientes para direcionar perfil Th1 ou Th2, resultando em padrão mais acentuado de inflamação. Além do mais, mudanças de perfis funcionais de macrófagos em um nicho inflamado pode alterar significativamente o risco de carcinogênese (CASSETTA *et al.*, 2011). Desta forma, os autores concluíram que na infecção com *H. pylori*, a indução de Nod1 pode exercer seu papel restritivo, alterando a polarização dos macrófagos, levando assim à evasão imune e persistência microbiana.

Tabela 1. Artigos selecionados na pesquisa de revisão, no período de 2010 a 2019

Referências	Modelo/espécie	Método	Marcadores de polarização	Implicações
-------------	----------------	--------	---------------------------	-------------

Quiding-Järbrink et al. (2010)	<i>In vivo</i> Tecido gástrico de camundongos C57BL/6	mRNA por PCR-rt	M1 (<i>iNos</i> , <i>Cxcl11</i>), M2 (<i>arginase-1</i> , <i>Fizzi 1</i>) Mreg (<i>Il-10</i>).	Em modelo murino, os macrófagos gástricos são polarizados para M1 durante a infecção com <i>H. pylori</i> .
	Mucosa gástrica Humanos	mRNA por PCR-rt Concentração proteínas por ELISA	M1 (<i>iNos</i> , <i>Cxcl11</i>) e M2 (<i>Ccl17</i> , <i>Ccl18</i> , <i>Cd206</i>) M1 (iNOS); M2 (CCL18)	Infecção humana por <i>H. pylori</i> foi caracterizada por perfil misto M1/M2 de polarização de macrófagos na gastrite não atrófica e perfil M1 em lesão pré-neoplásica.
Mège et al. (2011)	Revisão descritiva	Estudos que empregaram métodos de expressão gênica para análise de perfil fenotípico dos macrófagos em doenças infecciosas combinado com abordagens convencionais	Discrepâncias dos perfis de polarização de macrófagos entre estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Estes estudos revelaram que a ativação de macrófagos em humanos não pode ser prevista pelos resultados de interações típicas de patógeno-macrófago.
Chaturvedi et al. (2012)	Revisão descritiva Análise de estudos de macrófagos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	<i>H. pylori</i> induz ODC e a geração de poliaminas por inibir a tradução de iNOS e síntese NO. <i>H. pylori</i> induz espermina oxidase(SMO). O catabolismo da espermina pela SMO, leva a apoptose de macrófagos.	O metabolismo da arginina pela via arginase-ODC e a ativação SMO, induzidos por <i>H. pylori</i> , leva a apoptose de macrófagos e danos no DNA da célula epitelial.	A via de Arg2-ODC-SMO em macrófagos é importante mediadora da falha da resposta imune do hospedeiro ao <i>H. pylori</i> .
Gobert et al. (2014)	<i>In vivo</i> Macrófagos peritoneais de camundongos hmox-1 ⁻¹	mRNA por PCR-rt	M1(<i>iNos</i> , <i>Tnf- A</i> , <i>Il-12p40</i> , <i>Cxcl10</i> , <i>Il-β</i>); M2 (<i>Ccl17</i>); MREG (<i>Il-10</i> , <i>Light</i> e <i>Ccl-1</i>)	Indução de HO-1 por <i>H. pylori</i> em macrófagos murinos regula negativamente polarização M1 e

				favorece fenótipo Mreg
Krakowiak et al. (2015)	<i>In vivo</i> Tecido gástrico camundongos MMP7 ^{-/-} . <i>In vitro</i> Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos MMP7 ^{-/-} , cocultivados com cepas <i>H. pylori</i> PMSS1	Análise de citocinas e quimiocinas por ensaio de citocinas multiplex tecnologia LUMINEX; mRNA por PCR-rt	IL-1 β , MIP-1 β , TNF- α , IP-10, RANTES, IL-17 <i>Il-1β e iNos</i>	MMP7 exerce um papel restritivo na lesão gástrica induzida por <i>H. pylori</i> pela supressão da polarização dos macrófagos M1.
Hardbower et al. (2016)	<i>In vivo</i> Tecido gástrico de camundongo Arg2 ^{-/-} ; iNOS ^{-/-} <i>In vitro</i> Macrófagos derivados de Medula óssea de camundongos Arg2 ^{-/-} ; iNOS ^{-/-}	mRNA por PCR-rt	M1 (<i>iNos</i> , <i>Il-1β. Tnf-α</i>); Poliaminas (<i>Odc</i> , <i>Amd1</i> , <i>Sat 1</i> , <i>Smox</i>)	ARG2 contribui para a evasão imune do <i>H. pylori</i> através da restrição da ativação do macrófago M1 e do metabolismo da poliamina.
Hardbower et al. (2017)	<i>In vivo</i> Tecido gástrico de camundongo <i>Odc</i> Δ <i>mye</i> .	mRNA por PCR-rt	M1 (<i>Il-1b</i> , <i>Il-6</i> , <i>Il-12a</i> , <i>Il-12b</i> , <i>Tnf-a</i> , <i>iNos</i>); M2 (<i>Arginase 1</i> , <i>Quitinase 3</i> , <i>Resistina-like</i> , <i>Il-10</i> , <i>Tgfb 1</i> , <i>Tnfsf14</i> , <i>Light</i>)	ODC em macrófagos atenua a resposta antimicrobiana de macrófagos M1 durante infecções <i>H. pylori</i> , levando à persistência e patogênese desses organismos.
Beceiro et al. (2017)	<i>In vitro</i> Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos <i>Trpm-2</i> ^{-/-}	mRNA por PCR-rt	M1 (<i>Il-6</i> , <i>Tnf-a</i> , <i>Il-12p40</i>);	TRPM2 tem função reguladora e anti-inflamatória na infecção com <i>H. pylori</i>
Atri et al. (2018)	Revisão descritiva	Polarização de macrófagos durante doenças infecciosas: A dicotomia M1/M2 não é óbvia em humanos e que existe um <i>continuum</i>	Em geral, patógenos ativam macrófagos para perfil pró-inflamatório semelhantes a M1, incluindo citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12.	A polarização diferencial de macrófagos em diversas condições de doenças infecciosas demonstra a plasticidade dessas células, com polarização M1-like evidente

		entre os extremos.	Alguns patógenos bacterianos intracelulares desenvolveram estratégias para prevenir a polarização tipo M1, alterando os mecanismos microbicidas ou direcionando a polarização para um fenótipo M2 para reduzir a resposta inflamatória	em doenças inflamatórias, enquanto uma polarização semelhante a M2 tem sido proposta em doenças bacterianas, virais ou parasitárias crônicas.
Suarez et al. (2019)	<i>In vitro</i> macrófagos de camundongos NOd ^{-/-} cocultivados com cepas de <i>H. pylori</i> PMSS1	mRNA-PCR-rt	M1 (<i>iNos</i> , <i>Tnf-α</i>). M2 (<i>Light</i> , <i>Ym1</i>) Mregs (<i>Il-10</i> , <i>Tgf-β</i>)	NOD1 pode exercer seu papel restritivo alterando a polarização dos macrófagos, levando à evasão e persistência de <i>H. pylori</i> .

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enfim, *H. pylori* dispõe de várias estratégias para colonizar e persistir infectando o hospedeiro. A capacidade do hospedeiro de elaborar uma resposta imune eficiente está diretamente relacionada ao potencial versátil dos macrófagos. O perfil funcional de macrófagos parece moldar as respostas destas células. Observamos, nesta revisão que *H. pylori* emprega mecanismos para desviar a ação antimicrobiana dos macrófagos por meio da indução das enzimas Arg2, ODC e SMO. Estas enzimas restringem a disponibilidade do substrato L-arginina e inibem a tradução da iNOS, o que acarreta prejuízo na produção de NO. Além da ativação de SMO reduzir a viabilidade dos macrófagos.

H. pylori regula negativamente a resposta inflamatória de macrófagos pela indução de TRPM2, de MMP7 e de NOD1, limitando a lesão gástrica induzida por *H. pylori*, pela supressão da polarização dos macrófagos M1.

Nesse sentido, observa-se que o perfil funcional de macrófagos pode ter importante participação no desfecho clínico da infecção por *H. pylori*. A remodelação

dos perfis funcionais de macrófagos pode representar uma estratégia relevante para possíveis intervenções na infecção por *H. pylori*.

ABREVIATURAS

Arg2 - Arginase

CD4+ - Linfócitos T auxiliares

CD8+ - Linfócitos T citotóxicos

ERONs - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

L-arg – L-arginina

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6- Interleucina 6

IL-12 – Interleucina 12

IL-18 – Interleucina 18

IL-23 – Interleucina 23

INF-1- Interferon 1

M1- Macrófagos polarizados para perfil M1

M2- Macrófagos polarizados para perfil M2

NO- Óxido nítrico

ODC- Ornitina descarboxilase

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SMO- Espermina oxidase

TLR- Receptores *Toll-like*

Th1- Linfócitos T *helper 1*

Th2- Linfócitos T *helper 2*

REFERÊNCIAS

ABADI A.T.B. Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. **World J. Gastroenterol.** 2017;23: 2870-2882.

ALGOOD H. M. S.; COVER, T. L. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**. 2006;19(4): 597–613.

ALGOOD; COVER T.L. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interações entre *H. pylori* e host immun defenses. **Clinical Microbiology Reviews**. 2006; 19.4:597-613.

AMEDEI A.; CAPPON A.; CODOLO G.; CABRELLE A.; POLENGHI A.; BENAGIANO M.; TASCA E.; AZZURRI A.; D'ELIOS M.M.; DEL PRETE G.; DE BERNARD M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. **J Clin Invest**. 2006;116(4):1092-101.

ANDO T.; GOTO Y.; MAEDA O; WATANABE O.; ISHIGURO K.; GOTO H. Casual role of *Helicobacter pylori* infection in gastric câncer. **World J Gastroenterol**. 2006.12(2):181-186.

APPELBERG R. As células Fagocíticas. In: AVEVEDO, C. **Biologia Celular e molecular**. Lisboa: LIDEL. 2005;491-502.

APPELMELK BJ, NEGRINI R, MORAN AP, KUIPERS EJ. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. **Trends Microbiol**. 1997;5:70-3.

ASPINALL G. O.; MONTEIRO, M. A. Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. **Biochemistry**. 1996; 35(7): 2498-2504.

ATHERTON J. C.; BLASER, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: Ancient history, modern implications. **Journal of Clinical Investigation**. 2009;119(9): 2475–2487.

ATRI C, GUERFALI FZ, LAOUINI D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **Int J Mol Sci**. 2018;19 (6): 1801.

BASHIR S.; SHARMA Y.; ELAHI A.; KHAN F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflamm Res**. 2016; 65 (1):1-11.

BECEIRO S.; RADIN J.N.; CHATUVEDI R.; PIAZUELO M.B.; HORVARTH D.J.; CORTADO H.; GU Y.; DIXON B.; GU C.; LANGE I.; KOOMOA D.L; WILSON K.T.; ALGOOD H.M.; PARTIDA-SÁNCHEZ S. TRPM2 ion channels regulate macrophage polarization and gastric inflammation during *Helicobacter pylori* infection. **Mucosal Immunol**. 2017; 10(2):493-507.

BENOIT SL, MAIER RJ. *Helicobacter* catalase devoid of catalytic activity protects the bacterium against oxidative stress. **J. Biol. Chem**. 2016; 291: 23366–23373.

BERGMAN M.; D'ELIOS M.M. Cytotoxic T cells in *H. pylori*-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. **J Biomed Biotechnol**.2010:104918.

BACKERT S.; BLASER M.J. The Role of CagA in the Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. **Cancer Res.** 2016;76(14):4028-31.

BLASER M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J Clin Invest.** 2001;7: 767-773.

BRAGA TT, AGUDELO JS, Camara NO. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. **Front Immunol.** 2015; 25:6:602.

CASSETTA L, CASSOL E, POLI G. Macrophage polarization in health and disease. **Scientific World Journal.** 2011;11:2391-402.

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 mucin viscoelasticity. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009;106:14321-6.

CHATURVEDI R.; ASIM M.; HOGE S.; LEWIS N.D.; SINGH K.; BARRY D.P.; DE SABLET T.; PIAZUELO M.B.; SARVARIA A.R.; CHENG Y.; CLOSS E.I.; CASERO R.A. JR.; GOBERT A.P.; WILSON K.T. Polyamines Impair Immunity to *Helicobacter pylori* by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production. **Gastroenterology.** 2010; 139:1686-98.

CHATURVEDI R.; DE SABLE T.; COBURN L.A.; GOBERT A.P.; WILSON K.T. Arginine and polyamines in *Helicobacter pylori*-induced immune dysregulation and gastric carcinogenesis. **Amino Acids.** 2012; 42(2–3):627–640.

CHISTIYAKOV DA, BOBRYSHEV YV, NIKIFOROV NG, ELIZOVA NV, SOBENIN IA, OREKHOV AN. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. **Int J Cardiol.** 2015; 184:436-45.

CHU Y.T.; WANG Y.H.; WU J.J.; LEI H.Y. Invasion and multiplication of *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells: implications for antibiotic resistance. **Infect Immun.** 2010; 8:4157-65.

DOOLEY C.P.; COHEN H.; FITZGIBBONS P.L.; BAUER M.; APPLEMAN M.D.; PEREZ-PEREZ G.I.; BLASER M.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. **N Engl J Med** 1989;321(23):1562-6.

DUNNE C.; DOLAN B.; CLYNE M. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. **World J Gastroenterol.** 2014; 20:5610-24.

FARINATI F, CARDIN R, DEGAN P, RUGGE M, MARIO FD, BONVICINI P, NACCARATO R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. **Gut.** 1998;42:351-6.

FUJIWARA N, KOBAYASHI K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**. 2005;4:281-6.

FUJIKAWA A.; SHIRASAKA D.; YAMAMOTO S.; OTA H.; YAHIRO K.; FUKADA M.; SHINTANI T.; WADA A.; AOYAMA N.; HIRAYAMA T.; FUKA-MACHI H.; NODA M. Mice tyrosine phosphatase Z receptor-deficient mice are resistant to gastric ulcer induction by *Helicobacter pylori* VacA. **Nat Genet**. 2003;33: 375–381.

GALGANI M, BUSIELLO I, CENSINI S, ZAPPACOSTA S, RACIOPPI L, ZARRILLI R. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: role of the cag pathogenicity island. **Infect Immun**. 2004;72(8):4480-4485.

GHOSE C.; PEREZ-PEREZ G.I.; VAN DOORN L.J.; DOMÍNGUEZ-BELLO M.G.; BLASER M.J. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. **J Clin Microbiol**. 2005;43(6):2635-2641.

GLOCKER E.; LANGE C.; COVACCI A.; BERESWILL S.; KIST M.; PAHL H.L. The proteins encoded by the pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are necessary for the activation of NF-kappaB. **Infect Immun**. 1998;66 (5): 2346-2348.

GOBERT A.P.; ASIM M.; PIAZUELO M.B.; VERRIERE T.; SCULL B.P.; DE SABLET T.; GLUMAC A.; LEWIS N.D.; CORREA P.; PEEK R.M. JR.; CHATURVEDI R.; WILSON K.T. Disruption of nitric oxide signaling by *Helicobacter pylori* results in enhanced inflammation by inhibition of heme oxygenase-1. **J Immunol**. 2011;187(10):5370-9.

GOBERT A. P.; VERRIERE T.; ASSIM M.; BARRY D.P.; PIAZUELO M. B.; DE SABLET T.; DELGADO A.G.; BRAVO L.E.; CORREA P.; PEEK R.M JR.; CHATURVEDI R.; WILSON K.T. Heme Oxygenase-1 Dysregulates Macrophage Polarization and the Immune Response to *Helicobacter pylori*. **The Journal of Immunology**. 2014;193(6):3013-3022.

GOBERT A. P.; CHENG, Y.; WANG J. Y.; BOUCHER, J. L.; IYER, R. K.; CEDERBAUM, S. D.; CASERO, R. A. JR.; NEWTON, J. C.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. **J Immunol**. 2002; 168:4692-4700.

GRAHAM D.Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implication for therapy. **Gastroenterology**1998; 115:1272-1277.

HAGYMÁSI K.; TULASSAY Z. *Helicobacter pylori* infection: new pathogenetic and clinical aspects. **World J Gastroenterol**. 2014; 20:6386–6399.

HARDBOWER D. M.; ASSIM M.; MURRAY-STEWART T.; CASERO R.A JR.; VERRIERE T.; LEWIS N.D.; CHATURVEDI R.; PIAZUELO M.B.; WILSON K.T. Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated

polyamine metabolism in response to *Helicobacter pylori* infection. **Amino Acids** 2016; 48.10: 2375–2388.

HARDBOWER D.M.; DE SABLET T.; CHATURVEDI R.; WILSON K.T. Chronic inflammation and oxidative stress: the smoking gun for *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer? **Gut Microbes**. 2013; 4.6:475-81.

HARDBOWER D.M.; ASIM M.; LUIS P.B.; SINGH K.; BARRY D.P.; YANG C.; STEEVES M.A.; CLEVELAND J.L.; SCHNEIDER C.; PIAZUELO M.B.; GOBERT A.P.; WILSON K.T. Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2017;114(5):751–760.

HARDBOWER DM.; PEEK RM JR, WILSON KT. At the bench: *Helicobacter pylori*, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer. **J Leukoc Biol**. 2014; 96:201–212.

HESSEY S. J.; SPENCER J.; WYATT J.I.; SOBALA G.; RATHBONE B.J.; AXON A.T.; DIXON M.F. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. **Gut**. 1990; 31:134–138.

HUANG Y.; WANG Q.; CHENG D.; XU W.; LU N. Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by *Helicobacter pylori*. **Front Cell Infect Microbiol**. 2016; 6:156-159.

HUTCHINSON J.A.; RIQUELME P.; GEISLER E.K.; FÄNDRICH F. Human regulatory macrophages. **Methods Mol Biol**. 2011; 677:181-92.

ITALIANI P.; MAZZA M.; LUCCHESI D.; CIFOLA I.; GEMELLI C.; GRANDE A.; BATTAGLIA C.; BICCIATO S.; BORASCH D. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes *in vitro* e87680. **PLoS ONE**. 2014;9 (2):876-880.

ITO T.; KOBAYASHI D.; UCHIDA K.; TAKEMURA T.; NAGAOKA S.; KOBAYASHI I.; YOKOYAMA T.; FURUKAWA A.; SEKINE M.; ANDO N.; SUZUKI Y.; YAMADA T.; SUZUKI T.; EISH Y. *Helicobacter pylori* invades the gastric mucosa and translocates to the gastric lymph nodes. **Lab Invest**. 2008; 88(6):664-81.

JETTEN N.; VERBRUGGEN S.; GIJBELS M.J.; POST M.J.; DE WINTER M.P.; DONNERS M.M. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis *in vivo*. **Angiogenesis**. 2014;17(1):109-18.

JOHNSON KS, OTTEMANN KM. Colonization, localization, and inflammation: the roles of *H. pylori* chemotaxis *in vivo*. **Curr Opin Microbiol**. 2018; 41:51-57.

KAPARAKIS M.; WALDUCK A.K.; PRICE J.D.; PEDERSEN J.S.; VAN ROOIJEN N.; PEARSE M.J. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. **Infect Immun**. 2008; 76:2235–9.

KIM JS, KIM BW, HAM JH, PARK HW, KIM YK, LEE MY, JI JS, LEE BI, CHOI H. Sequential Therapy for *Helicobacter pylori* Infection in Korea: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gut Liver**. 2013;7:546-51.

KRAKOWIAK M.S.; NOTO J.M.; PIAZUELO M.B.; HARDBOWER D.M.; ROMERO-GALLO J.; DELGADO A.; CHATURVEDI R.; CORREA P.; WILSON K.T, PEEK R.M. Matrix metalloproteinase 7 restrains *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and premalignant lesions in the stomach by altering macrophage polarization. **Oncogene**. 2015; 34(14):1865–1871.

KRAUSS-ETSCHMANN S.; GRUBER R.; PLIKAT K.; ANTONI I.; DEMMELMAIR H.; REINHARDT D.; KOLETZKO S. Increase of antigen-presenting cells in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children. **Helicobacter**. 2005;10(3):214-22.

KUROWSKA-STOLARSKA M, STOLARSKI B, KEWIN P, MURPHY G, CORRIGAN CJ, YING S, PITMAN N, MIRCHANDANI A, RANA B, VAN ROOIJEN N, SHEPHERD M, MCSHARRY C, MCINNES IB, XU D, LIEW FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. **J Immunol**. 2009;183:6469-77.

LEPPER P. M.; TRIANTAFILOU M.; SCHUMANN C.; SCHNEIDER E.M.; TRIANTAFILOU K. Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4. **Cellular Microbiology**. 2005;7 (4):519-528.

LEWIS N.D.; ASIM M.; BARRY D.P.; SINGH K.; DE SABLET T.; BOUCHER J-L.; GOBERT A.P.; CHATURVEDI R.; WILSON K.T. Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. **J. Immunol**. 2010; 184:2572–2582.

LEWIS N.D.; ASIM M.; BARRY D. de Sablet T.; Singh K.; Piazuelo M.B.; Gobert A.P.; Chaturvedi R.; Wilson K.T. Immune evasion by *Helicobacter pylori* is mediated by induction of macrophage arginase II. **J Immunol**. 2011;186(6):3632-41.

LINDHOLM C.; QUIDING-JÄRBRINK M.; LÖNROTH H.; HAMLET A; SVENNERHOLM A.M. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. **Infect Immun**. 1998; 66(12):5964-71.

LIVER D. ARNQVIST A.; OGREN J.; FRICK I.M.; KERSULYTE D.; INCECIK E.T.; BERG D.E.; COVACCI A.; ENGSTRAND L.; BOREN T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**. 1998; 279(34):373–377.

LUNDGREN A.; STROMBERG E.; SJOLING A.; LINDHOLM C.; ENARSSON K.; EDEBO A.; JOHNSON E.; SURI-PAYER E.; LARSSON P.; RUDIN A.; SVENNERHOLM A.M.; LUNDIN B.S. High-expression CD4 + CD25 regulatory T cells in mucosal FOXP3 in patients infected with *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**. 2005; 73:523-53.

MALUF S, SALGADO JV, CYSNE DN, CAMELO DMF, NASCIMENTO JR, MALUF BVT, SILVA LDM, BELFORT MRC, SILVA LA, GUERRA RNM, SALGADO FILHO N, NASCIMENTO FRF. Increased Glycated Hemoglobin Levels in Patients With *Helicobacter pylori* Infection Are Associated With the Grading of Chronic Gastritis. **Front Immunol.** 2020;11:2121.

MARTINEZ F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. **F1000Prime Reports.** 2014;6.

MARTINEZ F. O; GORDON, S; LOCATI, M; MANTOVANI, A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. **The Journal of Immunology.** 2006;177(10):7303–7311.

MANTOVANI A.; SICA A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol.** 2010; 22(2):231-7.

MATSUYAMA M. *et al.* Non-standard biological activities of lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori*. **Journal of Medical Microbiology.** 2001;50(10): 865–869.

MCGEE D. J. M. L.; LANGFORD M.L.; WATSON E.L.; CARTER J.E.; CHEN Y.T.; OTTEMANN K.M. Colonization and inflammation deficiencies in Mongolian gerbils infected by *Helicobacter pylori* chemotaxis mutants. **Infection and Immunity.** 2005;73(3): 1820-1827.

MÈGE J.L.; MEHRAJ V.; CAPO C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Curr Opin Infect Dis.** 2011;24(3):230-4.

MEJÍAS-LUQUE R.; GERHARD M. Immune Evasion Strategies and Persistence of *Helicobacter pylori*. **Curr Top Microbiol Immunol.** 2017;400: 53-71.

MICHALKIEWICZ J., HELMIN-BASA A.; GRZYWA R.; CZERWIONKA-SZAFLARSKA M.; SZAFLARSKA-POPLAWSKA A.; MIERZWA G.; MARSZALEK A.; BODNAR M.; NOWAK M.; DZIERZANOWSKA-FANGRAT K. Innate immunity components and cytokines in gastric mucosa in children with *Helicobacter pylori* infection. **Mediators Inflamm.** 2015;176726.

MILLS CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit Rev Immunol.** 2012;32:463-88.

MORAN A. P.; LINDNER B.; WALSH E. J. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. **J Bacteriol.** 1997;179(2): 6453-6463.

MUNGAZI SG, CHIHAKA OB, MUGUTI GI. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic patients at surgical outpatient department: Harare hospitals. **Ann Med Surg** 2018; 35: 153–7.

MURRAY P. J. MACROPHAGE POLARIZATION. **Annual Review Of Physiology**. 2017; 79:541-566.

MURRAY P.J.; ALLEN J.E.; BISWAS S.K.; FISHER E.A.; GILROY D.W.; GOERDT S.; GORDON S.; HAMILTON J.A.; IVASHKIV L.B.; LAWRENCE T.; LOCATI M.; MANTOVANI A.; MARTINEZ F.O.; MEGE J.L.; MOSSER D.M.; NATOLI G.; SAEIJ J.P.; SCHULTZE J.L.; SHIREY K.A.; SICA A.; SUTTLES J.; UDALOVA I.; VAN GINDERACHTER J,A.; VOGEL S.N.; WYNN T.A. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**. 2014;41(1): 4-20.

MURRAY PJ, WYNN TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:723-37.

NECCHI V, CANDUSSO M; TAVA F.; LUINETTI O.; VENTURA U.; FIOCCA R.; RICCI V.; SOLCIA E. Intracellular, intercellular and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *H. pylori*. **Gastroenterology**. 2007;132, 1009–1023.

O'KEEFFE J, MORAN AP. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to *Helicobacter pylori*. **Helicobacter** 2008; 13: 1– 19.

OBST B.; WAGNER S.; SEWING K.F.; BEIL W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. **Carcinogenesis**. 2000;21(6):1111-1115.

OMAR A. A.; HAGLUND C.; VIROLAINEN S.; HÄYRY V.; ATULA T.; KONTIO R.; SALO T.; SORSA T.; HAGSTRÖM J. MMP-7, MMP-8, and MMP-9 in oral and cutaneous squamous cell carcinomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2015;119(4):459-67.

ODENBREIT S, LINDER S, GEBERT-VOGL B, RIEDER G, MORAN AP, HAAS R. Interleukin-6 induction by *Helicobacter pylori* in human macrophages is dependent on phagocytosis. *Helicobacter*. 2006;11:196-207.

OUYANG W.; KOLLS J. K.; ZHENG Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. **Immunity**. 2008;28(4): 454-467.

PARK H.; LI Z.; YANG X. O.; CHANG S. H.; NURIEVA R.; WANG Y.; HOOD Y. WANG,1 L.; ZHU Z.; TIAN Q.; DONG C.A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**. 2005;6 (11): 1133-1141.

PEEK JR. RM, FISKE C, WILSON KT. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. **Physiol. Rev**. 2010; 90: 831–858.

PLUMMER M.; DE MARTEL C.; VIGNAT. J.; FERLAY J., BRAY F. E.; FRANCESCHI S. Global cancer burden attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet Glob**. 2016; 4:609 -616.

POLK D.B.; PEEK JR. R.M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nat Rev Cancer**. 2010;10(8):593.

QUIDING-JÄRBRINK M.; RAGHAVAN S.; SUNDQUIST M. Enhanced M1 macrophage polarization in human *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. **PLoS One**. 2010;23;5(11):15018-15027.

SICA A.; MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: *In vivo* veritas. **Journal of Clinical Investigation**. 2012;122(3): 787–795.

SOMMER F.; FALLER G.; KONTUREK P.; KIRCHNER T.; HAHN E.G.; ZEUS J.; RÖLLINGHOFF M.; LOHOFF M. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. **Infect Immun**. 1998; 66(11):5543-6.

STEIN M, RAPPUOLI R, COVACCI A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000; 97:1263-8.

SUAREZ G.; ROMERO-GALLO J.; PIAZUELO M.; SIERRA J.C.; DELGADO A.G.; WASHINGTON M.K.; SHAH S.C.; WILSON K.T.; PEEK R.M. JR. Nod1 Imprints Inflammatory and Carcinogenic Responses toward the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. **Cancer Res**. 2019;79.7:1600-1611.

SUAREZ G.; ROMERO-GALLO J.; PIAZUELO M.B.; SIERRA J.C.; DELGADO A.G.; WASHINGTON M.K.; SHAH S.; WILSON K.T.; PEEK R.M. JR. Nod1 Imprints Inflammatory and Carcinogenic Responses toward the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. **Cancer Res**. 2019;79(7):1600-161.

SUZUKI T, KATO K, OHARA S, NOGUCHI K, SEKINE H, NAGURA H, SHIMOSEGAWA T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Pathol Int**. 2002;52:265-71.

SUZUKI H.; HISAMATSU T.; CHIBA S.; MORAN K.; KITAZUME M.T.; SHIMAMURA K.; NAKAMOTO N.; MATSUOKA K.; EBINUMA H.; NAGANUMA M. Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. **Immunology Letters**. 2016; 176:18–27.

TANAKA J, SUZUKI T, MIMURO H, SASAKAWA C. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol** 2003; 5: 395–404.

TARIQUE, A. A.; LOGAN, J.; THOMAS, E.; HOLT, P.G.; SLY, P.D.; FANTINO, E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**. 2015; 53:676-688.

TRAVÉS PG, LUQUE A, HORTELANO S. Macrophages, Inflammation, and Tumor Suppressors: ARF, a New Player in the Game. **Mediated of Inflammation**. 2012, artículo ID 568783, 11 páginas.

TSUBAKIO-YAMAMOTO K.; MATSUURA F.; KOSEKI M.; OKU H.; SANDOVAL J.C.; INAGAKI M.; NAKATANI K.; NAKAOKA H.; KAWASE R.; YUASA-KAWASE M.; MASUDA D.; OHAMA T.; MAEDA N.; NAKAGAWA-TOYAMA Y.; ISHIGAMI M.; NISHIDA M.; KIHARA S.; SHIMOMURA I.; YAMASHITA S. Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;24;375(3):390-4.

TUMMALA S.; KEATES S. KELLY C.P. Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. **Current Opinion in Gastroenterology**. 2004;20 (6):592-597.

VERRECK F. A. W.; BOE T.; LANGENBERG D.M.; ZANDEN L. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. **Journal of Leukocyte Biology**.2006; 79 (2), 285–293.

VINAGRE R. M. D. F.; VINAGRE I. D. F.; VILAR-E-SILVA A.; FECURY A. A.; MARTINS L. C. *Helicobacter pylori* infection and immune profile of patients with different gastroduodenal diseases. **Arquivos de Gastroenterologia**. 2018;55.2:122–127.

VOGEL D. Y.S.; GLIM J.E.; STAVENUITER A.W. BREUR M.; HEIJNEN P.; AMOR S.; DIJKSTRA C.D.; BEELEN R.H. Human macrophage polarization *in vitro*: Maturation and activation methods compared. **Immunobiology**. 2014;219.9:695–703.

VOLAND D.S.P.; WEEKS D.L.; MARCUS E.A.; PRINZ C.; SACHS G. Encoded by the urease gene cluster Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2003; 284:96-106.

XU X.; GRIJALVA A.; SKOWRONSKI A.; VAN EIJK M.; SERLIE M.J; FERRANTE A.W. JR. Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. **Cell Metab**. 2013 18(6):816-30.

XU W.; ZHAO X.; DAHA M.R.; VAN KOOTEN C. Reversible differentiation of pro and anti-inflammatory macrophages. **Mol. Immunol**. 2013; 53:179–186.

WANG YK, KUO FC, WU DC. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. **World J Gastroenterol**. 2015; 21:11221-35.

WAGENER FA, VOLK HD, WILLIS D, ABRAHAM NG, SOARES MP, ADEMA GJ, FIGDOR CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. **Pharmacol Rev**. 2003;55:551-71.

WARREN, J.; MARSHALL B.J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**. 1984;16.8390: 1311-5.

WEISSER. S. B.; MCLARREN K. W.; KURODA E.; SLY L. M. Generation and Characterization of Murine Alternatively Activated Macrophages. **Basic Cell Culture Protocols**. 2013; 946:225-239.

WILLIAMS SM., CHEN YU-TING, ANDERMANN T M., CARTER J. E, MCGEE D J., OTTEMAN K M. N. *Helicobacter pylori* Chemotaxis Modulates Inflammation and Bacterium-Gastric Epithelium Interactions in Infected Mice **Infection and Immunity**. 2007; 75: 3747–3757.

WILSON K. T.; CRABTREE J. E. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. **Gastroenterology**. 2007;133: 288-308.

WROBLEWSKI L.E.; PEEK R. M. JR.; WILSON K.T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. **Clin Microbiol Rev**. 23.4:713-39, 2010. WYNN T. A.; CHAWLA A.; POLLARD J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**. 2013;496 (744): 445–455.

YANG J, ZHANG L, YU C, YANG XF, WANG H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark. Res**. 2014; 2: 1-14.

ZAMANI M.; EBRAHIMTABAR F.; ZAMANI V.; MILLER W.H.; ALIZADEH-NAVAEI R.; SHOKRI-SHIRVANI J.; DERA KHSHAN M.H. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther**. 2018; 47(7):868-876.

4.2 Capítulo 2 - Macrófagos M2 estão associados com densidade de *Helicobacter pylori* em pacientes com gastrite sem lesões pré-neoplásicas

Manuscrito em construção a ser submetido ao periódico *Journal of Gastroenterology*.
Qualis A1. Medicina 1. Fator de Impacto 3.437

RESUMO

Fundo: A associação entre o perfil de polarização de macrófagos e a infecção por *Helicobacter pylori* tem sido demonstrada. Entretanto, não existem evidências se *H. pylori* pode induzir a polarização dos macrófagos por si só e se esta polarização estaria associada com maior susceptibilidade à infecção por *H. pylori*. O objetivo deste estudo foi investigar se a polarização dos macrófagos estaria associada com maior carga bacteriana e maior gravidade da resposta inflamatória da mucosa, avaliada por aspecto histopatológico e endoscópico. **Métodos:** Estudo transversal conduzido com 73 pacientes dispépticos que se submeteram a esofagogastroduodenoscopia e aos testes de detecção de *H. pylori* (urease e histopatológico). A mucosa gástrica avaliada histologicamente considerou a presença de atrofia, metaplasia e densidade de *H. pylori*, de acordo com o Sistema Sydney. O diagnóstico endoscópico considerou a presença de gastrite leve ou gastrite erosiva/úlceras pépticas de acordo com o Sistema Sydney. Destes, 36 pacientes foram *H. pylori* negativo e 37 *H. pylori* positivo. Os pacientes foram então separados em três grupos: um grupo *H. pylori* negativo (n=36), um grupo infectado com *H. pylori* sem lesões pré-neoplásicas (n=16) e outro grupo infectado com lesões pré-neoplásicas (n=21). A presença de macrófagos na mucosa gástrica foi determinada por imunohistoquímica pela expressão do marcador F4/80. O perfil de polarização dos macrófagos foi definido na mucosa gástrica por imunohistoquímica avaliando a expressão na mucosa gástrica de marcadores M1 (iNOS, TNF, HLA-DR) e M2 (Arginase, IL-10, CD163) e também por atividade da Arginase no plasma. **Resultados:** Pacientes com gastrite crônica sem lesões pré-neoplásicas, assim como os pacientes com maior densidade bacteriana apresentaram aumento da expressão de Arginase e CD163 em relação aos não infectados. Pacientes com gastrite erosiva e/ou úlcera péptica apresentaram aumento da expressão de Arginase no grupo de infectados e não no grupo sem infecção. A expressão de IL-10 foi menor nos pacientes com maior densidade bacteriana. Houve correlação positiva entre marcadores M1 e M2. Não houve correlação entre Arginase sistêmica e na mucosa. **Conclusão:** A infecção por *H. pylori* em pacientes com gastrite crônica sem lesões pré-neoplásicas e com maior grau de colonização bacteriana está associada a um perfil de polarização de macrófagos regulador de inflamação M2. No entanto, a carga bacteriana pode ser um fator de desequilíbrio deste perfil anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; Macrófagos; Gastrite crônica; Arginase; Atrofia; Metaplasia.

INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori é um dos patógenos bacterianos mais prevalentes da espécie humana, uma vez que está presente em cerca de metade da população mundial (ZAMANI *et al.*, 2018). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a taxa de prevalência alcança 71,3% (HOOI *et al.*, 2016). Geralmente, a infecção é adquirida durante a infância e pode persistir no ambiente gástrico ao longo da vida do hospedeiro, apesar da resposta imune e humoral (ABADI, 2017).

A gastrite crônica induzida por *H. pylori* é um importante fator de risco para o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais, adenocarcinoma gástrico e linfoma de tecido linfoide associado a mucosa (MALT) (WROBLEWSKI *et al.*, 2010; HAGYMÁSI; TULASSAY, 2014; PLUMMER *et al.*, 2016). O risco de doença varia em diferentes populações e está associado a complexas interações entre fatores do hospedeiro e do patógeno (DUNNE *et al.*, 2014). Apesar de estudos anteriores terem avaliado a patogênese da infecção com *H. pylori*, não se compreende bem o mecanismo pelo qual apenas 15% dos infectados desenvolvem doença (MEJÍAS-LUQUE; GERHARD, 2017).

A persistência da infecção com *H. pylori* e a presença de inflamação crônica da mucosa gástrica do hospedeiro sugere que a resposta imune do hospedeiro é ineficaz para eliminar a bactéria (HARDBOWER *et al.*, 2013). Os macrófagos são considerados reguladores centrais da resposta imune contra *H. pylori* e a sua ativação, ponto crítico no desfecho clínico de várias doenças (CARBO *et al.*, 2013). A capacidade destas células de apresentar respostas funcionais polarizadas em relação a um estímulo inflamatório levou os macrófagos a serem classificados em M1 (resposta imune inata) e M2 (fase de resolução da inflamação) (MURRAY *et al.*, 2014). A forma como metabolizam a L-arginina define a polarização destas células. Macrófagos M1 metabolizam a L-arginina pela iNOS para produzir NO, ao passo que macrófagos M2 metabolizam a L-arginina pela arginase (arg2) para produzir L-ornitina, molécula precursora de putrescina, espermidina, espermina e L-prolina, envolvidas em processo de reparação tissular e proliferação celular (MOSSER *et al.*, 2009; WEISSER *et al.*, 2013). A produção de NO, molécula importante nos processos infecciosos e tumorais (WEISSER *et al.*, 2013) é uma característica intrínseca dos

macrófagos M1 via ativação da iNOS. Macrófagos M1 expressão também altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e alta expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) (CLARK *et al.*, 2007). Em contraste, macrófagos M2 além de alta expressão de IL-6 e IL-10 e arginase (MANTOVANI *et al.*, 2013), também podem expressar CD163 (GORDON *et al.*, 2010), uma molécula de superfície celular considerado marcador de macrófagos teciduais residentes (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 1999) que funciona como sensor imune inato para bactérias (FABRIEK, 2000).

Normalmente, o programa de polarização M1 está associado ao controle de infecções agudas. No entanto, a polarização excessiva de perfil pró-inflamatório pode levar à lesão do tecido e contribuir para a patogênese infecciosa (MANTOVANI *et al.*, 2004). A reprogramação para perfil M2 atenua as reações inflamatórias e acelera o processo de cicatrização de feridas e reparo de tecido (ITALIANI *et al.*, 2014). Assim, o fenótipo M1 pode contribuir para maior susceptibilidade imunológica a lesões teciduais (ATRI *et al.*, 2018) e por outro lado, o fenótipo M2 está relacionado a propriedades imunossupressoras da infecção (TRAVÉS *et al.*, 2012). O balanço entre os fenótipos M1/M2 pode ter papel-chave no desfecho clínico de doenças infecciosas (TARIQUE *et al.*, 2015).

O perfil funcional dos macrófagos na infecção por *H. pylori* não é bem definido. Entretanto, na infecção humana por *H. pylori* foi descrito um perfil de macrófagos M2 por Fehlings *et al.* (2012). Em análise de gastrite atrófica (precursora de neoplasia), Quiding-Järbrink *et al.* (2010) demonstraram perfil de polarização de macrófagos M1 em gastrite atrófica e polarização mista M1/M2 em gastrite não-atrófica. Nosso grupo demonstrou recentemente que infecção com *H. pylori* por si só não alterou a expressão de IL-10 e TNF- α no plasma e na mucosa gástrica de pacientes infectados com *H. pylori*, mas a densidade bacteriana foi correlacionada negativamente com expressão sistêmica e local de IL-10 (MALUF *et al.*, 2020), sugerindo que macrófagos M2 poderiam estar envolvidos de alguma forma no controle das bactérias na mucosa.

Sabe-se que a habilidade de *H. pylori* em estabelecer uma infecção persistente no hospedeiro depende do equilíbrio entre induzir uma resposta imune e escapar dela (LINA *et al.*, 2014). Sendo assim, a hipótese deste estudo é que *H. pylori*

induz polarização de macrófagos para M2 induzindo um perfil regulador da inflamação e que a quebra deste equilíbrio, leva a mudança de perfil do macrófago para M1 e ao agravamento das lesões gástricas. Este conhecimento pode ser importante para entender a patogênese de doenças associadas a infecção por *H. pylori* e apoiar futuras abordagens terapêuticas e diagnósticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra em estudo

Estudo transversal que incluiu 73 pacientes com sintomas dispépticos que se submeteram a esofagogastroduodenoscopia, na Unidade de Endoscopia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), durante o período de 4 meses. Para o diagnóstico de dispepsia considerou-se dor epigástrica persistente ou plenitude pós-prandial ou associação dos dois sintomas (FORD; MOAYYEDI, 2013).

Os pacientes elegíveis para o estudo foram selecionados por amostragem aleatória sistemática segundo a demanda de atendimento do Serviço de Endoscopia do Hospital Universitário da UFMA (HU-UFMA). Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos que aceitaram participar do estudo.

Não foram incluídos os seguintes pacientes: gestantes, portadores de doença crônica consumptiva (câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida), história de cirurgia gástrica, renais crônicos em tratamento hemodialítico, aqueles que tiveram tratamento prévio para erradicação de *H. pylori* e os que estavam recebendo ou receberam duas semanas antes dos testes diagnósticos, antagonistas dos receptores H2, bloqueadores da bomba de prótons e antibióticos quatro semanas antes dos testes (COELHO *et al.*, 2018).

Pacientes que aceitaram o convite para participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP) conforme CAAEE 07989412.0.0000.5086.

Coleta de dados

Os pacientes incluídos no estudo responderam a um formulário com informações referentes às características sociodemográficas, hábitos de vida e história clínica incluindo medicação utilizada e avaliação da dispepsia. Aqueles que declararam serem fumantes regulares, independentemente da quantidade de cigarros foram considerados tabagistas, assim como aqueles que declararam fazer uso de bebida alcoólica regularmente foram considerados etilistas.

Uma amostra de sangue de 5mL foi coletada, devidamente acondicionada e enviada para o Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, para mensuração da atividade da Arginase.

A esofagogastroduodenoscopia foi realizada com equipamento disponível da marca Olympus sistema Exera II (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). As amostras de biópsias foram coletadas do corpo e do antro gástrico para histopatológico e teste da urease (Uretest Promedical, Brazil), de acordo com Coelho *et al.* (2018).

Diagnóstico de *H. pylori*

A presença da infecção com *H. pylori* foi determinada por dois métodos: teste da urease e histopatológico, que utilizam a coleta de espécimes da mucosa gástrica por biópsias endoscópicas (COELHO *et al.*, 2018). Para o teste da urease foram coletados dois fragmentos de mucosa gástrica (antro e corpo) por meio de pinça de biópsia autoclavável e colocados em um tubo estéril contendo uréia e um indicador de pH (vermelho fenol) (Uretest Promedical, Brazil). A amostra ficou em temperatura ambiente por 2h. A mudança da coloração do meio amarelo para vermelho indicou resultado positivo para infecção com *H. pylori*. Para o histopatológico foram coletados quatro fragmentos (dois do corpo e dois do antro) por meio de pinça de biópsia autoclavável. As amostras foram colocadas em dois frascos contendo formalina a 10%, devidamente identificados e encaminhados para o Serviço de Patologia do HU-UFMA. Após preparo com parafina as lâminas foram coradas por Giemsa para facilitar a identificação de *H. pylori*. O diagnóstico do *H. pylori* foi feito pela visualização direta

da bactéria. O resultado positivo para *H. pylori* foi aquele que apresentou um dos testes positivo, conforme 4º Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori* (COELHO *et al.*, 2018).

Diagnóstico endoscópico

Todas as endoscopias foram realizadas por pesquisador integrante do projeto. A esofagogastroduodenoscopia foi realizada com equipamento disponível da marca Olympus sistema Exera II (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). Os pacientes receberam antes do exame, dimeticona gotas e a lidocaína spray (10% xylestesin; Cristália, Brasil) aplicada na orofaringe. A sedação endovenosa foi feita com midazolan (Dormonid, Roche, Brasil) na dose de 0,03 a 0,06 mg/kg (FASSOULAKI *et al.*, 2010). Durante exame de endoscopia, o esôfago, estômago e duodeno foram avaliados e os achados endoscópicos descritos, de acordo com Divisão endoscópica do Sistema Sydney (TYTGAT, 1991). O diagnóstico endoscópico de pangastrite enantematosa leve foi considerado quando se observou áreas de mucosa avermelhadas, esparsas ou difusas, tipo “salpicado/mosaico” ou estrias longitudinais, de leve intensidade, localizadas no corpo e no antro gástrico. O diagnóstico de pangastrite erosiva considerado neste estudo incluiu gastrite erosiva plana e/ou elevada, localizadas no antro e/ou corpo gástrico. Gastrite erosiva plana foi caracterizada pela presença de soluções de continuidade da mucosa, geralmente associada a enantema periférico, recobertas ou não por fibrina ou hematina, menores que 5 mm de diâmetro e com profundidade de até 1 mm. Gastrite erosiva elevada foi caracterizada por leve elevação da mucosa, com umbilicação central contendo exsudato fibrinoso/hematina. A lesão ulcerada péptica foi descrita como solução de continuidade da mucosa, com profundidade perceptível, de mais de 5mm de diâmetro, na mucosa gástrica ou duodenal. De acordo com a esofagogastroduodenoscopia, foram agrupados os pacientes com solução de continuidade da mucosa, erosões e/ou úlcera péptica (Gastrite erosiva e/ou Úlcera péptica-GE/UP) ou sem solução de continuidade da mucosa (Gastrite enantematosa leve/moderada-GEL).

Análise morfológica da mucosa gástrica

As amostras de mucosa gástrica obtidas nas biópsias endoscópicas foram preparadas rotineiramente com parafina e os cortes foram cortados (5 µm de espessura) perpendicularmente à superfície e corados com hematoxilina e eosina. Dois patologistas experientes, sem conhecimento de outros dados dos pacientes, realizaram os exames microscópicos. A análise histológica avaliou a presença ou ausência de atrofia, metaplasia intestinal e densidade de *H. pylori*, de acordo com Sistema Sydney (PRICE, 1991). Atrofia é a perda de glândulas especializadas do antro ou corpo gástrico. Metaplasia intestinal é designada como a substituição do epitélio superficial, foveolar e/ou glandular na mucosa oxíntica ou antral pelo epitélio intestinal, constituído de células de Paneth, caliciformes e enterócitos (SONG *et al.*, 2015). A densidade de organismos semelhantes a *H. pylori* presentes é graduada em colonização leve quando organismos individuais, ou pequenos grupos, cobrem menos de um terço da superfície da mucosa (1+/3+) (HP dens 1). A colonização acentuada é a presença de grandes grupos de organismos na superfície e fossas superiores de mais de dois terços da superfície da mucosa examinada (3+/3+) (HP dens 3). A colonização moderada está entre esses dois polos, (2+/3+) (HP dens 2) (PRICE, 1991). Após análise histopatológica, os pacientes foram agrupados de acordo com a presença de lesões pré-neoplásicas (atrofia e/ou metaplasia) (HP metaplasia) ou ausência de lesões pré-neoplásicas (HP gastritis) e o grupo de pacientes sem infecção por *H. pylori* (Control).

Avaliação de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa gástrica por imunohistoquímica

Blocos de *microarray* de tecido (TMAs) foram montados e os cortes histológicos de 3 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (StarFrost® Advanced Adhesive, Knittel, Alemanha) e levados à estufa a 65 ° C por 1 hora. O tecido gástrico foi desparafinado com xilol e desidratado em álcool. O bloqueio da enzima peroxidase endógena foi realizado com solução de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) a 3%. A recuperação antigênica foi

realizada por aquecimento do tecido por 40 minutos a uma temperatura entre 97°C e 100°C. Em seguida, o anticorpo diluído em PBS-Tween 20 / BSA 1% foi aplicado sobre o tecido gástrico e incubado por 40 minutos. Foram usados anticorpo policlonal de coelho anti-F4/80 (1:600, Genetex, Texas, EUA), anticorpo anti-iNOS (1:100, Spring Bioscience, CA, EUA), anticorpo monoclonal de camundongos anti-TNF- α 1:100, Scytek, Utah, EUA), anticorpo monoclonal de camundongos anti HLA-DP/-DR (MHC II) (1:100, Medasys, França), policlonal anti-IL-10 de coelho (1:800, Biorbyt, Cambridge, Reino Unido), anticorpo policlonal de coelho anti arginase II (0,5:100, Abcam, Massachusetts, EUA), anticorpo policlonal de coelho anti-IL-10 (1:800, Biorbyt, Missouri, EUA), anticorpo anti CD163 (1:200, Leica Biosystems, Alemanha). As lâminas foram lavadas com solução de PBS-Tween 20 pH 7,4 e incubadas com o cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma, St Louis, MO, EUA, D5637-1G) diluído em substrato DAB, por 5 min, à temperatura ambiente. A contra coloração foi feita com Hematoxilina. Os cortes foram desidratados em soluções de álcool e xilol e posteriormente montados. O controle positivo para iNOS foi realizado com secções de pulmão; para TNF- α , secções de linfonodos; para HLA-DR, secções de amígdalas; para Arginase, carcinoma hepatocelular; para IL-10, secções renais e para CD 163, secções de placenta. A expressão dos anticorpos foi avaliada em células epiteliais e na lâmina própria da mucosa gástrica usando um microscópio eletrônico ECLIPSE E800 (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Holanda) com uma objetiva de 20x no filtro EGFP (Emission Green Proteína Fluorescente). Foi realizada a contagem das células marcadas em cinco campos do corte histológico. Os campos foram determinados como “campo superior esquerdo”, “campo superior direito”, “campo inferior esquerdo”, “campo inferior direito” e “centro”. Após a contagem, foi feita a soma dos cinco campos para se obter uma estimativa das células marcadas para cada anticorpo empregado, por lâmina de paciente.

Avaliação da Atividade da Arginase no plasma

Para Avaliação da atividade da Arginase no plasma, uma amostra de sangue (5 mL) foi coletada de cada paciente e enviada ao Laboratório de Imunofisiologia da UFMA. A determinação da atividade de Arginase foi realizada de

acordo com as instruções do fabricante do kit de Ensaio da Atividade da Arginase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Cem microlitros dos plasmas foram transferidos para os filtros Amicon Ultra 0,5 mL – MWCO 10KDa (Merck, Darmstadt, Alemanha) e diluídos com até 500µL de água, a fim de retirar a ureia fisiológica, e centrifugados à 14000 x G durante 30 minutos. O procedimento foi realizado duas vezes. Ao término da filtração, metade do volume obtido foi incubado em placa de 96 poços à 37°C por 2 horas com 10µL do substrato tamponado contendo arginina. A seguir, foram adicionados 200µL do reagente de ureia e a placa novamente incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro à 430 nm e, após a subtração da leitura dos respectivos brancos das amostras, foi determinada a atividade da arginase tendo como referência a absorbância obtida por 50µL de padrão de ureia (1mM), seguindo a fórmula disponibilizada pelo fabricante.

Os resultados foram expressos em unidades/litro, onde 1 unidade de arginase é a quantidade de enzima que converte 1µmol de L-arginina à ornitina e ureia por minuto à 37 °C e pH 9,5.

Análise estatística

As variáveis categóricas foram descritas em tabelas contendo frequências e porcentagem e as variáveis quantitativas com média e desvio padrão. A normalidade foi verificada com o Shapiro Wilk.

Para avaliação da diferença de proporção entre variáveis categóricas foi utilizado os testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher, na comparação de médias foi utilizado o Teste *t* de Student ou teste Mann-Whitney para amostras independentes. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnett ou ANOVA seguido do teste Bonferroni foram usados para verificar as diferenças de variáveis quantitativas entre os grupos de estudo.

Para análises de correlação foi usado o teste de Spearman. As análises foram realizadas no programa Data Analysis and Statistical Software (STATA®) versão 14.0 e no GraphPad Prism 6.0 software. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

*Parâmetros sociodemográficos de pacientes com e sem infecção por *H. pylori* e de pacientes infectados com e sem lesões pré-neoplásicas*

Não houve diferença entre os pacientes com e sem infecção por *H. pylori*, em relação a idade, ao sexo e aos hábitos de tabagismo e etilismo. A maioria da população estudada foi composta por mulheres, com idade média de aproximadamente 50 anos, que não consomem álcool, nem são tabagistas (Tabela 1).

Entre os pacientes com infecção por *H. pylori* houve diferença quanto a idade. A média de idade do grupo com lesões pré-neoplásicas foi maior, em torno de 60 anos. Também não houve diferença entre os grupos com relação aos hábitos de tabagismo e etilismo (Tabela 1).

Tabela 1. Características gerais dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de infecção por *H. pylori* e de infectados com e sem lesões pré-neoplásicas

CARACTERÍSTICAS	GERAL (n = 73)		H. pylori				p-valor	H. pylori Positivo LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS				p-valor
			Negativo(n=36)		Positivo(n=37)			Ausente (n=16)		Presente (n=21)		
	N	%	n	%	n	%		n	%	n	%	
Idade (Média ± Desvio Padrão)	49,45 ± 15,45		48,05 ± 15,83		50,86 ± 15,77		0,453	39,62 ± 12,69		59,85 ± 11,82		<0,001
Sexo							0,118					0,565
Masculino	18	24,66	6	16,67	12	32,43		6	37,50	6	28,57	
Feminino	55	75,34	30	83,33	25	67,57		10	62,50	15	71,43	
Tabagismo							1,000					0,296
Sim	7	9,59	3	8,33	4	10,81		3	18,75	1	4,76	
Não	66	90,41	33	91,67	33	89,19		13	81,25	20	95,24	
Etilismo							0,719					0,680
Sim	13	17,81	7	19,44	6	16,22		2	12,50	4	19,05	
Não	60	82,19	29	80,56	31	83,72		14	87,50	17	80,95	

Sintomas e aspectos endoscópicos de pacientes com e sem infecção por H. pylori e de pacientes infectados com e sem lesões pré-neoplásicas

Não houve diferença entre pacientes infectados e não infectados por *H. pylori*, em relação aos sintomas. A dor epigástrica foi o sintoma predominante. Quanto ao aspecto endoscópico, a pangastrite enantematosa leve foi o diagnóstico mais frequente no grupo dos infectados e o diagnóstico considerado normal foi mais frequente no grupo dos não infectados (Tabela 2).

Entre os infectados não houve diferença quanto aos sintomas. Quanto ao aspecto endoscópico, a pangastrite enantematosa leve foi mais frequente naqueles sem lesões pré-neoplásicas e a gastrite erosiva e/ou úlcera péptica foi mais frequente nos pacientes com lesões pré-neoplásicas (Tabela 2).

Avaliação do aspecto histopatológico de pacientes com e sem infecção por H. pylori e de pacientes infectados com e sem lesões pré-neoplásicas

Pacientes infectados com *H. pylori* apresentaram inflamação crônica moderada e intensa em maior proporção que os pacientes sem infecção. A inflamação crônica leve foi mais prevalente no grupo sem infecção. Da mesma forma, a atividade moderada e intensa ocorreu em maior proporção no grupo dos infectados e a atividade leve ou ausente foi mais frequente no grupo dos não infectados.

O diagnóstico do grupo controle (sem infecção com *H. pylori*) foi confirmado também pela ausência de densidade da bactéria neste grupo. A densidade leve foi a mais frequente no grupo dos infectados (Tabela 3).

Entre os infectados não houve diferença em relação ao grau de inflamação crônica e de atividade. Entretanto, houve diferença entre os grupos em relação à densidade de *H. pylori*. O grupo sem lesões pré-neoplásicas apresentou maior carga bacteriana e o grupo com lesões pré-neoplásicas apresentou menor densidade de *H. pylori* (Tabela 3).

Tabela 2. Análise clínica e endoscópica dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de infecção por *H. pylori* e de infectados com e sem lesões pré-neoplásicas.

CARACTERÍSTICAS	GERAL (n = 73)		<i>H. pylori</i>				p-valor	<i>H. pylori Positivo</i> LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS				p-valor
			<i>Negativo</i> (n=36)		<i>Positivo</i> (n=37)			<i>Ausente</i> (n=16)		<i>Presente</i> (n=21)		
	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%	
Sintomas							0,085					0,800
<i>Dor epigástrica</i>	47	64,38	24	66,67	23	62,16		9	56,25	14	66,67	
<i>Plenitude</i>	21	28,77	12	33,33	9	24,32		4	25,00	5	23,81	
<i>Dor epigástrica + plenitude</i>	5	6,85	0	-	5	13,51		3	18,75	2	9,52	
Endoscopia							0,048					0,005
<i>Normal</i>	14	19,17	11	30,55	3	10,81		3	18,75	0	-	
<i>Pangastrite leve</i>	36	49,31	16	44,44	20	64,86		11	68,75	9	42,85	
<i>Gastrite erosiva/ Úlcera péptica</i>	23	31,50	9	25,00	14	24,32		2	12,50	12	57,14	

Tabela 3. Análise histopatológica da mucosa gástrica dos pacientes de acordo com a presença ou ausência de infecção por *H. pylori* e de infectados com e sem lesões pré-neoplásicas.

CARACTERÍSTICAS	GERAL (n = 73)		<i>H. pylori</i>				p-valor	<i>H. pylori Positivo</i> LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS				p-valor
			<i>Negativo</i> (n=36)		<i>Positivo</i> (n=37)			<i>Ausente</i> (n=16)		<i>Presente</i> (n=21)		
	N	%	n	%	n	%		n	%	n	%	
HISTOPATOLOGIA												
Inflamação crônica							<0,001					0,434
<i>Ausente</i>	3	4,11	3	8,33	0	-		-	-	-	-	
<i>Leve</i>	29	39,73	23	63,89	6	16,22		4	25,00	2	9,52	
<i>Moderada</i>	37	50,68	10	27,78	27	72,97		10	62,50	17	80,95	
<i>Intensa</i>	4	5,48	0	-	4	10,81		2	12,50	2	9,52	
Atividade							<0,001					0,066
<i>Ausente</i>	17	23,29	17	47,22	0	-		-	-	-	-	
<i>Leve</i>	35	47,95	19	52,78	16	43,24		4	25,00	12	57,14	
<i>Moderada</i>	16	21,92	0	-	16	43,24		8	50,00	8	38,10	
<i>Intensa</i>	5	6,85	0	-	5	13,51		4	25,00	1	4,76	
Densidade <i>H. pylori</i>							<0,001					<0,001
<i>Ausente</i>	36	49,31	36	100,00	0	-		-	-	-	-	
<i>Leve 1+/3+</i>	14	19,18	0	-	14	37,84		2	12,50	12	57,14	
<i>Moderada 2+/3+</i>	11	15,07	0	-	11	29,73		3	18,75	8	38,10	
<i>Intensa 3+/3+</i>	12	16,44	0	-	12	32,43		11	68,75	1	4,76	

Pacientes infectados por H. pylori apresentaram maior expressão de macrófagos e de Arginase na mucosa gástrica

Com o intuito de investigar se a polarização de macrófagos poderia estar associada com maior susceptibilidade à infecção por *H. pylori*, analisou-se na mucosa gástrica de pacientes infectados com *H. pylori*, a expressão de marcadores de macrófagos: F4/80; marcadores de M1: iNOS, TNF- α , HLA-DR e marcadores de M2: Arginase, IL-10 e CD163. Os pacientes infectados foram agrupados de acordo com a presença ou ausência de lesões pré-neoplásicas (atrofia e metaplasia) determinadas pela avaliação histológica da mucosa gástrica.

O número de células F4/80⁺ (macrófagos) foi maior em pacientes infectados com *H. pylori* em relação aos controles (Figura 1A). Não houve diferença entre infectados e controles quanto a expressão de marcadores associados com macrófagos do perfil M1, tais como: iNOS (Figura 1B), TNF- α (Figura 1C) e HLA-DR (Figura 1D). Entretanto, a expressão de Arginase foi maior na mucosa gástrica dos infectados em relação aos controles (Figura 1E). Mas, não houve diferença nos demais marcadores de M2, tais como: IL-10 (Figura 1F) e CD163 (Figuras 1G). Os dados sugerem que a presença da bactéria na mucosa pode levar a maior expressão de macrófagos com perfil M2 no sítio infeccioso.

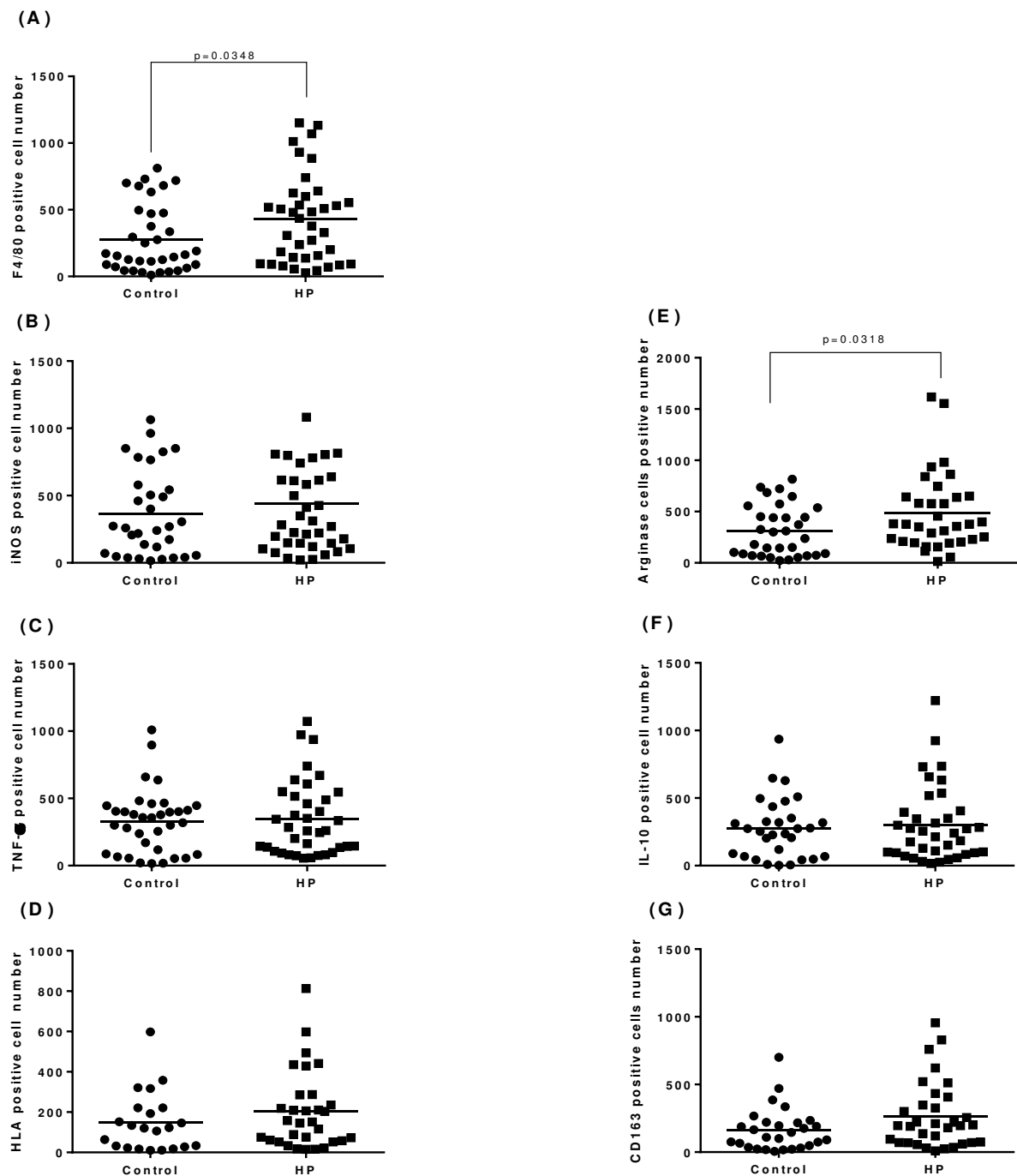


Figura 1. Expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa gástrica de pacientes infectados com *H. pylori* (HP). A expressão de F4/80 (A), iNOS (B), TNF- α (C), HLA-DR (D), Arginase (E), IL-10 (F), e CD163 (G) na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica em pacientes infectados ou não por *H. pylori*. A linha representa a mediana do grupo. O p valor foi determinado por Teste não-paramétrico Mann-Whitney. Nível de significância, $p < 0.05$. N=23 – 36 (Controle) e 32-37 (HP).

Maior densidade de H. pylori está associada a maior quantidade de macrófagos M2 na mucosa gástrica

O número de células F4/80 (macrófagos) foi maior em pacientes com maior densidade de *H. pylori* (densidade 3), em relação aos controles (Figura 3A).

Não houve diferença da expressão de iNOS (Figura 2B), de TNF- α (Figura 2C) ou de HLA-DR (Figura 2D), em relação a densidade de *H. pylori*. Entretanto, as expressões de Arginase (Figura 2E) e de CD163 (Figura 2G) foram maiores nos pacientes com densidade bacteriana acentuada (densidade 3) do que nos controles. Estes dados sugerem que a maior densidade de *H. pylori* está associada a macrófagos M2. Entretanto, a expressão de macrófagos IL-10 positivos (Figura 2F) foi menor nos pacientes com densidade 2 em relação aos controles. Quando agrupamos os pacientes com densidade 2 e densidade 3 formando um grupo densidade 2/3, observou-se que a expressão de IL-10 foi menor neste grupo em relação ao grupo controle (dados não mostrados).

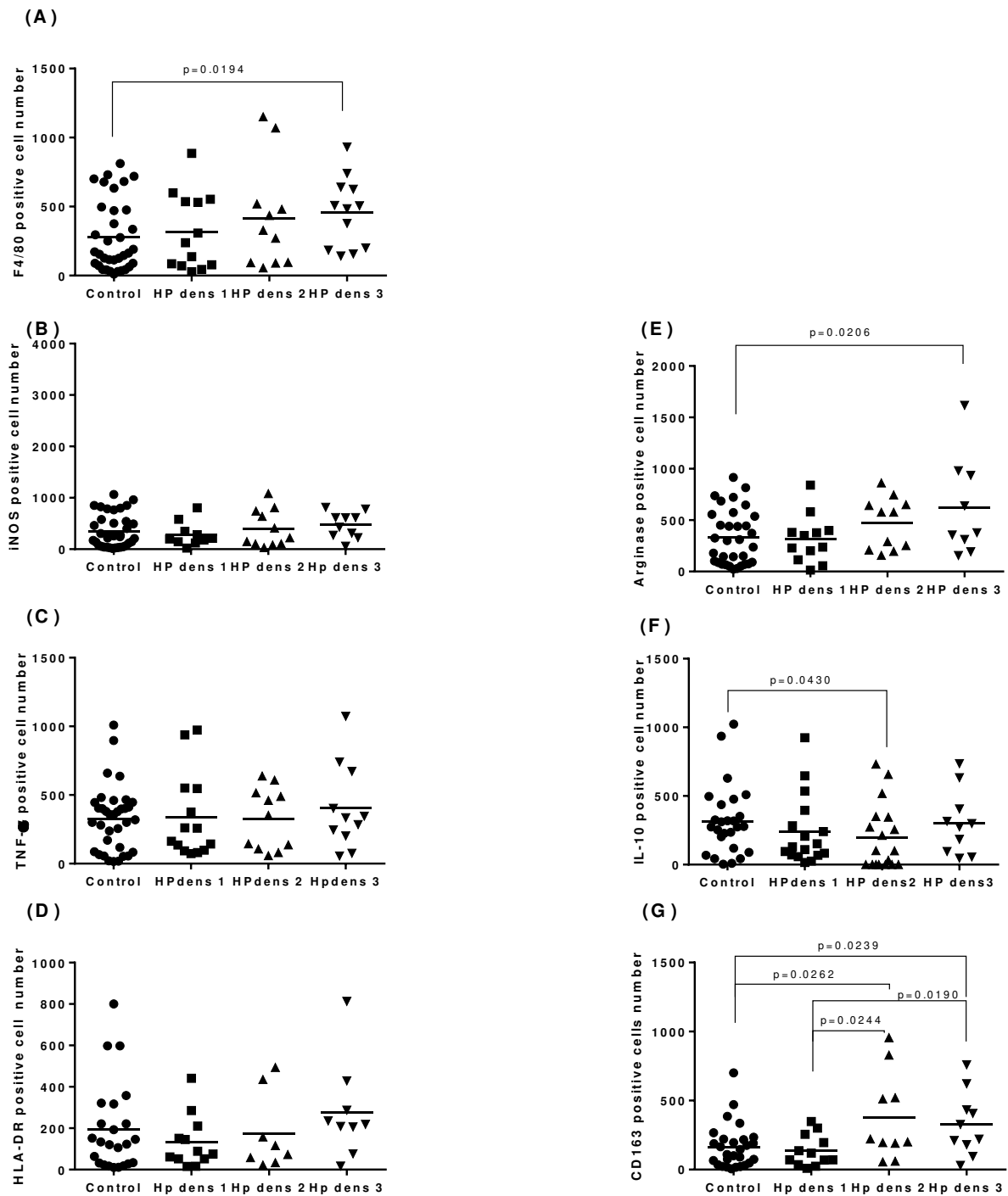


Figura 2. Associação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa e a densidade bacteriana, em pacientes infectados com *H. pylori* (HP). A expressão de F4/80 (A), iNOS (B), TNF- α (C), HLA-DR (D), Arginase (E), IL-10 (F), e CD163 (G) na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica em pacientes infectados ou não por *H. pylori*. A densidade de *H. pylori* foi avaliada pela classificação histológica do Sistema Sydney, em pacientes infectados (HP) ou não por *H. pylori* (Control). A linha representa a mediana do grupo. p valor foi determinado por Teste não-paramétrico Mann-Whitney. Nível de significância, $p < 0.05$. N=23-36 (Controle) e 32-37 (HP).

Pacientes infectados por H. pylori apresentaram correlação positiva entre a quantidade de macrófagos M2 e a densidade bacteriana

Houve correlação positiva entre a expressão de F4/80⁺(macrófagos) e a densidade de *H. pylori* (Figura 3A), sugerindo que a quantidade de macrófagos está associada à carga bacteriana. Não houve correlação entre a expressão de marcadores de perfil M1, tais como iNOS (Figura 3B), TNF- α (Figura 3C) e HLA-DR (Figura 3D) e a densidade bacteriana. Assim como não se observou correlação entre o marcador M2, IL-10 (Figura 3F) e a densidade de *H. pylori*. No entanto, notou-se correlação positiva entre a expressão de Arginase (Figura 3E) e CD163 (Figura 3G) e a densidade de *H. pylori*, o que sugere que a maior carga bacteriana está associada a macrófagos M2.

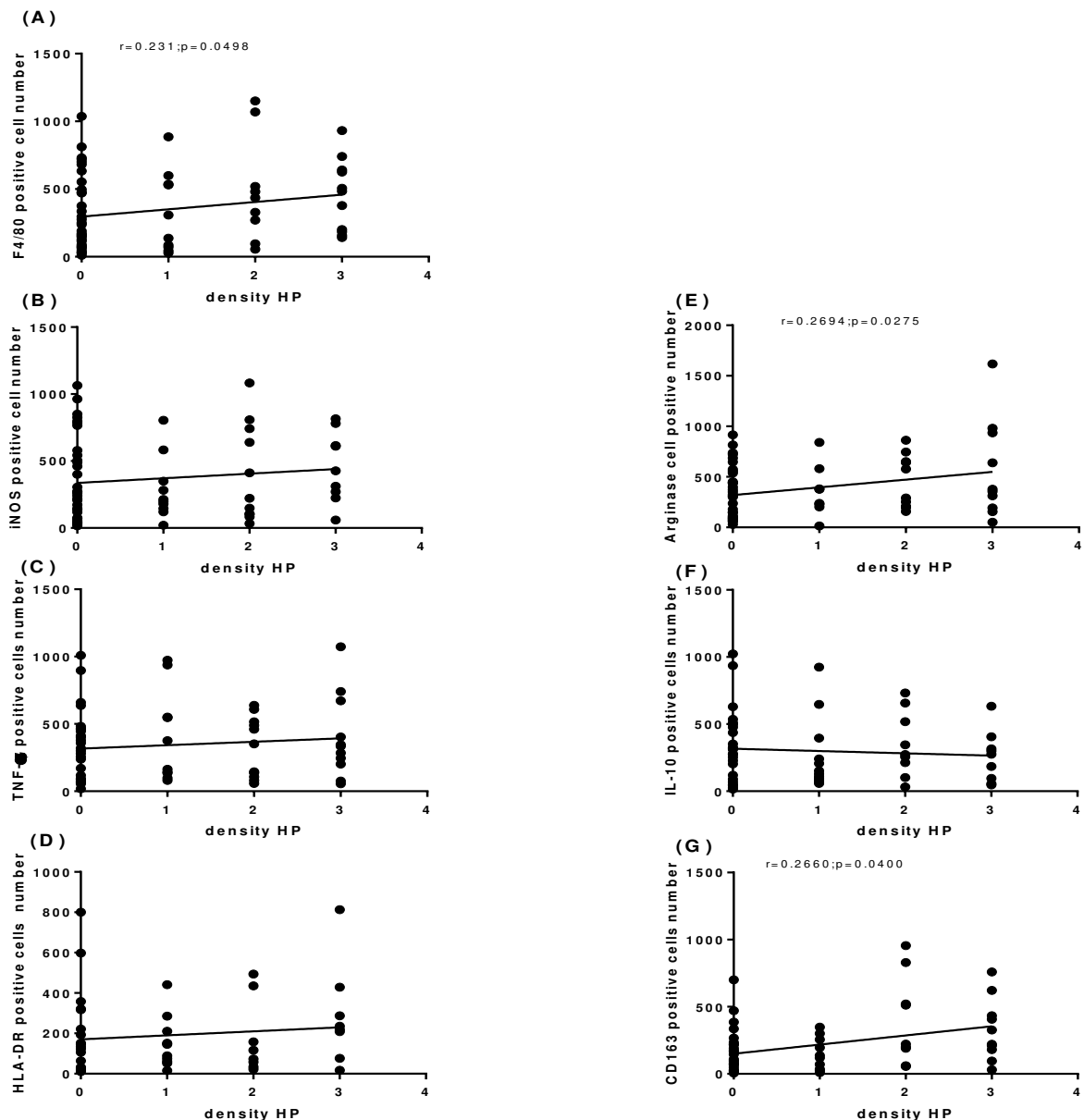


Figura 3. Correlação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa e a densidade bacteriana, em pacientes infectados com *H. pylori* (HP). A expressão de F4/80 (A), iNOS (B), TNF- α (C), HLA-DR (D), Arginase (E), IL-10 (F), e CD163 (G) na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica em pacientes infectados ou não por *H. pylori*. A densidade de *H. pylori* foi avaliada pela classificação histológica do Sistema Sydney, em pacientes infectados (HP) ou não por *H. pylori* (Control). As correlações foram determinadas pelo teste de correlação de Spearman. Nível de significância, $p < 0.05$. N = 32-37 (HP) e 23 – 36 (Control).

Pacientes infectados por H. pylori sem lesões pré-neoplásicas apresentaram aumento da quantidade de macrófagos com perfil M2.

A expressão de F4/80 foi significativamente maior em pacientes infectados com metaplasia e não nos infectados sem metaplasia, em relação aos controles. Não houve diferença entre os grupos infectados com e sem metaplasia (Figura 4A), sugerindo que o agravamento da inflamação elevou a quantidade de macrófagos *in situ*.

Não houve diferença entre os infectados com metaplasia e os infectados sem metaplasia, em relação aos controles e nem entre os infectados, da expressão de marcadores associados com macrófagos do perfil M1, tais como: iNOS (Figura 4B), TNF- α (Figura 4C) e HLA-DR (Figura 4D). Entretanto, marcadores associados com macrófagos de perfil M2, Arginase (Figura 4E) e CD163 (Figura 4G), apresentaram aumento da expressão nos infectados sem metaplasia em relação aos controles. Não houve diferença da expressão de Arginase e CD163 entre os infectados com metaplasia e os controles e nem entre os infectados. Também não houve diferença na expressão de IL-10 (Figura 4F), outro marcador M2.

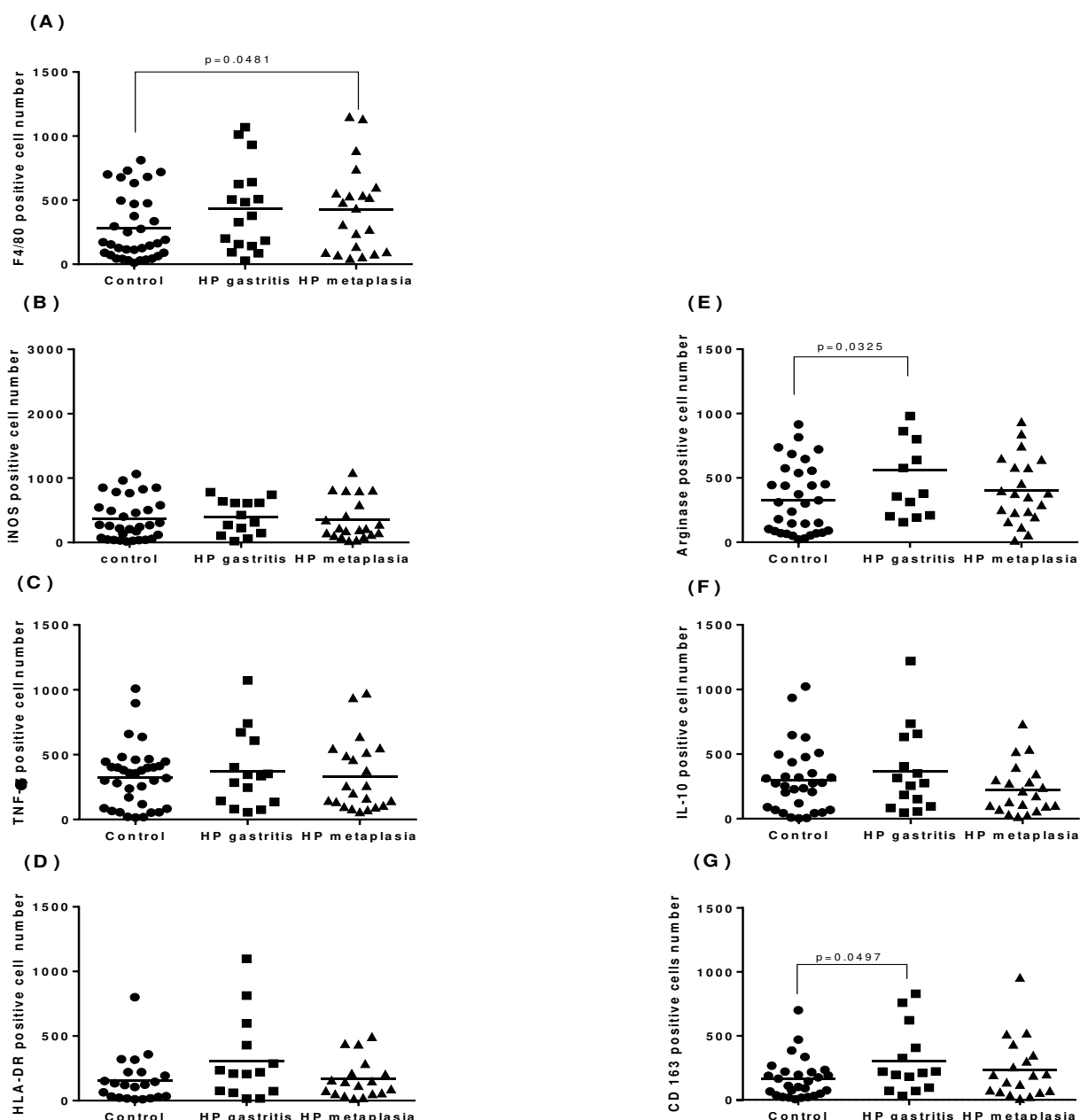


Figura 4. Associação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos e a presença de lesões pré-neoplásicas, em pacientes infectados com *H. pylori* (HP). A expressão de F4/80 (A), iNOS (B), TNF- α (C), HLA-DR (D), Arginase (E), IL-10 (F), e CD163 (G) na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica em pacientes infectados ou não por *H. pylori* e o grau de inflamação da mucosa foi avaliado pela classificação histológica do Sistema Sydney, em pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas (HP gastritis), infectados com lesões pré-neoplásicas (HP metaplasia) ou não infectados (Control). (A) F4/80, (B) iNOS, (C) TNF- α , (D) HLA-DR, (E) Arginase, (F) IL-10, (G) CD163). A linha representa a mediana do grupo. p valor foi determinado por Teste não-paramétrico Mann-Whitney. Nível de significância, $p < 0.05$. N= 13-16 (HP gastritis), N=17-21 (HP metaplasia) e 23 – 36 (Controle).

Pacientes infectados por H. pylori apresentaram correlação positiva entre os marcadores de polarização M1 e M2

Houve correlação positiva entre os marcadores iNOS/Arginase de pacientes infectados e não-infectados (Figura 5A), de pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas (Figura 5B) e com lesões pré-neoplásica (Figura 5C). Assim como houve correlação positiva entre os marcadores TNF- α /IL-10 de pacientes infectados e controles (Figura 5D), de pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas (Figura 5E) e com lesões pré-neoplásica (Figura 5F). Da mesma forma, houve correlação positiva entre os marcadores HLA/CD163 de pacientes infectados e não-infectados (Figura 5G), de pacientes sem lesões pré-neoplásicas (Figura 5H) e com lesões pré-neoplásica (Figura 5I). Estes dados sugerem que os dois perfis M1/M2 parecem coexistir durante a infecção com *H. pylori*.

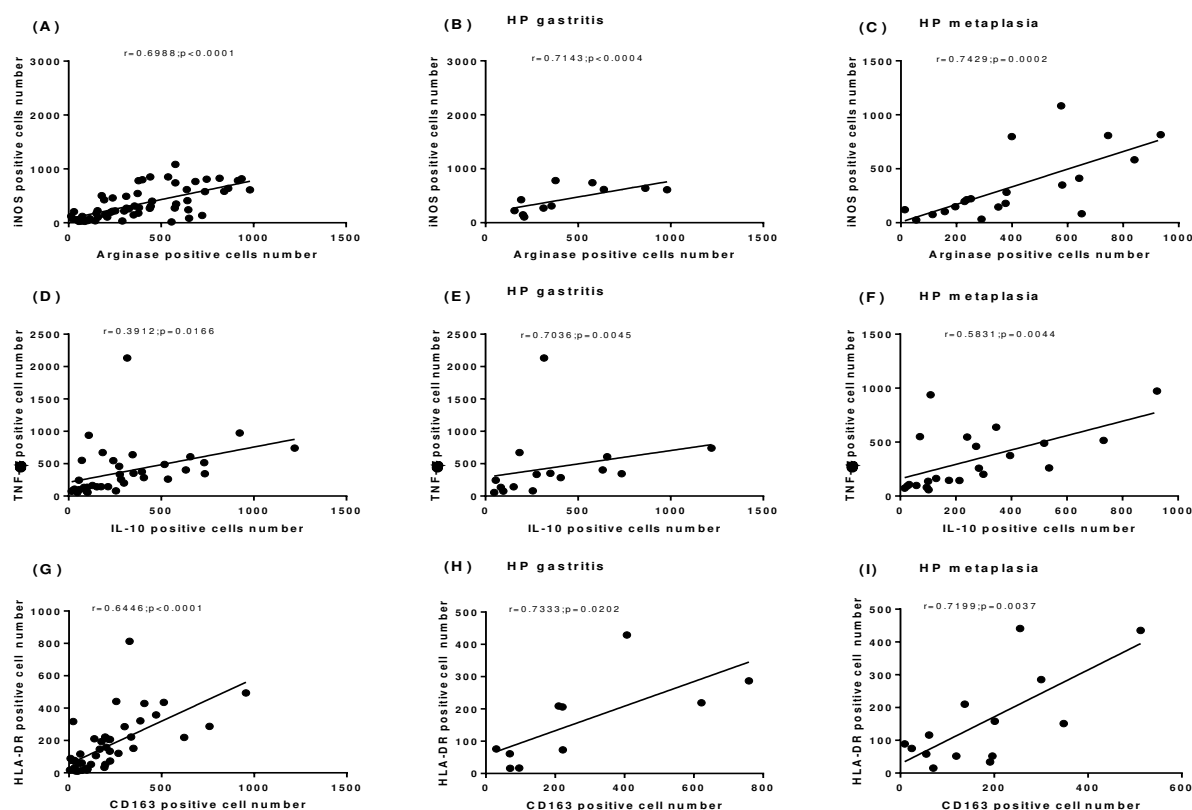


Figura 5. Correlação entre expressão de marcadores de polarização M1 e M2 (iNOS e Arginase), (TNF- α e IL-10), (HLA-DR e CD163) na mucosa de pacientes infectados com (HP). A expressão de F4/80, iNOS, TNF- α , HLA-DR, Arginase, IL-10 e CD163 na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica. (A) Correlação entre iNOS e Arginase de pacientes com infecção e sem infecção por *H. pylori*, (B) de pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas (HP gastritis) e (C) com lesões pré-neoplásicas (HP metaplasia). (D) Correlação entre TNF- α e IL-10 de pacientes com infecção e sem infecção por *H. pylori*, (E) de pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas (HP gastritis) e (F) com lesões pré-neoplásicas (HP metaplasia). (G) Correlação entre HLA-DR e CD 163 de pacientes com infecção e sem infecção por *H. pylori*, (H) de pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas (HP gastritis) e (I) com lesões pré-neoplásicas. As correlações foram determinadas pelo teste de correlação de Spearman. Nível de significância, $p < 0.05$. N=

Pacientes infectados por H. pylori com gastrite erosiva e ou úlcera péptica apresentaram maior quantidade de macrófagos M2

Houve aumento da expressão de F4/80 (Figura 6A) no grupo dos infectados com gastrite erosiva/UP quando comparado ao grupo controle com o mesmo diagnóstico e quando comparado ao grupo dos infectados com gastrite leve. Não houve diferença de expressão de F4/80 entre os grupos com diagnóstico de gastrite leve. Estes dados sugerem que o influxo de macrófagos para o local da infecção

depende não somente da presença de *H. pylori*, mas também de alterações macroscópicas da mucosa gástrica.

Não houve diferença da expressão de marcadores associados com macrófagos do perfil M1, iNOS (Figura 6B), TNF- α (Figura 6C) e HLA-DR (Figura 6D) entre os seguintes grupos: grupos de pacientes com diagnóstico de gastrite erosiva/UP infectados e não-infectados, grupos de pacientes com diagnóstico de gastrite leve infectados e não-infectados e entre o grupo dos infectados com gastrite leve e com gastrite erosiva/UP. Quanto a expressão de marcadores M2, houve aumento da expressão de Arginase no grupo de infectados com diagnóstico de gastrite erosiva/UP quando comparado com o grupo não infectado com o mesmo diagnóstico endoscópico. Não houve diferença da expressão de Arginase entre os infectados e não infectados com diagnóstico de gastrite leve (Figura 6E). Não houve diferença de expressão de CD 163 e de IL-10 em nenhuma das análises. Estes dados sugerem que a presença de *H. pylori* por si só poderia induzir a expressão macrófagos M2, independente das alterações endoscópicas da mucosa gástrica.

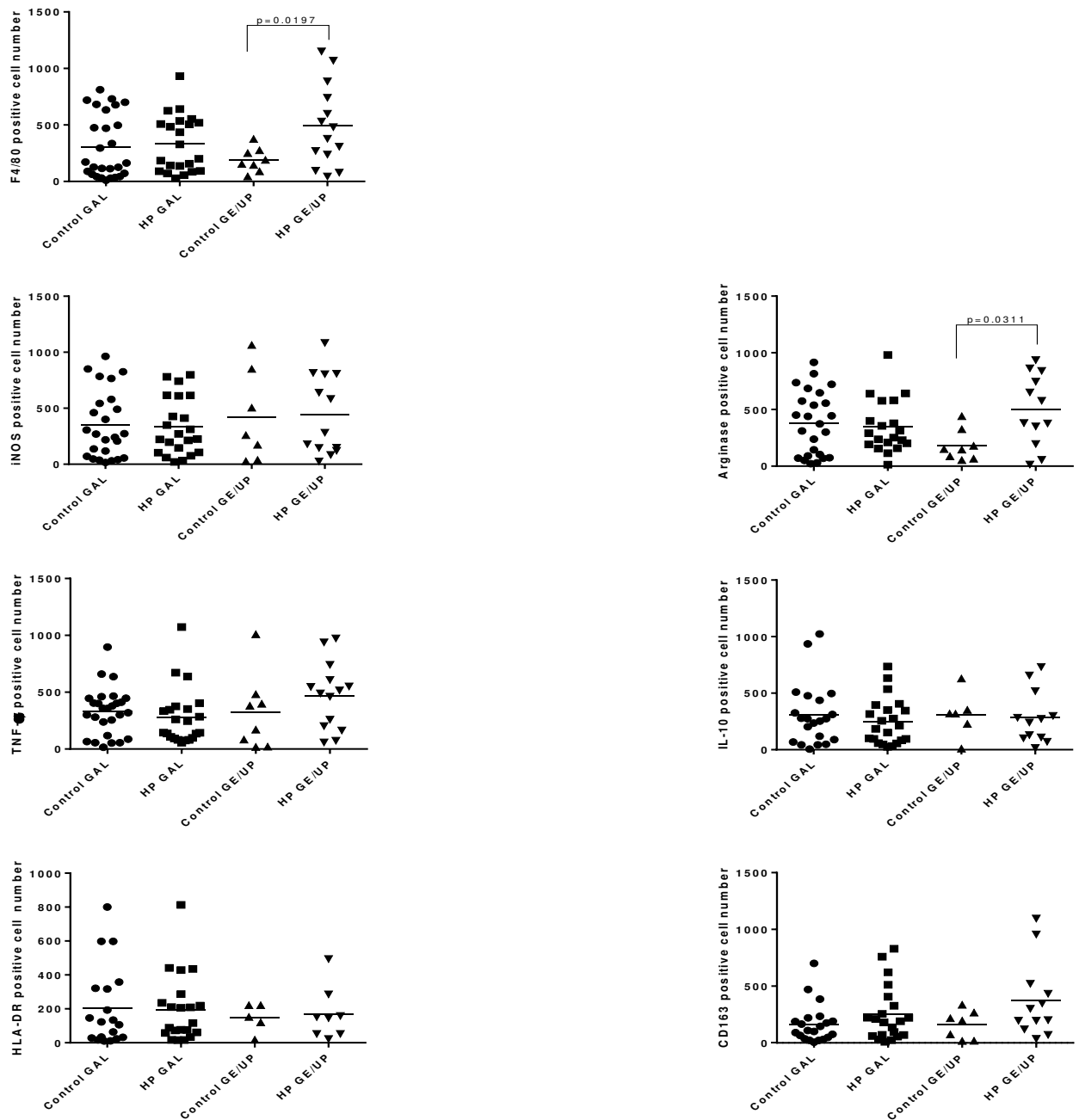


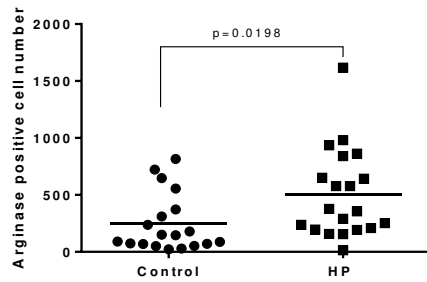
Figura 6. Associação entre expressão de marcadores de polarização de macrófagos na mucosa e aspecto endoscópico, em pacientes infectados com *H. pylori* (HP). A expressão de F4/80 (A), iNOS (B), TNF-α (C), HLA-DR (D), Arginase (E), IL-10 (F), e CD163 (G) na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica em pacientes infectados ou não por *H. pylori* e o diagnóstico endoscópico foi avaliado pela classificação endoscópica do Sistema Sydney, em pacientes com Pangastrite enantematosa leve (GAL) infectados (HP GAL) ou não infectados (Control GAL) e em pacientes com Gastrite erosiva e/ou Úlcera péptica (GE/UP) infectados (HP GE/UP) e não infectados (Control GE/UP). A linha representa a mediana do grupo. p valor foi determinado por Teste não-paramétrico Mann-Whitney. Nível de significância, $p < 0.05$. N= 13-16 (HP GAL), N=17-21 (HP GE/UP), N=24 – 19 (Control GAL) e N=12-5 (Control GE/UP).

Pacientes infectados por H. pylori com lesões pré-neoplásica apresentaram redução dos níveis plasmáticos de Arginase, enquanto na mucosa a expressão de Arginase aumentou em pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas

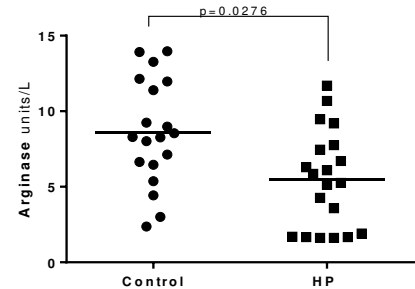
Como foi observado que a arginase foi um marcador alterado em quase todas as abordagens realizadas, investigamos se a alteração observada na mucosa também seria observada no plasma dos pacientes. Houve maior expressão de Arginase na mucosa de pacientes com infecção por *H. pylori*, em relação aos controles (Figura 7A), mas, por outro lado, houve redução dos níveis plasmáticos de Arginase em pacientes com infecção por *H. pylori*, em relação aos controles (Figura 7B). Observou-se expressão aumentada de Arginase na mucosa gástrica de pacientes infectados com maior densidade de *H. pylori* (Figura 7C), mas, por outro lado, houve redução dos níveis plasmáticos de Arginase em pacientes com densidade de *H. pylori* graus 2 e 3, em relação aos controles (Figura 7D). Observou-se expressão aumentada de Arginase na mucosa em pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas, em relação aos controles (Figura 7E), mas por outro lado, houve redução dos níveis plasmáticos de Arginase em pacientes infectados com lesões pré-neoplásicas, em relação aos controles, (Figura 7F). Entre os pacientes com gastrite erosiva e ou úlcera péptica, a expressão de Arginase na mucosa foi maior nos pacientes infectados em relação aos não infectados (Figura 7G), por outro lado, os níveis plasmáticos de Arginase foram menores nos pacientes infectados com gastrite erosiva e ou úlcera péptica em relação ao controle (Figura 7H).

O padrão sistêmico da Arginase inverso a expressão da Arginase na mucosa gástrica sugere que a bactéria promove a modulação da resposta imune e inflamatória no local da infecção.

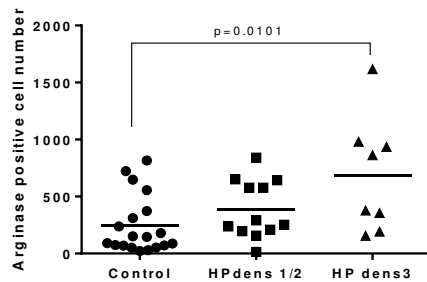
(A)



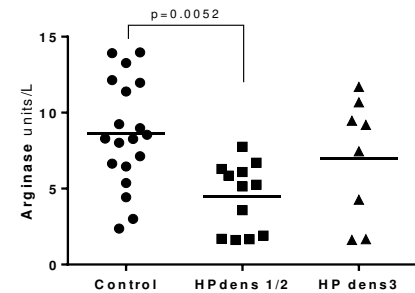
(B)



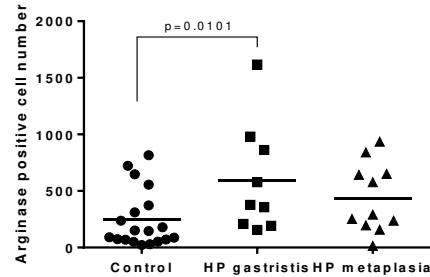
(C)



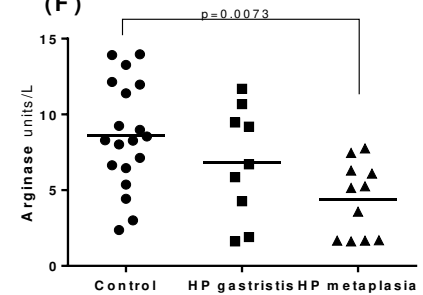
(D)



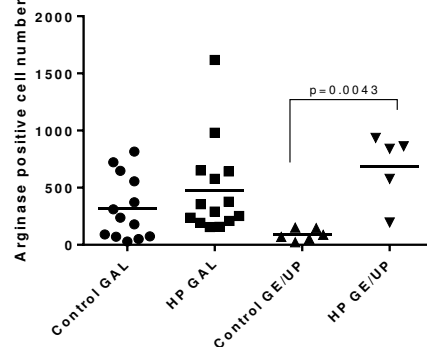
(E)



(F)



(G)



(H)

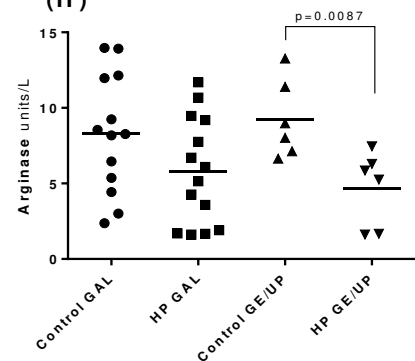


Figura 7. Perfil de expressão de Arginase na mucosa gástrica e no plasma de pacientes com infecção por *H. pylori* (HP). A expressão de Arginase na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica. A atividade da Arginase no plasma foi avaliada de acordo com protocolo do Kit de Ensaio de Atividade da Arginase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A densidade bacteriana, a presença ou ausência de lesões pré-neoplásicas e o diagnóstico endoscópico foram avaliados de acordo com Sistema Sydney, em pacientes infectados com *H. pylori* (HP) ou não infectados (Control). A densidade foi classificada em densidade 1 e 2 (HP dens 1/2) e densidade 3 (HP dens 3) ou densidade 0 (Control). Histologicamente foi considerada a presença (HP metaplasia) ou ausência de lesões pré-

neoplásicas (HP gastritis) em pacientes infectados. À endoscopia, foram considerados os grupos com Pangastrite enantematosa leve infectados com *H. pylori* (HP GAL) e não infectados (Control GAL) e os grupos com Gastrite erosiva e ou Úlcera péptica em infectados com *H. pylori* (HP GE/UP) ou não infectados (Control GE/UP). Expressão de Arginase na mucosa (7A) e no plasma ((7B) de pacientes com infecção (HP) e sem infecção (Control). Expressão de Arginase na mucosa (7C) e no plasma (7D) de acordo com a densidade de *H. pylori*. Expressão de Arginase na mucosa (7E) e no plasma (7F) de acordo com a presença ou ausência de lesões pré-neoplásicas. Expressão de Arginase na mucosa (7G) e no plasma (7H) de acordo com o diagnóstico endoscópico. A linha representa a mediana do grupo. p valor foi determinado por teste não paramétrico Mann-Whitney test. Nível de significância, $p < 0.05$. N= 21 (HP) e N=23 (Control).

Pacientes infectados por H. pylori não apresentaram correlação entre os níveis plasmáticos e a expressão na mucosa de Arginase

Não houve correlação entre os níveis plasmáticos e a expressão na mucosa de Arginase entre pacientes infectados com e sem infecção por *H. pylori*. Assim como não houve correlação entre os pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas (Figura 8B) e entre os pacientes com lesões pré-neoplásicas (Figura 8C).

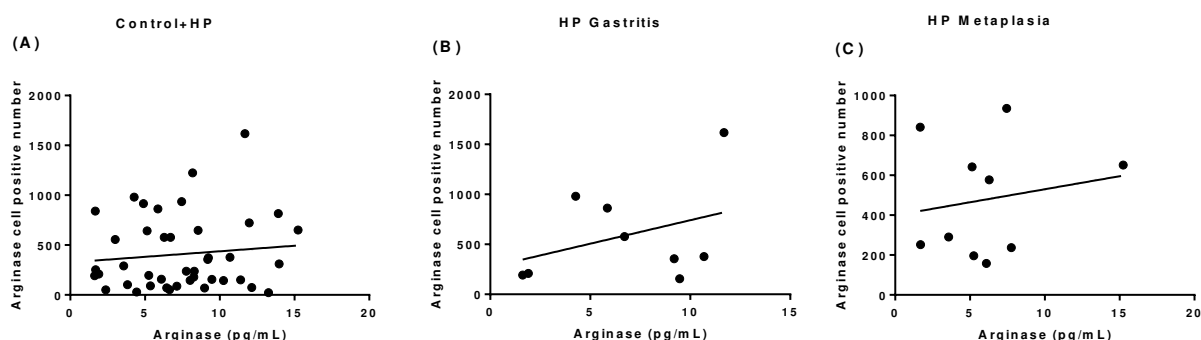


Figura 8. Correlação entre expressão de Arginase na mucosa e no plasma de pacientes com infecção por *H. pylori* (HP). A expressão de Arginase na mucosa gástrica foi avaliada por imunohistoquímica. A atividade da Arginase no plasma foi avaliada de acordo com protocolo do Kit de Ensaio de Atividade da Arginase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A presença ou a ausência de lesões pré-neoplásicas foi avaliada de acordo com Sistema Sydney. Correlação entre a expressão de Arginase na mucosa gástrica e no plasma (A) entre pacientes com e sem infecção por *H. pylori*, (B) entre pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas, (C) entre pacientes infectados com lesões pré-neoplásicas. As correlações foram determinadas pelo teste de correlação de Spearman. Nível de significância, $p < 0.05$. N=10 (HP gastritis), N=11 (HP metaplasia), N= 44 (HP+Control).

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que pacientes infectados por *H. pylori* apresentaram concentração maior de macrófagos Arginase e CD163 positivos mas

não apresentam alterações em outros marcadores de polarização de macrófagos, tais como iNOS, TNF- α , HLA-DR ou IL-10, sugerindo um perfil M2 de polarização. A presença de macrófagos M2 teve correlação com a densidade das bactérias, uma vez que macrófagos Arginase e CD163 positivos estavam em maior número nos pacientes com alta carga bacteriana e com gastrite crônica sem lesões pré-neoplásicas. Os dados sugerem que a infecção por *H. pylori* induz um perfil tolerogênico para sua permanência no hospedeiro e assim, na fase de gastrite crônica sem complicações, persiste infectando o hospedeiro por longa data.

Inicialmente, demonstrou-se que os macrófagos estavam presentes em maior quantidade na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* que na mucosa sem infecção (Figura 1A). Este dado pode sugerir que a bactéria, por si só, poderia ter induzido o aumento do recrutamento de macrófagos para o foco da infecção, o que se confirmou quando foi observado correlação positiva entre quantidade de macrófagos e maior densidade de *H. pylori* (Figura 3A). Estes achados estão de acordo com estudos que demonstraram que a infecção por *H. pylori* resulta em grande influxo de macrófagos (ASSIM *et al.*, 2010; ALGOOD *et al.*, 2007) e que, apesar da resposta imune, a infecção persiste, sugerindo ineficiência dessa resposta (MATSUMOTO *et al.*, 2005).

O perfil M2 de polarização de macrófagos na infecção por *H. pylori*, demonstrado neste estudo, corrobora o resultado de Fehlings *et al.* (2012). Entretanto, apesar dos dois estudos empregarem imunohistoquímica para identificar marcadores de polarização na mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori*, este estudo mostrou aumento da expressão de macrófagos Arginase positivos e o estudo de Fehlings *et al.* (2012) mostrou aumento da expressão de CD163. Além do mais, neste estudo foi encontrado um perfil M2 em gastrite não-atrótica, caracterizado pelo aumento da expressão de Arginase e CD 163 na mucosa gástrica de pacientes infectados sem lesões pré-neoplásicas em relação aos pacientes não infectados. Resultado contrário aos de Quiding-Järbrink *et al.* (2010), que se basearam na expressão gênica de marcadores de polarização M1 (iNOS, CXCL11) e M2 (CCL17, CCL18 e CD206) na mucosa gástrica de pacientes infectados com *H. pylori* e descreveram um perfil de polarização misto M1/M2 em gastrite crônica sem lesões pré-neoplásicas. Nosso grupo demonstrou recentemente que a infecção por *H. pylori*

por si só não alterou a expressão de IL-10 e TNF- α no plasma e na mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori*, mas que a densidade bacteriana se correlacionou negativamente com expressão sistêmica e local de IL-10 (MALUF *et al.*, 2020), sugerindo que macrófagos M2 poderiam estar envolvidos de alguma forma no controle das bactérias na mucosa.

Geralmente, nas fases iniciais de uma infecção bacteriana, os macrófagos são polarizados em direção ao fenótipo M1, que possui atividade bactericida (MURRAY *et al.*, 2014). Por outro lado, os patógenos, para garantirem sua sobrevivência, empregam vários mecanismos com a finalidade de diminuir a resposta pró-inflamatória e ativar os macrófagos polarizados M2 (REN *et al.*, 2017), sendo estes mecanismos de evasão importantes (SICA *et al.*, 2015). Isto foi observado neste estudo, uma vez que a presença de *H. pylori* foi associada ao aumento da expressão de Arginase 2 (Arg2) (Figura 1E), o que pode ser um mecanismo da bactéria para regular a resposta microbicida mediada por óxido nítrico, via óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). Este resultado corrobora aos estudos de Lewis *et al.* (2010, 2011) que sugeriram que *H. pylori* limita a resposta pró-inflamatória dos macrófagos pela indução da Arg2, e consequente redução da síntese do NO. De fato, no presente estudo, a expressão de iNOS não foi alterada pela presença da infecção por *H. pylori* por si só (Figura 1B), ao contrário de estudos anteriores que demonstraram que *H. pylori* induz a expressão e a atividade de iNOS em macrófagos *in vivo* e *in vitro* (CHATURVEDI *et al.*, 2010). A expressão inalterada da enzima iNOS observada neste estudo em pacientes com infecção por *H. pylori* poderia ser explicada pela indução de Arg2 por *H. pylori*, que diminui a disponibilidade do substrato L-arginina (L-Arg) intracelular para tradução de iNOS, sem alterar a expressão de RNAm, como demonstrado *in vitro* por Lewis *et al.* (2010). Assim, ativar macrófagos M2 pela indução de Arg2 pode ser um mecanismo que *H. pylori* emprega para evitar a resposta antimicrobiana do macrófago.

Este estudo não demonstrou diferença na expressão de TNF- α na mucosa de pacientes infectados por *H. pylori* (Figura 1C). Resultado contrário a estudos de Klausz *et al.* (2004), Algood e Cover (2006) e Abdollahi *et al.* (2011) que relataram que a infecção por *H. pylori* desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada por uma secreção aumentada de TNF- α na mucosa gástrica. No entanto, estudo recente do

nosso grupo não demonstrou diferença na expressão de TNF- α na mucosa de pacientes infectados por *H. pylori* (MALUF *et al.*, 2020). Fatores genéticos, como polimorfismo de genes codificadores de citocinas podem influenciar o resultado clínico da infecção por *H. pylori*, o que poderia justificar os resultados do TNF- α deste estudo. Polimorfismos genéticos em genes que codificam citocinas pró-inflamatórias podem influenciar o resultado clínico da infecção por *H. pylori* (DE BRITO *et al.*, 2018).

Da mesma forma, nesta pesquisa, a expressão de IL-10 na mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* não foi diferente daqueles sem infecção (Figura 1F). Estes dados são consistentes com os achados de Maluf *et al.* (2020) e de Abdollahi *et al.* (2011), que não detectaram diferença nas concentrações de IL-10 na mucosa de pacientes com e sem infecção por *H. pylori*, entretanto, são diferentes dos resultados de Vinagre *et al.* (2018), que relataram redução de IL-10 na mucosa gástrica infectada por *H. pylori*, embora os estudos de Abdollahi *et al.* (2011) e de Vinagre *et al.* (2018) terem determinado as concentrações de IL-10 na mucosa pelo método ELISA. No entanto, outros estudos referiram aumento da expressão de mRNA de IL-10 na mucosa infectada cronicamente por *H. pylori* em modelo murino (LEWIS *et al.*, 2011) e em crianças (MICHALKIEWCZ *et al.*, 2015).

Os marcadores de polarização HLA-DR (Figura 1D) e CD163 (Figura 1G) não apresentaram diferença de expressão entre pacientes com e sem infecção por *H. pylori*. A literatura associando *H. pylori* e a expressão destes marcadores em macrófagos é escassa. Resultado da expressão de HLA-DR deste estudo corrobora estudo de Gönen *et al.* (2017), que não demonstrou diferença na frequência da expressão do alelo de HLA-DR entre crianças turcas com e sem infecção por *H. pylori*. Ao contrário, Huang *et al.* (2005) demonstraram aumento da expressão do alelo HLA-DR em crianças africanas infectadas por *H. pylori*. No entanto, diferenças de resultados podem estar associadas a diferenças entre os alelos de HLA baseadas em fatores étnicos, regionais e outros (WANG *et al.*, 2015). Estudo *in vitro* de Pagliari *et al.* (2017) demonstrou redução da expressão de HLA-DR na membrana de macrófagos infectados por *H. pylori*, pela suprarregulação do receptor imune CD300E. Esse efeito compromete a apresentação do antígeno para células T. Assim, alterar a possibilidade de reconhecimento de linfócitos T do antígeno bacteriano poderia ser mais uma forma empregada pelo *H. pylori* para a evasão do sistema imune. No

entanto, no presente estudo, esse efeito não foi demonstrado, uma vez que a infecção por *H. pylori* não alterou a expressão de HLA-DR. Apesar deste estudo não ter demonstrado aumento da expressão de CD 163 na mucosa de pacientes infectados por *H. pylori*, como mostrado no estudo de Michalkiewicz *et al.* (2015), realizado com expressão de mRNA em mucosa gástrica de crianças, os dois estudos sugeriram perfil M2 na infecção com *H. pylori*.

Como foi observado que *H. pylori* poderia estar induzindo por si só polarização de macrófagos para perfil M2, caracterizado pelo aumento da expressão de Arg2, investigou-se se esta polarização estaria associada a carga bacteriana. A princípio notou-se que pacientes com maior carga bacteriana apresentaram maior quantidade de macrófagos (Figura 2A). Este dado corrobora o estudo de Borlace *et al.* (2011), que relatou a sobrevivência de *H. pylori* dentro dos megassomos formados durante processo de fagocitose realizado pelos macrófagos. Esses autores sugeriram que estas células fagocíticas, ao invés de contribuir para a eliminação de *H. pylori*, favorecem altas cargas bacterianas. Isto foi demonstrado neste estudo, uma vez que houve correlação positiva entre quantidade de macrófagos e maior densidade de *H. pylori* (Figura 3A). Assim, este estudo sugere que os macrófagos poderiam favorecer a persistência de *H. pylori* no hospedeiro.

Não houve diferença na expressão de macrófagos iNOS positivos (Figura 2B) em relação a densidade bacteriana. Da mesma forma, não houve correlação entre a expressão de iNOS (Figura 3B) na mucosa gástrica e a carga bacteriana, sugerindo que macrófagos iNOS⁽⁺⁾ parecem não participar da colonização de *H. pylori*. De fato, Hardbower *et al.* (2016) demonstraram que camundongos com deleção de iNOS apresentaram redução significativa da colonização em comparação com os camundongos selvagens, sugerindo que iNOS não controla a colonização nesse modelo de infecção.

Neste estudo não houve diferença de expressão de TNF- α (Figura 2B) na mucosa, em relação ao grau de densidade bacteriana. Da mesma forma, não houve correlação entre as expressões de TNF- α e densidade (Figura 3B). Diferente dos resultados de Michalkiewicz *et al.* (2015), que analisaram a expressão de TNF- α na mucosa de crianças, por imunohistoquímica e observaram correlação positiva entre expressão de TNF- α e a colonização de *H. pylori*. A expressão de HLA-DR na mucosa

gástrica, neste estudo, não foi associada a densidade bacteriana (Figuras 2C e 3C), no entanto, não há estudos anteriores sobre HLA-DR e densidade de *H. pylori* para comparar com este estudo.

A expressão de Arg2 (Figura 2E), nesta pesquisa, foi maior em pacientes com maior densidade (dens 3). Além disso, houve correlação positiva entre a expressão de Arg2 e densidade de *H. pylori* (Figura 3E). Dados estes, que corroboram estudo de Lewis *et al.* (2011). Os autores mostraram que camundongos com deleção de Arg2, cronicamente infectados com *H. pylori*, apresentaram diminuição da colonização bacteriana, em relação aos camundongos infectados sem deleção, sugerindo que Arg2 regula negativamente a resposta antimicrobiana dos macrófagos, permitindo, assim, a colonização bacteriana. Observou-se ainda neste estudo, que maior carga bacteriana também se associou a maior expressão de CD163 (Figura 2G). A expressão de CD163 foi maior em pacientes com densidades 2 e 3 em relação aos controles, assim como foi maior nos infectados com maior densidade bacteriana em relação aos infectados com menor densidade. Além do mais, notou-se correlação positiva entre CD163 e densidade de *H. pylori* (Figura 3G). Estes dados em conjunto sugerem que a ativação de macrófagos M2 prejudica a resposta pró-inflamatória do hospedeiro. Até o momento, não é de nosso conhecimento, estudos na literatura associando marcador CD163 e densidade de *H. pylori*.

Na análise de IL-10, notou-se que a expressão de IL-10 foi menor no grupo de densidade 2, em relação aos controles (Figura 2F). No entanto, quando os pacientes de densidade 2 e 3 foram agrupados, a expressão de IL-10 foi menor neste grupo que a expressão dos controles (dados não mostrados). Este fato sugere que o excesso de bactérias pode estar associado a perda do equilíbrio regulador da IL-10, levando ao aumento do processo inflamatório da mucosa gástrica. Nesse sentido, avaliou-se o grau de densidade e o grau de inflamação da mucosa dos pacientes desta pesquisa e observou-se correlação positiva entre densidade e inflamação crônica da mucosa gástrica (dados não mostrados). Além do mais, estudo recente do nosso grupo mostrou diminuição da expressão de IL-10 na mucosa gástrica de pacientes com maior grau de inflamação crônica (MALUF *et al.*, 2020).

Como demonstrado neste estudo que a densidade bacteriana está associada a expressão de macrófagos M2 e sabendo-se que maior densidade de *H.*

pylori está associada a um processo inflamatório mais intenso da mucosa gástrica (KHULUSI *et al.*, 1995), levantou-se a hipótese de que o perfil de polarização de macrófagos poderia estar associado com o grau de inflamação da mucosa gástrica. E como a inflamação persistente da mucosa induzida por *H. pylori* é fator de risco para adenocarcinoma gástrico (PLUMMER *et al.*, 2016), avaliou-se pacientes com e sem lesões pré-neoplásicas.

A princípio, notou-se aumento da expressão de F4/80 (Figura 4A) na mucosa infectada com *H. pylori* do grupo com lesões pré-neoplásicas e não no grupo sem lesões pré-neoplásicas, em relação aos controles, sugerindo que sinais de danos epiteliais, como metaplasia, resultam em maior infiltrado de macrófagos. Petersen *et al.* (2014, 2018), em modelo murino, sugerem que a depleção de macrófagos prejudica a progressão da metaplasia intestinal.

Avaliou-se os macrófagos associados ao fenótipo M1 e as lesões pré-neoplásicas gástricas. Os resultados mostraram que a expressão de iNOS não foi alterada pela presença ou não de lesões pré-neoplásicas (Figura 4B). Ao contrário dos resultados de Quiding-Järbrink *et al.* (2010), que demonstraram aumento da expressão gênica de mRNA de iNOS e da proteína iNOS na mucosa gástrica de indivíduos com gastrite atrófica e sugeriram uma polarização de macrófagos M1 nessa fase de gastrite com alterações pré-neoplásicas.

Não houve diferença nas expressões de TNF- α (Figura 4C) e HLA-DR (Figura 4D) em relação a presença ou ausência de lesões pré-neoplásicas. Não foram encontrados outros estudos associando expressão de iNOS e lesões pré-neoplásicas, assim como não foram encontrados estudos associando TNF- α e HLA-DR e lesões pré-neoplásicas.

Avaliou-se os macrófagos associados ao fenótipo M2 e as lesões pré-neoplásicas. Os resultados mostraram aumento da expressão de Arg2 (Figura 4E) e aumento da expressão de CD163 (Figura 4G) apenas nos pacientes com gastrite induzida por *H. pylori* não-complicada, ou seja, sem lesões pré-neoplásicas, sugerindo fenótipo M2 para esta fase da gastrite crônica induzida por *H. pylori*. Não se observou diferença de expressão de IL-10 em relação a presença de lesões pré-neoplásicas (Figura 4F). Ao contrário dos resultados de Quiding-Järbrink *et al.* (2010), que descreveram perfil misto M1/M2 para gastrite crônica sem lesões pré-neoplásicas.

Entretanto, diferentemente deste estudo, os autores não empregaram a Arg2 e CD163 como marcadores de polarização M2, mas as quimiocinas CCL17, CCL18 e a molécula CD206. Por outro lado, os resultados de Quiding-Järbrink *et al.* (2010) e os do presente estudo complementaram-se quando demonstraram os dois extremos de polarização de macrófagos. Os autores sugeriram perfil M1 para gastrite crônica com sinais de lesões pré-neoplásicas e este estudo sugeriu um perfil M2 para gastrite crônica sem complicações. Desta forma, sugere-se que *H. pylori* induz um perfil funcional dos macrófagos M2, benéfico a sua permanência no hospedeiro.

Entre os marcadores de polarização de macrófagos M1 e M2, observou-se correlação positiva entre as expressões de iNOS/Arginase (Figuras 5A-C), entre TNF- α /IL-10 (Figuras 5D-F) e entre as expressões de HLA/CD163 (Figuras 5G-I) de pacientes infectados e não-infectados, de pacientes infectados sem e com lesões pré-neoplásica. A presença numérica de macrófagos M1 e M2 não implica necessariamente que estas células estejam ativas em suas funções polarizadas (matar ou reparar). Em muitas circunstâncias, os macrófagos polarizados podem estar presentes como parte de processos imunológicos anteriores e podem não ter nenhuma função, desde que a polarização não esteja ligada a uma injúria (MURRAY, 2017). A indução simultânea de iNOS e Arg2 não é comum, no entanto, patógenos desenvolvem mecanismos que regulam a Arg2, para inibir a resposta do hospedeiro dependente de iNOS (LEWIS *et al.*, 2010, 2011). Neste estudo, apesar de ter se observado uma correlação numérica entre as expressões de iNOS e Arg2, relatou-se anteriormente, aumento da expressão de Arg2 no grupo com gastrite crônica sem lesões pré-neoplásica. Desta forma, baseando-se na revisão de Murray (2017), levantou-se a hipótese de que macrófagos Arg2 positivos estariam ativos em suas funções na fase de inflamação contínua de baixo grau e os macrófagos iNOS positivos estariam presentes, no entanto, com função pouco efetiva nessa fase de inflamação da mucosa gástrica.

Observando-se que houve aumento da expressão de macrófagos de perfil M2 em pacientes com maior densidade de *H. pylori* e sabendo-se que a maior densidade pode estar associada a lesões macroscópicas da mucosa gástrica (SHAH *et al.*, 2015), investigou-se se as alterações encontradas endoscopicamente na mucosa gástrica estariam associadas a polarização de macrófagos.

Os resultados mostraram que a expressão de F4/80 (Figura 6A) foi maior nos pacientes infectados por *H. pylori* e com diagnóstico de gastrite erosiva/UP do que naqueles sem infecção e com mesmo diagnóstico endoscópico. Esse influxo de macrófagos parece ter sido às custas de macrófagos Arg2, uma vez que se observou aumento da expressão de Arg2 no mesmo grupo de infectados com diagnóstico de gastrite erosiva/UP em relação ao grupo não infectado, com o mesmo diagnóstico endoscópico, sugerindo que a *H. pylori* por si só estaria induzindo polarização de macrófagos M2, independente das alterações da mucosa observadas por endoscopia. No entanto, não houve diferença da expressão de outros marcadores de macrófagos M2, como IL-10 (Figura 6F) e CD163 (DG). Da mesma forma não se observou diferença na expressão de marcadores associados com macrófagos do perfil M1, iNOS (Figura 6B), TNF- α (Figura 6C) e HLA-DR (Figura 6D), em relação ao diagnóstico endoscópico.

Diante do resultado deste estudo, de aumento da expressão de macrófagos associados ao marcador Arg2 em pacientes com infecção por *H. pylori*, com maior carga bacteriana, naqueles com gastrite crônica sem lesão pré-neoplásicas e com úlcera péptica, levantou-se o questionamento se poderia a Arg2 ser considerada um “marcador prognóstico” destas condições? Neste sentido, visando investigar se este perfil M2 observado na mucosa infectada por *H. pylori* seria uma característica sistêmica, foi avaliada a atividade de Arg2 no plasma. Ao contrário do que foi observado na mucosa, os resultados demonstraram que a atividade da Arg2 foi menor nos pacientes infectados com *H. pylori* em relação aos controles (Figura 7E), assim como se observou a redução dos níveis plasmáticos de Arg2 em pacientes com maior densidade de *H. pylori* em relação aos controles (Figura 7F). Quando os grupos de pacientes foram avaliados quanto a presença ou não de lesões pré-neoplásicas, a redução da atividade de Arg2 foi observada apenas nos pacientes infectados e portadores de lesões pré-neoplásicas quando comparados ao grupo controle (Figura 7G). Entre os pacientes que apresentaram erosões ou úlcera gástrica, houve redução da atividade da Arginase no plasma dos pacientes com infecção por *H. pylori* quando comparados aos sem infecção (Figura 7H), sugerindo que *H. pylori* por si só induziria uma mudança do perfil de macrófagos para o M1.

Em conclusão, este estudo sugere que a infecção crônica por *H. pylori* induz um perfil de macrófagos M2 e assim a manutenção de uma resposta inflamatória da mucosa sem sinais de lesões pré-neoplásicas é favorável a perpetuação da bactéria no hospedeiro. No entanto, a densidade bacteriana pode ser um fator de desequilíbrio do perfil tolerogênico. Além do mais, a ausência de correlação entre a expressão de Arginase sistêmica e na mucosa sugere que a bactéria promove a modulação da resposta imune e inflamatória no local da infecção.

Portanto, nota-se que o comportamento funcional dos macrófagos parece ter um papel importante no desfecho do contexto patológico da infecção por *H. pylori*. Maior compreensão deste papel da polarização de macrófagos na gastrite crônica associada à infecção por *H. pylori* pode ajudar a entender a imunopatologia da infecção e apoiar futuras abordagens terapêuticas e diagnósticas.

DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), conforme CAAEE 07989412.0.0000.5086. Os pacientes/ participantes forneceram consentimento informado por escrito para participar deste estudo.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às agências de fomento brasileiras FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento em Pesquisa) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio

financeiro e autoria bolsas. Agradecemos ao IECT Biotecnologia (FAPEMA). Também somos gratos ao Dr. Gyl Eanes pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS

ABADI ATB. Strategies used by helicobacter pylori to establish persistent infection. **World J. Gastroenterol.** 2017; 23:2870–2882.

ABDOLLAHI HAMID , SHAMS S, ZAHEDI MJ, MOGHADDAM SD, HAYATBAKHSH MM, ABDOLLAH J. IL-10, TNF- α and IFN- γ Levels in Serum and Stomach Mucosa of Helicobacter pylori-Infected Patients. **Iran J Allergy Asthma Immunol.** 2011; 10: 267-271.

ALGOOD HMS, COVER TL. Helicobacter pylori persistence: An overview of interactions between H. pylori and host immune defenses. **Clin. Microbiol. Rev.** 2006; 19:597–613.

BORLACE GN, JONES HF, KEEP SJ, BUTLER RN, BROOKS DA. *Helicobacter pylori* phagosome maturation in primary human macrophages. **Gut Pathog.** 2011 23;3:3.

CARBO A, BASSAGANYA-RIERA J, PEDRAGOSA M, VILADOMIU M, MARATHE M, EUBANK S, WENDELSORF K, BISSET K, HOOPS S, DENG X, ALAM M, KRONSTEINER B, MEI Y, HONTECILLAS R. Predictive Computational Modeling of the Mucosal Immune Responses during Helicobacter pylori Infection. **PLoS One** 2013; 8: e73365.

CHATURVEDI R, ASIM M, HOGE S, LEWIS ND, SINGH K, BARRY DP, DE SABLET T, PIAZUELO MB, SARVARIA AR, CHENG Y, CLOSS EI, CASERO RA, GOBERT AP, WILSON KT. Polyamines impair immunity to helicobacter pylori by inhibiting L-Arginine uptake required for nitric oxide production. **Gastroenterology** 2010; 139:1686-1698.e6.

CHATURVEDI R, DE SABLET T, COBURN LA, GOBERT AP, WILSON KT. Arginine and polyamines in *Helicobacter pylori*-induced immune dysregulation and gastric carcinogenesis. **Amino Acids** 2012; 42: 627-640.

CLOSS EI, SIMON A, VÉKONY N, ROTMANN A. Plasma membrane transporters for arginine. **J Nutr.** 2004; 134: 2752S-2759S.

COELHO LGV, MARINHO JR, GENTA R, RIBEIRO LT, PASSOS M DO CF, ZATERKA S, ASSUMPTÃO PP, BARBOSA AJA, BARBUTI R, BRAGA LL, BREYER H, CARVALHAES A, CHINZON D, CURY M, DOMINGUES G, JORGE JL, MAGUILNIK I, MARINHO FP, DE MORAES-FILHO JP, PARENTE JML, DE PAULA-E-SILVA CM, PEDRAZZOLI-JÚNIOR J, RAMOS AFP, SEIDLER H, SPINELLI JN, ZIR JV. IVth Brazilian consensus conference on helicobacter pylori

infection. **Arq. Gastroenterol.** 2018; 55:97–121.

CRABTREE JE, SHALLCROSS TM, HEATLEY R V., WYATT JI. Mucosal tumour necrosis factor and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Gut** 1991; 32: 1473–7.

DE BRITO BB, DA SILVA FAF, DE MELO FF. Role of polymorphisms in genes that encode cytokines and *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **World J Clin Oncol.** 2018;9:83-89.

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; 80: 2724–2734.

GÖNEN S, SARI S, KANDUR Y, DALGIÇ B, SÖYLEMEZOĞLU O. Avaliação de antígeno leucocitário humano classe I e II em pacientes pediátricos com gastrite e úlcera duodenal ativas e *Helicobacter pylori* positivo. **Arq Gastroenterol** 2017; 54: 297–9.

HAGYMÁSI K, TULASSAY Z. *Helicobacter pylori* infection: New pathogenetic and clinical aspects. **World Journal of Gastroenterology.** 2014; 20: 6386–6399, 2014.

HARDBOWER DM, ASIM M, MURRAY-STEWART T, CASERO RA, VERRIERE T, LEWIS ND, CHATURVEDI R, PIAZUELO MB, WILSON KT. Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated polyamine metabolism in response to *Helicobacter pylori* infection. **Amino Acids** 2016; 48: 2375–2388.

HOOI JKY, LAI WY, NG WK, SUEN MMY, UNDERWOOD FE, TANYINGOH D, MALFERTHEINER P, GRAHAM DY, WONG VWS, WU JCY, CHAN FKL, SUNG JJY, KAPLAN GG, NG SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology.** 2017 Aug;153:420-429.

HUANG YK, WEN GS, LI HL, HAO P, QI Q, Z LF. [Possible association between HLA-DRB1 and DQB1 genes frequency and susceptibility or resistance to *Helicobacter pylori* infection in Kunming Yi ethnic group children]. **Zhonghua Er Ke Za Zhi.** 2005; 43:137-140.

INFECTION with *Helicobacter pylori*. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum** 1994; 61: 177-240.

KLAUSZ G, TISZAI A, LÉNÁRT Z, GYULAI Z, TISZLAVICZ L, HOGYE M, CSANÁDY M, LONOVICS J, MÁNDI Y: *Helicobacter pylori*-induced immunological responses in patients with duodenal ulcer and in patients with cardiomyopathies. **Acta Microbiol Immunol Hung** 2004; 51: 311–320.

KHULUSI S, MENDALL MA, PATE P, LEVY J, BADVE S, NORTHFIELD TC. *Helicobacter pylori* infection density and gastric inflammation in duodenal ulcer and non-ulcer subjects. **Gut**. 1995;37:319-24.

LEWIS ND, ASIM M, BARRY DP, DE SABLET T, SINGH K, PIAZUELO MB, GOBERT AP, CHATURVEDI R, WILSON KT. Immune Evasion by *Helicobacter pylori* Is Mediated by Induction of Macrophage Arginase II. **J Immunol** 2011; 186: 3632–3641.

LEWIS ND, ASIM M, BARRY DP, SINGH K, DE SABLET T, BOUCHER J-L, GOBERT AP, CHATURVEDI R, WILSON KT. Arginase II Restricts Host Defense to *Helicobacter pylori* by Attenuating Inducible Nitric Oxide Synthase Translation in Macrophages. **J Immunol** 2010; 184: 2572–2582.

MALUF S, SALGADO JV, CYSNE DN, CAMELO DMF, NASCIMENTO JR, MALUF BVT, SILVA LDM, BELFORT MR DE C, SILVA LA, GUERRA RNM, SALGADO FILHO N, NASCIMENTO FRF: Increased Glycated Hemoglobin Levels in Patients With *Helicobacter pylori* Infection Are Associated With the Grading of Chronic Gastritis. **Front Immunol** 2020; 11: 2121.

MICHALKIEWICZ J, HELMIN-BASA A, GRZYWA R, CZERWIONKA-SZAFLARSKA M, SZAFLARSKA-POPLAWSKA A, MIERZWA G, MARSZALEK A, BODNAR M, NOWAK M, DZIERZANOWSKA-FANGRAT K. Innate immunity components and cytokines in gastric mucosa in children with *Helicobacter pylori* infection. **Mediators Inflamm** 2015; 2015: 1-7.

MURRAY PJ, ALLEN JE, BISWAS SK, FISHER EA, GILROY DW, GOERDT S, GORDON S, HAMILTON JA, IVASHKIV LB, LAWRENCE T, LOCATI M, MANTOVANI A, MARTINEZ FO, MEGE JL, MOSSER DM, NATOLI G, SAEIJ JP, SCHULTZE JL, SHIREY KA, SICA A, SUTTLES J, UDALOVA I, VANGINDERACHTER JA, VOGEL SN, WYNN TA. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity** 2014; 41: 14-20.

MURRAY PJ. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology** 2017; 79: 541–566.

PAGLIARI M, MUNARI F, TOFFOLETTO M, LONARDI S, CHEMELLO F, CODOLO G, MILLINO C, DELLA BELLA C, PACCHIONI B, VERMI W, FASSAN M, DE BERNARD M, CAGNIN S. *Helicobacter pylori* Affects the Antigen Presentation Activity of Macrophages Modulating the Expression of the Immune Receptor CD300E through miR-4270. **Front Immunol**. 2017 Oct 12;8:1288.

PETERSEN CP, MEYER AR, DE SALVO C, CHOI E, SCHLEGEL C, PETERSEN A, ENGEVIK AC, PRASAD N, LEVY SE, PEEBLES RS, PIZARRO TT, GOLDENRING JR. A signalling cascade of IL-33 to IL-13 regulates metaplasia in the mouse stomach. **Gut** 2017; 67: 2018.

PETERSEN CP, WEIS VG, NAM KT, SOUSA JF, FINGLETON B, GOLDENRING

JR. Macrophages promote progression of spasmodic polypeptide-expressing metaplasia after acute loss of parietal cells. **Gastroenterology** 2014; 146: 1727-1738.e8.

PLUMMER M, DE MARTEL C, VIGNAT J, FERLAY J, BRAY F, FRANCESCHI S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* 2016; 4: e609–e616.

PRICE AB. The Sydney System: Histological division. **J Gastroenterol Hepatol** 1991; 6: 209–622.

QUIDING-JÄRBRINK M, RAGHAVAN S, SUNDQUIST M. Enhanced M1 Macrophage Polarization in Human *Helicobacter pylori*-Associated Atrophic Gastritis and in Vaccinated Mice. **PLoS ONE** 2010; 5: e15018.

REN C, ZHANG X, SHI H, CHEN D, DUAN Z, ZHANG H, REN F. [Autophagy modulates the levels of inflammatory cytokines in macrophages induced by lipopolysaccharide]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**. 2017;33:581-585

SICA A, ERRENI M, ALLAVENA P, PORTA C. Macrophage polarization in pathology. **Cell. Mol. Life Sci**. 2015; 72: 4111–4126.

SHAH DK, JAIN SS, MOHITE A, AMARAPURKAR AD, CONTRACTOR QQ, RATHI PM. Effect of *H. pylori* density by histopathology on its complications and eradication therapy. **Trop Gastroenterol**. 2015;36:101-6

TYTGAT GNJ. The Sydney System: Endoscopic division. Endoscopic appearances in gastritis/duodenitis. **J Gastroenterol Hepatol** 1991; 6: 223–34.

VILADOMIU M, BASSAGANYA-RIERA J, TUBAU-JUNI N, KRONSTEINER B, LEBER A, PHILIPSON CW, ZOCCOLI-RODRIGUEZ V, HONTECILLAS R. Cooperation of Gastric Mononuclear Phagocytes with *Helicobacter pylori* during Colonization. **J Immunol** 2017; 198: 3195–3204.

VINAGRE RMDF, VINAGRE IDF, VILAR-E-SILVA A, FECURY AA, MARTINS LC. *Helicobacter pylori* infection and immune profile of patients with different gastroduodenal diseases. **Arq Gastroenterol** 2018; 55: 122–127.

WANG J, ZHANG Q, LIU Y, HAN J, MA X, LUO Y, LIANG Y, ZHANG L, HU Y. Association between HLA-IIgene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in Asian and European population: **A meta-analysis**. **Microb Pathog** 2015; 82: 15–26.

WROBLEWSKI LE, PEEK JR., RM, WILSON KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23: 713-739.

YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA T, SAWAI N, IMANISHI J. *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. **Gastroenterology** 1996; 110: 1744–52.

YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA T, SAWN N, KASHIMA K, IMANISHI J. Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with helicobacter pylori infection. **Scand J Gastroenterol** 1995; 30: 1153–9.

ZAMANI M, EBRAHIMTABAR F, ZAMANI V, MILLER WH, ALIZADEH-NAVAEI R, SHOKRI-SHIRVANI J, DERA KHSHAN MH. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** 2018; 47: 868-876.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo observamos que *H. pylori* emprega mecanismos para colonizar e persistir infectando o hospedeiro. O principal objetivo da bactéria é evitar o perfil de macrófagos antimicrobiano. Uma das estratégias é restringir a disponibilidade do substrato para a síntese do óxido nítrico, induzindo a enzima arginase 2. Assim, demonstramos que a infecção com *H. pylori* aumentou a quantidade de macrófagos positivos para Arginase 2 na mucosa gástrica, no entanto, não alterou a expressão de macrófagos M1, sugerindo que a bactéria e seus fatores de virulência induzem um perfil anti-inflamatório para escapar da resposta pró-inflamatória. A presença de macrófagos anti-inflamatórios M2 leva a atenuação da inflamação da mucosa gástrica, mas por outro lado, aumenta a carga bacteriana. Tal fato foi demonstrado quando observamos que pacientes infectados com diagnóstico histológico de gastrite crônica sem lesões pré-neoplásicas e com maior carga bacteriana apresentaram aumento de macrófagos positivos para Arginase 2 e CD163, sugerindo que o perfil funcional de macrófagos M2 reduz a inflamação, no entanto favorece a colonização bacteriana. Além do mais, a redução da expressão de macrófagos IL-10 positivos observada em pacientes com maior densidade de *H. pylori* sugere que o excesso de bactérias pode estar associado a perda do equilíbrio regulador da IL-10 e do perfil tolerogênico M2. Consideramos ainda que a atividade de Arginase no plasma pode não ser um marcador eficiente para traduzir a polarização de macrófagos observada na mucosa gástrica, visto que não houve correlação entre a Arginase no plasma e na mucosa.

Por fim, na infecção com *H. pylori*, a polarização de macrófagos parece interferir diretamente na resposta imune do hospedeiro, influenciando no desfecho da gastrite crônica induzida pela bactéria. Desta forma, aprofundar conhecimentos sobre o comportamento dos macrófagos durante a infecção com *H. pylori* pode contribuir com o entendimento da imunopatologia da infecção e apoiar futuras abordagens terapêuticas ou diagnósticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADI A.T.B. Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. **World J. Gastroenterol.** 2017;23: 2870-2882.
- ABDOLLAHI HAMID , SHAMS S, ZAHEDI MJ, MOGHADDAM SD, HAYATBAKHS MM, ABDOLLAH J. IL-10, TNF- α and IFN- γ Levels in Serum and Stomach Mucosa of *Helicobacter pylori*-Infected Patients. **Iran J Allergy Asthma Immunol.** 2011; 10: 267-271.
- ABRAMSON SL, GALLIN JI. IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. **J. Immunol.** 1990; 144.
- ALGOOD H. M. S.; COVER, T. L. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of interactions between H. pylori and host immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews.** 2006;19(4): 597–613.
- ALGOOD HMS, COVER TL. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of interactions between H. pylori and host immune defenses. **Clin. Microbiol. Rev.** 2006; 19:597–613.
- ALGOOD HMS, COVER TL. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of
- AMEDEI A.; CAPPON A.; CODOLO G.; CABRELLE A.; POLENGHI A.; BENAGIANO M.; TASCA E.; AZZURRI A.; D'ELIOS M.M.; DEL PRETE G.; DE BERNARD M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. **J Clin Invest.** 2006;116(4):1092-101.
- ANDO T.; GOTO Y.; MAEDA O; WATANABE O.; ISHIGURO K.; GOTO H. Casual role of *Helicobacter pylori* infection in gastric câncer. **World J Gastroenterol.** 2006.12(2):181-186.
- APPELBERG R. As células Fagocíticas. In: AVEVEDO, C. **Biologia Celular e molecular.** Lisboa: LIDEL. 2005;491-502.
- APPELBERG R. As células Fagocíticas. In: AVEVEDO, C. **Biologia Celular e molecular.** Lisboa: LIDEL, 2005. p. 491-502.
- APPELMELK BJ, NEGRINI R, MORAN AP, KUIPERS EJ. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. **Trends Microbiol.** 1997; 5:70-3.
- ASIM M, CHATURVEDI R, HOGE S, LEWIS ND, SINGH K, BARRY DP, ALGOOD HS, DE SABLET T, GOBERT AP, WILSON KT. *Helicobacter pylori* induces ERK-dependent formation of a phospho-c-Fos c-Jun activator protein-1 complex that causes apoptosis in macrophages. **J Biol Chem.** 2010; 285:20343–20357.
- ASPINALL G. O.; MONTEIRO, M. A. Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. **Biochemistry.** 1996; 35: 2498-2504.

- ATHERTON J. C.; BLASER, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: Ancient history, modern implications. **Journal of Clinical Investigation**. 2009; 119: 2475–2487.
- ATRI C, GUERFALI FZ, LAOUINI D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **Int. J. Mol. Sci**. 2018; 19:1801.
- AZIZ RK, KHALIFA MM, SHARAF RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. **J. Adv. Res**. 2015; 6:539–547.
- BABIOR BM. Oxygen-Dependent Microbial Killing by Phagocytes. **N. Engl. J. Med**. 1978; 298:659–668.
- BACKERT S.; BLASER M.J. The Role of CagA in the Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. **Cancer Res**. 2016;76(14):4028-31.
- BAE JM, KIM EH. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Korea: A quantitative systematic review. **J. Prev. Med. Public Heal**. 2016; 49:197–204.
- BARBOSA K B F, COSTA N M B, ALFENAS R C G, DE PAULA S O, MINIM V P R, BRESSAN J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors . Rev. Nutr., Campinas. 2010; 23:629-643.
- BASHIR S, SHARMA Y, ELAHI A, KHAN F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflamm. Res**. 2016; 65:1–11.
- BASSO D, PLEBANI M, KUSTERS JG. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**. 2010; 15:14–20.
- BATTS KP, KETOVER S, KAKAR S, KRASINSKAS AM, MITCHELL KA, WILCOX R, WESTERHOFF M, RANK J, GIBSON J, MATTIA AR, CUMMINGS OW, DAVISON JM, NAINI BV, DRY SM, YANTISS RK. Appropriate use of special stains for identifying *helicobacter pylori*: Recommendations from the Rodger C. Haggitt gastrointestinal pathology society. **Am. J. Surg. Pathol**. 2013; 37.
- BECEIRO S, RADIN JN, CHATUVEDI R, PIAZUELO MB, HORVARTH DJ, CORTADO H, GU Y, DIXON B, GU C, LANGE I, KOOMOA DL, WILSON KT, ALGOOD HMS, PARTIDA-SÁNCHEZ S. TRPM2 ion channels regulate macrophage polarization and gastric inflammation during *Helicobacter pylori* infection. **Mucosal Immunol**. 2017; 10:493–507.
- BENOIT SL, MAIER RJ. *Helicobacter* catalase devoid of catalytic activity protects the bacterium against oxidative stress. **J. Biol. Chem**. 2016; 291: 23366–23373.
- BERGMAN M.; D'ELIOS M.M. Cytotoxic T cells in *H. pylori*-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. **J Biomed Biotechnol**. 2010; 10:49-58.
- BEYER M, MALLMANN MR, XUE J, STARATSCHEK-JOX A, VORHOLT D, KREBS W, SOMMER D, SANDER J, MERTENS C, NINO-CASTRO A, SCHMIDT S V.,

- SCHULTZE JL. High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. **PLoS One** 2012; 7.
- BHATTACHARYYA S, GHOSH S, DASGUPTA B, MAZUMDER D, ROY S, MAJUMDAR S. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **J. Infect. Dis.** 2002; 185:1704–1708.
- BISWAS SK, CHITTEZHATH M, SHALOVA IN, LIM JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. **Immunol. Res.** 2012; 53:11–24.
- BIZZOZERO G. Ueber die schlauchformigen drusen des magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel der schleimhaut. **Arch. Mikr Anat.** 1893; 42.
- BLASER M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J Clin Invest.** 2001;7: 767-773.
- BLASER MJ, PARSONNET J. Parasitism by the ‘slow’ bacterium *helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. **J. Clin. Invest.** 1994; 94:4–8.
- BLASER MJ. The versatility of *Helicobacter pylori* in the adaptation to the human stomach. **J. Physiol. Pharmacol.** 1997; 48:307–314.
- BOGDAN C. Nitric Oxide and the immune response. **Nature Immunology.** 2001; 2:907-915.
- BORLACE GN, JONES HF, KEEP SJ, BUTLER RN, BROOKS DA. *Helicobacter pylori* phagosome maturation in primary human macrophages. **Gut Pathog.** 2011 23;3:3.
- BRAGA TT, AGUDELO JS, Camara NO. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. **Front Immunol.** 2015; 25:6:602.
- BROWN LM. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol. Rev.** 2000; 22:283–297.
- BUI D, BROWN HE, HARRIS RB, OREN E. Serologic evidence for fecal-oral transmission of *helicobacter pylori*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2016; 94:82–88.
- BURUCOA C, DELCHIER JC, COURILLON-MALLET A, DE KORWIN JD, MÉGRAUD F, ZERBIB F, RAYMOND J, FAUCHÈRE JL. Comparative evaluation of 29 commercial *helicobacter pylori* serological kits. **Helicobacter** 2013; 18:169–179.
- BUTCHER LD, DEN HARTOG G, ERNST PB, CROWE SE. Oxidative Stress Resulting from *Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. **CMGH.** 2017; 3:316–322.
- CAO H, WOLFF RG, MELTZER MS, CRAWFORD RM. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN-gamma and IL-4. **J. Immunol.**

1989; 143.

CARBO A, BASSAGANYA-RIERA J, PEDRAGOSA M, VILADOMIU M, MARATHE M, EUBANK S, WENDELSDORF K, BISSET K, HOOPS S, DENG X, ALAM M, KRONSTEINER B, MEI Y, HONTECILLAS R. Predictive Computational Modeling of the Mucosal Immune Responses during *Helicobacter pylori* Infection. **PLoS One** 2013; 8: e73365.

CARDOSO EM. Visão Global do sistema imunológico. *In*: AROSA FA, CARDOSO EM, PACHECO FC. **Fundamentos de Imunologia**. Lisboa: LIDEL, 2012. p. 31-56.

CARTÁGENES VDA, MARTINS LC, CARNEIRO LM, BARILE KADS, CORVELO TC. *Helicobacter pylori* em crianças e associação de cepas CagA na transmissão mãe-filho na Amazônia brasileira. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2009; 42:298–302.

CASSETTA L, CASSOL E, POLI G. Macrophage polarization in health and disease. **Scientific World Journal**. 2011;11:2391-402.

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 mucin viscoelasticity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009;106:14321-6.

CHATURVEDI R.; ASIM M.; HOGE S.; LEWIS N.D.; SINGH K.; BARRY D.P.; DE SABLET T.; PIAZUELO M.B.; SARVARIA A.R.; CHENG Y.; CLOSS E.I.; CASERO R.A. JR.; GOBERT A.P.; WILSON K.T. Polyamines Impair Immunity to *Helicobacter pylori* by Inhibiting L-Arginine Uptake Required for Nitric Oxide Production. **Gastroenterology**. 2010; 139:1686-98.

CHATURVEDI R, ASIM M, LEWIS ND, ALGOOD HM, COVER TL, KIM PY, WILSON KT. L-Arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**. 2007; 75:4305–4315.

CHATURVEDI R, CHENG Y, ASIM M, BUSSIÈRE FI, XU H, GOBERT AP, HACKER A, CASERO RA JR, WILSON KT. Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. **J Biol Chem**. 2004; 279:40161-73.

CHATURVEDI R, DE SABLET T, COBURN LA, GOBERT AP, WILSON KT. Arginine and polyamines in *Helicobacter pylori*-induced immune dysregulation and gastric carcinogenesis. **Amino Acids** 2012; 42: 627-640

CHISTIAKOV DA, BOBRYSHV YV, NIKIFOROV NG, ELIZOVA NV, SOBENIN IA, OREKHOV AN. Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. **Int J Cardiol**. 2015; 184:436-45.

CHMIELA M, KUPCINSKA J. Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2019;4:e12638.

CHU Y.T.; WANG Y.H.; WU J.J.; LEI H.Y. Invasion and multiplication of *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells: implications for antibiotic resistance. *Infect Immun*. 2010; 8:4157-65.

CIRAK MY, AKYÖN Y, MÉGRAUD F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2007; 12, 4–9.

CLARK CE, HINGORANI SR, MICK R, COMBS C, TUVESON DA, VONDERHEIDE RH. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*. 2007; 67:9518–9527.

CLOSS EI, SIMON A, VÉKONY N, ROTMANN A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr*. 2004; 134: 2752S-2759S.

COELHO LGV, MARINHO JR, GENTA R, RIBEIRO LT, PASSOS M DO CF, ZATERKA S, ASSUMPÇÃO PP, BARBOSA AJA, BARBUTI R, BRAGA LL, BREYER H, CARVALHAES A, CHINZON D, CURY M, DOMINGUES G, JORGE JL, MAGUILNIK I, MARINHO FP, DE MORAES-FILHO JP, PARENTE JML, DE PAULA-E-SILVA CM, PEDRAZZOLI-JÚNIOR J, RAMOS AFP, SEIDLER H, SPINELLI JN, ZIR JV. IVth Brazilian consensus conference on helicobacter pylori infection. *Arq. Gastroenterol*. 2018; 55:97–121.

COMALADA M, YERAMIAN A, Modolell M, Lloberas J, Celada A. Arginine and macrophage activation. *Methods Mol Biol*. 2012; 844:223-35.

COSGUN Y, YILDIRIM A, YUCEL M, KARAKOC AE, KOCA G, GONULTAS A, GURSOY G, USTUN H, KORKMAZ M. Evaluation of Invasive and Noninvasive Methods for the Diagnosis of *Helicobacter Pylori* Infection. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17: 5265-5272.

COVACCI A, RAPPUOLI R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J. Exp. Med*. 2000; 191:587–592.

CRABTREE JE, COURT M, ABOSHKIWA MA, JEREMY AH, DIXON MF, ROBINSON PA. Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J. Pathol*. 2004; 202:197–207.

CRABTREE JE, SHALLCROSS TM, HEATLEY R V., WYATT JI. Mucosal tumour necrosis factor and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991; 32: 1473–7.

CUNHA RPA, ALVES FP, ROCHA AMC, ROCHA GA, CAMARGO LMA, NOGUEIRA POP, CAMARGO EP, QUEIROZ DMM. Prevalence and risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in native populations from Brazilian Western Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 2003; 97:382–386.

DAVID JR. Lymphocyte mediators and cellular hypersensitivity. **The New England journal of medicine**. 1973; 288: 143-149.

DAVIES LC, JENKINS SJ, ALLEN JE, TAYLOR PR. Tissue-resident macrophages. **Nat. Immunol**. 2013; 14:986–995.

DE BRITO BB, DA SILVA FAF, DE MELO FF. Role of polymorphisms in genes that encode cytokines and *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **World J Clin Oncol**. 2018;9:83-89.

DEBOWSKI, A.W.; WALTON, S.M.; CHUA, E.-G.; TAY, A.C.-Y.; LIAO, T.; LAMICHHANE, B.; HIMBECK, R.; STUBBS, K.A.; MARSHALL, B.J.; FULURIJA, A.; et al. *Helicobacter pylori* gene silencing in vivo demonstrates urease is essential for chronic infection. **PLoS Pathog**. 2017;13:e1006464.

DELAVARY BM, VAN DER VEER WM, VAN EGMOND M, NIESSEN FB, BEELEN RHJ. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**. 2011; 216:753–762.

DÍAZ P, VALDERRAMA M V, BRAVO J, ANDREW F. G. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. **Front. Microbiol**. 2018; 9: a0005.

DIVANGAHI M, KING IL, PERNET E. Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. **Trends Immunol**. 2015; 36:307–314.

DOOLEY C.P.; COHEN H.; FITZGIBBONS P.L.; BAUER M.; APPLEMAN M.D; PEREZ-PEREZ G.I.; BLASER M.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. **N Engl J Med** 1989;321(23):1562-6.

DUNNE C.; DOLAN B.; CLYNE M. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. **World J Gastroenterol**. 2014; 20:5610-24.

DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO M das G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. e Med. Lab**. 2003; 39:343–350.

DUSSE LMS. Óxido nítrico (NO): o desafio de sua determinação. **Laes & Haes**. 1998; 1:176-184.

EPELMAN S, LAVINE KJ, RANDOLPH GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**. 2014; 41:21–35.

FARINATI F, CARDIN R, DEGAN P, RUGGE M, MARIO FD, BONVICINI P, NACCARATO R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. **Gut**. 1998;42:351-6.

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; 80: 2724–2734.

FERWANA M, ABDULMAJEED I, ALHAJIAHMED A, MADANI W, FIRWANA B, HASAN R, ALTAYAR O, LIMBURG PJ, MURAD MH, KNAWY B. Accuracy of urea breath test in *Helicobacter pylori* infection: Meta-analysis. **World J. Gastroenterol.** 2015; 21:1305–1314.

FIGURA N, ODERDA G. Reflections on the first description of the presence of helicobacter species in the stomach of mammals. **Helicobacter.** 1996; 1:4–5.

FUJIKAWA A.; SHIRASAKA D.; YAMAMOTO S.; OTA H.; YAHIRO K.; FUKADA M.; SHINTANI T.; WADA A.; AOYAMA N.; HIRAYAMA T.; FUKA-MACHI H.; NODA M. Mice tyrosine phosphatase Z receptor-deficient mice are resistant to gastric ulcer induction by *Helicobacter pylori* VacA. **Nat Genet.** 2003;33: 375–381.

FUJIWARA N, KOBAYASHI K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** 2005;4:281-6.

GALGANI M, BUSIELLO I, CENSINI S, ZAPPACOSTA S, RACIOPPI L, ZARRILLI R. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: role of the cag pathogenicity island. **Infect Immun.** 2004;72(8):4480-4485.

GEISSMANN F, MANZ MG, JUNG S, SIEWEKE MH, MERAD M, LEY K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science** 2010; 327:656–661.

GERHARD M, LEHN N, NEUMAYER N, BORÉN T, RAD R, SCHEPP W, MIEHLKE S, CLASSEN M, PRINZ C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. **Proc Natl Acad Sci.** 1999; 96: 12778–12783.

GHOSE C, PEREZ-PEREZ GI, VAN DOORN LJ, DOMÍNGUEZ-BELLO MG, BLASER MJ. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. **J Clin Microbiol.** 2005; 43: 2635–2641.

GISBERT JP, PAJARES JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A systematic review. **Helicobacter.** 2004; 9:347–368.

GLOCKER E, LANGE C, COVACCI A, BERESWILL S, KIST M, PAHL HL. The proteins encoded by the pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are necessary for the activation of NF-kappaB. **Infect Immun.** 1998;66 (5): 2346-2348.

GOBERT AP, CHENG Y, WANG J Y, BOUCHER J L, IYER R K, CEDERBAUM S D, CASERO RA JR, NEWTON JC, WILSON KT. *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. **J Immunol.** 2002; 168:4692-4700.

GOBERT AP, VERRIERE T, ASSIM M, BARRY DP, PIAZUELO MB, DE SABLET T, DELGADO AG, BRAVO LE, CORREA P, PEEK RM JR, CHATURVEDI R, WILSON KT. Heme Oxygenase-1 Dysregulates Macrophage Polarization and the Immune Response to *Helicobacter pylori*. **The Journal of Immunology**. 2014;193:3013-3022.

GOBERT AP.; ASIM M.; PIAZUELO M.B.; VERRIERE T.; SCULL B.P.; DE SABLET T.; GLUMAC A.; LEWIS N.D.; CORREA P.; PEEK R.M. JR.; CHATURVEDI R.; WILSON K.T. Disruption of nitric oxide signaling by *Helicobacter pylori* results in enhanced inflammation by inhibition of heme oxygenase-1. **J Immunol**. 2011;187:5370-9.

GOBERT AP, CHENG Y, AKHTAR M, MERSEY BD, BLUMBERG DR, CROSS RK, CHATURVEDI R, DRACHENBERG CB, BOUCHER J-L, HACKER A, CASERO RA, WILSON KT. Protective Role of Arginase in a Mouse Model of Colitis. **J Immunol**. 2004; 173: 2109–2117.

GOBERT AP, CHENG Y, WANG J-Y, BOUCHER J-L, IYER RK, CEDERBAUM SD, CASERO RA, NEWTON JC, WILSON KT. *Helicobacter pylori* Induces Macrophage Apoptosis by Activation of Arginase II. **J Immunol**. 2002;168: 4692–4700.

GOBERT AP, MCGEE DJ, AKHTAR M, MENDZ GL, NEWTON JC, CHENG Y, MOBLEY HLT, WILSON KT. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: A strategy for bacterial survival. **Proc Natl Acad Sci**. 2001; 98: 13844–13849.

GOBERT AP, VERRIERE T, ASIM M, BARRY DP, PIAZUELO MB, DE SABLET T, DELGADO AG, BRAVO LE, CORREA P, PEEK RM, CHATURVEDI R, WILSON KT. Heme Oxygenase-1 Dysregulates Macrophage Polarization and the Immune Response to *Helicobacter pylori*. **J Immunol**. 2014; 193: 3013–3022.

GOBERT AP, WILSON KT. Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: A blessing in disguise. **Free Radic. Biol. Med**. 2017; 105:16–27.

GOGOI M, DATEY A, WILSON KT, CHAKRAVORTTY D. Dual role of arginine metabolism in establishing pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol*. 2016; 29:43–48.

GÖNEN S, SARI S, KANDUR Y, DALGIÇ B, SÖYLEMEZOĞLU O. Avaliação de antígeno leucocitário humano classe I e II em pacientes pediátricos com gastrite e úlcera duodenal ativas e *Helicobacter pylori* positivo. **Arq Gastroenterol** 2017; 54: 297–9.

GOODWIN CS, ARMSTRONG JA, CHILVERS T, PETERS M, COLLINS MD, SLY L, MCCONNELL W, HARPER WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. **Int J Syst Bacteriol**. 1989; 39: 397–405.

GORDON S, MARTINEZ-POMARES L. Physiological roles of macrophages. **Eur J Physiol.** 2017; 469:365–374.

GRAHAM D.Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implication for therapy. **Gastroenterology** 1998; 115:1272-1277.

HAGYMÁSI K, TULASSAY Z. *Helicobacter pylori* infection: New pathogenetic and clinical aspects. **World Journal of Gastroenterology.** 2014; 20: 6386–6399, 2014.

HARA NH, RABELO-GONÇALVES EMA, SERVIDO MFCP, NISHIMURA NF, ZATERKA S, PARENTE JML, ZEITUNE JMR. Prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori* em crianças do mesmo nível socioeconômico em dois estados do Brasil. In: SEMANA BRASILEIRA DO APARELHO DIGESTIVO, 8., 2008, Brasília. **Anais [...].** Brasília, 2008.

HARDBOWER D. M.; ASSIM M.; MURRAY-STEWART T.; CASERO R.A JR.; VERRIERE T.; LEWIS N.D.; CHATURVEDI R.; PIAZUELO M.B.; WILSON K.T. Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated polyamine metabolism in response to *Helicobacter pylori* infection. **Amino Acids** 2016; 48.10: 2375–2388.

HARDBOWER D. M.; PEEK JR. R. M.; WILSON K. T. At the Bench: *Helicobacter pylori*, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer. **Journal of Leukocyte Biology.** 2014; 96(2):201–212.

HARDBOWER D.M.; ASIM M.; LUIS P.B.; SINGH K.; BARRY D.P.; YANG C.; STEEVES M.A.; CLEVELAND J.L.; SCHNEIDER C.; PIAZUELO M.B.; GOBERT A.P.; WILSON K.T. Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 2017;114(5):751–760.

HARDBOWER D.M.; DE SABLET T.; CHATURVEDI R.; WILSON K.T. Chronic inflammation and oxidative stress: the smoking gun for *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer? **Gut Microbes.** 2013; 4.6:475-81.

HARDBOWER DM, ASIM M, LUIS PB, SINGH K, BARRY DP, YANG C, STEEVES MA, CLEVELAND JL, SCHNEIDER C, PIAZUELO MB, GOBERT AP, WILSON KT. Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications. **Proc Natl Acad Sci.** 2014; 114: E751–E760.

HERRERA V, PARSONNET J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. **Clinical Microbiology and Infection.** 2009; 15: 971–976.

HESSEY S. J.; SPENCER J.; WYATT J.I.; SOBALA G.; RATHBONE B.J.; AXON A.T.; DIXON M.F. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. **Gut.** 1990; 31:134–138.

HO B, MARSHALL BJ. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Serologic testing. **Gastroenterol Clin N Am** 2000; 29: 853-862.

HOOI JKY, LAI WY, NG WK, SUEN MMY, UNDERWOOD FE, TANYINGOH D, MALFERTHEINER P, GRAHAM DY, WONG VWS, WU JCY, CHAN FKL, SUNG JJY, KAPLAN GG, NG SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**. 2017 Aug;153:420-429.

HUANG RJ, CHOI AY, TRUONG CD, YEH MM, HWANG JH. Diagnosis and management of gastric intestinal metaplasia: Current status and future directions. **Gut Liver** 2019; 13:596–603.

HUANG YK, WANG QL, CHENG DD, XU WT, LU NH. Adhesion and invasion of gastric mucosa epithelial cells by *Helicobacter Pylori*. **Front Cell Infect Microbiol**. 2016; 6:159.

HUANG Y, WEN GS, LI HL, HAO P, QI Q, Z LF. [Possible association between HLA-DRB1 and DQB1 genes frequency and susceptibility or resistance to *Helicobacter pylori* infection in Kunming Yi ethnic group children]. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**. 2005; 43:137-140.

HUTCHINSON J.A.; RIQUELME P.; GEISLER E.K.; FÄNDRICH F. Human regulatory macrophages. **Methods Mol Biol**. 2011; 677:181-92.

ILVER D, ARNQVIST A, ÖGREN J, FRICK IM, KERSULYTE D, INCECIK ET, BERG DE COVACCI A, ENGSTRAND L, BORÉN T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**. 1998; 279:373–377.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Helicobacter pylori* eradication as a strategy for preventing gastric cancer**: IARC *Helicobacter pylori* Working Group. Lyon, France: IARC, 2014.

ISHAQ S, NUNN L. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: A state of the art review. **Gastroenterol Hepatol. from Bed to Bench**. 2015; 8:S6–S14.

ITALIANI P, MAZZA EMC, LUCCHESI D, CIFOLA I, GEMELLI C, GRANDE A, BATTAGLIA C, BICCIATO S, BORASCHI D. Transcriptomic Profiling of the Development of the Inflammatory Response in Human Monocytes *In Vitro*. **PLoS One**. 2014; 9: e87680.

ITALIANI P.; MAZZA M.; LUCCHESI D.; CIFOLA I.; GEMELLI C.; GRANDE A.; BATTAGLIA C.; BICCIATO S.; BORASCH D. Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes *in vitro* e87680. **PLoS ONE**. 2014;9 (2):876-880.

ITOH T.; KOBAYASHI D.; UCHIDA K.; TAKEMURA T.; NAGAOKA S.; KOBAYASHI I.; YOKOYAMA T.; FURUKAWA A.; SEKINE M.; ANDO N.; SUZUKI Y.; YAMADA T.;

SUZUKI T.; EISH Y. *Helicobacter pylori* invades the gastric mucosa and translocates to the gastric lymph nodes. **Lab Invest.** 2008; 88(6):664-81.

ITOH T, WAKATSUKI Y, YOSHIDA M, USUI T, MATSUNAGA Y, KANEKO S, CHIBA T, KITA T. The vast majority of gastric T cells are polarized to produce T helper 1 type cytokines upon antigenic stimulation despite the absence of *Helicobacter pylori* infection. **J Gastroenterol.** 1999; 34: 560–570.

JETTEN N.; VERBRUGGEN S.; GIJBELS M.J.; POST M.J.; DE WINTHER M.P.; DONNERS M.M. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis *in vivo*. **Angiogenesis.** 2014;17(1):109-18.

JOHNSON KS, OTTEMANN KM. Colonization, localization, and inflammation: the roles of *H. pylori* chemotaxis *in vivo*. **Curr Opin Microbiol.** 2018; 41:51-57.

KAPARAKIS M.; WALDUCK A.K.; PRICE J.D.; PEDERSEN J.S.; VAN ROOIJEN N.; PEARSE M.J. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. **Infect Immun.** 2008; 76:2235–9.

KAWAI T, AKIRA S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity.** 2011; 34: 637–650.

KAWAKAMI E, MACHADO RS, REBER M, PATRÍCIO FRS. 13 C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing *helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 2002; 35:39-43.

KHULUSI S, MENDALL MA, PATE P, LEVY J, BADVE S, NORTHFIELD TC. *Helicobacter pylori* infection density and gastric inflammation in duodenal ulcer and non-ulcer subjects. **Gut.** 1995;37:319-24.

KIM JS, KIM BW, HAM JH, PARK HW, KIM YK, LEE MY, JI JS, LEE BI, CHOI H. Sequential Therapy for *Helicobacter pylori* Infection in Korea: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gut Liver.** 2013;7:546-51.

KLAUSZ G, TISZAI A, LÉNÁRT Z, GYULAI Z, TISZLAVICZ L, HOGYE M, CSANÁDY M, LONOVICS J, MÁNDI Y: *Helicobacter pylori*-induced immunological responses in patients with duodenal ulcer and in patients with cardiomyopathies. **Acta Microbiol Immunol Hung** 2004; 51: 311–320.

KONTUREK SK, KONTUREK PC. Role of nitric oxide in the digestive system. **Digestion.** 1995; 56:1–13.

KOPPENSTEINER, H.; BRACK-WERNER, R. E SCHINDLER, M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. **Retrovirology.** 2012; 9:82, pp. 1-11.

KOUMI A, FILIPPIDIS T, LEONTARA V, MAKRI L, PANOS MZ. Detection of

Helicobacter pylori: A faster urease test can save resources. **World J. Gastroenterol.** 2011; 17:349–353.

KRAKOWIAK MS, NOTO JM, PIAZUELO MB, HARDBOWER DM, ROMERO-GALLO J, DELGADO A, CHATURVEDI R, CORREA P, WILSON KT, PEEK RM. Matrix metalloproteinase 7 restrains *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and premalignant lesions in the stomach by altering macrophage polarization. **Oncogene** 2014; 34: 1865–1871.

KRAUSS-ETSCHMANN S, GRUBER R, PLIKAT K, ANTONI I, DEMMELMAIR H, REINHARDT D, KOLETZKO S. Increase of antigen-presenting cells in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children. **Helicobacter** 2005; 10: 214–222.

KRIENITZ W. Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. **Dtsch Medizinische Wochenschrift** 1906; 32: 872.

KUROWSKA-STOLARSKA M, STOLARSKI B, KEWIN P, MURPHY G, CORRIGAN CJ, YING S, PITMAN N, MIRCHANDANI A, RANA B, VAN ROOIJEN N, SHEPHERD M, MCSHARRY C, MCINNES IB, XU D, LIEW FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. **J Immunol.** 2009;183:6469-77.

KUSTERS JG, VAN VLIET AHM, KUIPERS EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Microbiology Reviews** 2006; 19: 449–490.

LAINE L, WEINSTEIN WM. Histology of alcoholic hemorrhagic “gastritis”: A prospective evaluation. **Gastroenterology** 1988; 94: 1254–1262.

LASKIN DL. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: A battle of forces. **Chemical Research in Toxicology** 2009; 22: 1376–1385.

LAVINE KJ, EPELMAN S, UCHIDA K, WEBER KJ, NICHOLS CG, SCHILLING JD, ORNITZ DM, RANDOLPH GJ, MANN DL. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. **Proc Natl Acad Sci** 2014; 111: 16029–16034.

LEAL YA, FLORES LL, FUENTES-PANANÁ EM, CEDILLO-RIVERA R, TORRES J. 13C-Urea Breath Test for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Helicobacter** 2011; 16: 327–337.

LEPPER PM, TRIANTAFILOU M, SCHUMANN C, SCHNEIDER EM, TRIANTAFILOU K. Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4. **Cell Microbiol** 2005; 7: 519–528.

LEWIS N.D.; ASIM M.; BARRY D.P.; SINGH K.; DE SABLET T.; BOUCHER J-L.; GOBERT A.P.; CHATURVEDI R.; WILSON K.T. Arginase II restricts host defense to

Helicobacter pylori by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. **J. Immunol.** 2010; 184:2572–2582.

LEWIS ND, ASIM M, BARRY DP, DE SABLET T, SINGH K, PIAZUELO MB, GOBERT AP, CHATURVEDI R, WILSON KT. Immune Evasion by *Helicobacter pylori* Is Mediated by Induction of Macrophage Arginase II. **J Immunol** 2011; 186: 3632–3641.

LINDHOLM C.; QUIDING-JÄRBRINK M.; LÖNROTH H.; HAMLET A; SVENNERHOLM A.M. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. **Infect Immun** 1998; 66:5964-71.

LIVER D. ARNQVIST A.; OGREN J.; FRICK I.M.; KERSULYTE D.; INCECIK E.T.; BERG D.E.; COVACCI A.; ENGSTRAND L.; BOREN T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**. 1998; 279(34):373–377.

LOGAN RPH, WALKER MM. ABC of the upper gastrointestinal tract: epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Brit. Med. J.** 2001; 323: 920-3.

LUNDGREN A.; STROMBERG E.; SJOLING A.; LINDHOLM C.; ENARSSON K.; EDEBO A.; JOHNSON E.; SURI-PAYER E.; LARSSON P.; RUDIN A.; SVENNERHOLM A.M.; LUNDIN B.S. High-expression CD4 + CD25 regulatory T cells in mucosal FOXP3 in patients infected with *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**. 2005; 73:523-53.

MALFERTHEINER P, CHAN FK, MCCOLL K EL. Peptic ulcer disease. **The Lancet**. 2009; 374: 1449–1461.

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C, GISBERT JP, KUIPERS EJ, AXON A, BAZZOLI F, GASBARRINI A, ATHERTON J, GRAHAM DY, HUNT R, MOAYYEDI P, ROKKAS T, RUGGE M, SELGRAD M, SUERBAUM S, SUGANO K, EL-OMAR E, AGREUS L, ANDERSEN LP, COELHO L, DELCHIER JC, DI MARIO F, DINIS-RIBEIRO M, FISCHBACH W, FLAHOUB, FOCK KM, GASBARRINI G, GENSINI G, GOH KL, HERRERO R, KUPCINSKAS L, LANAS A, LEJA M, MACHADO JC, MAHACHAI V, MILOSAVLJEVIC T, NIV Y, RISTIMAKI A, TEPEB, VAIRA D, VIETH M, YOU W. Management of *helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence consensus report. **Gut** 2017; 66: 6-30.

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN CA, GISBERT JP, KUIPERS EJ, AXON AT, BAZZOLI F, GASBARRINI A, ATHERTON J, GRAHAM DY, HUNT R, MOAYYEDI P, ROKKAS T, RUGGE M, SELGRAD M, SUERBAUM S, SUGANO K, EL-OMAR EM. Management of *Helicobacter pylori* infection - The Maastricht IV/ Florence consensus report. **Gut, BMJ Publishing Group** 2012; 61: 646–664.

MALUF S, SALGADO JV, CYSNE DN, CAMELO DMF, NASCIMENTO JR, MALUF BVT, SILVA LDM, BELFORT MR DE C, SILVA LA, GUERRA RNM, SALGADO FILHO N, NASCIMENTO FRF: Increased Glycated Hemoglobin Levels in Patients

With *Helicobacter pylori* Infection Are Associated With the Grading of Chronic Gastritis. **Front Immunol** 2020; 11: 2121.

MANES G, ZANETTI M V, PICCIRILLO MM, LOMBARDI G, BALZANO A, PIERAMICO O. Accuracy of a new monoclonal stool antigen test in post-eradication assessment of *Helicobacter pylori* infection: Comparison with the polyclonal stool antigen test and urea breath test. **Dig Liver Dis** 2005; 37: 751–755.

MANTOVANI A.; SICA A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol**. 2010; 22:231-7.

MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A., LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**. 2004; 25: 667-686.

MARSHALL B J, GOODWIN CS. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 1987;68:37.

MARSHALL, BJ, WARREN JR. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric campylobacter. **Med J Aust**, 1985;142: 436-439,

MARSHALL, BJ, WARREN JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, 1984; 8336:1273-1275.

MARTINEZ F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. **F1000Prime Reports**. 2014;6.

MARTINEZ FO, GORDON S, LOCATI M, MANTOVANI A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. **J Immunol** 2006; 177: 7303–7311.

MATSUYAMA N, KIRIKAE T, KIRIKAE F, HASHIMOTO M, AMANO KI, HAYASHI S, HIRAI Y, KUBOTA T, NAKANO M. Non-standard biological activities of lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori*. **J Med Microbiol** 2001; 50: 865–869.

MCGEE DJ, LANGFORD ML, WATSON EL, CARTER JE, CHEN YT, OTTEMANN KM. Colonization and inflammation deficiencies in Mongolian gerbils infected by *Helicobacter pylori* chemotaxis mutants. **Infect Immun** 2005; 73: 1820–1827.

MCKENZIE ANJ, CULPEPPER JA, DE WAAL MALEFYT R, BRIERE F, PUNNONEN J, AVERSA G, SATO A, DANG W, COCKS BG, MENON S, DE VRIES JE, BANCHEREAU J, ZURAWSKI G. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. **Proc Natl Acad Sci** 1993; 900: 3735–3739.

MÈGE J.L.; MEHRAJ V.; CAPO C. Macrophage polarization and bacterial infections. **Curr Opin Infect Dis**. 2011;24:230-4.

MÉGRAUD F, LEHOURS P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev** 2007; 20: 280-322.

MEJÍAS-LUQUE R, GERHARD M. Immune evasion strategies and persistence of *Helicobacter pylori*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. [S. l.]: Springer Verlag, 2017. v. 400, 53–71. *E-book*.

MENONI SMF, BONON SHA, ZEITUNE JMR, COSTA SCB. PCR-based detection and genotyping of *helicobacter pylori* in endoscopic biopsy samples from Brazilian patients. **Gastroenterol Res Pract** 2013; 2013: 951034.

METCHNIKOFF E. On the Present State of the Question of Immunity in Infectious Diseases. **Scand J Immunol** 1989; 30: 387–98.

MICHALKIEWICZ J, HELMIN-BASA A, GRZYWA R, CZERWIONKA-SZAFLARSKA M, SZAFLARSKA-POPLAWSKA A, MIERZWA G, MARSZALEK A, BODNAR M, NOWAK M, DZIERZANOWSKA-FANGRAT K. Innate immunity components and cytokines in gastric mucosa in children with *Helicobacter pylori* infection. **Mediators Inflamm** 2015; 2015: 1-7.

MIDOLO P, MARSHALL BJ. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*: Urease tests. **Gastroenterol Clin North Am** 2000; 29: 871–8.

MILLS CD, KINCAID K, ALT JM, HEILMAN MJ, HILL AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **J Immunol** 2000; 164: 6166–73.

MILLS CD, LEY K. M1 and M2 Macrophages: The Chicken and the Egg of Immunity. **J Innate Immun** 2014; 6: 716–26.

MILLS CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32:463-88.

MITCHELL HM. Epidemiology of infection. *In*: MOBLEY HLT, MENDZ GL, HAZELL SL (Eds). ***Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics**. Washington: ASM Press, 2001. 7-18.

MOGHADDAM A S, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, TAGHADOSI M, ESMAEILI S-A, FATEMEH MARDANI, SEIFI B, MOHAMMADI A, JALIL T A, SAHEBKAR A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology** 2018; 223:6425-6440.

MOON SW, HYO KIM T, SIK KIM H, JU JH, JEONG AHN Y, JEONG JANG H, GOON SHIM S, JIN KIM H, TAE JUNG W, LEE OJ. United rapid urease test is superior than separate test in detecting *Helicobacter pylori* at the gastric antrum and body specimens. **Clin Endosc** 2012; 45: 392–396.

MORAN AP, LINDNER B, WALSH EJ. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. **J**

Bacteriol 1997; 179: 6453–63.

MORRIS A, NICHOLSON G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. **Am J Gastroenterol** 1987; 82: 192-199.

MOSSER, DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology** 2008; 8: 958–969.

MÖSSNER J, HAMMERMAN R, RACKÉ K. Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics** 2001; 14: 297–305.

MUNDER M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **Br J Pharmacol**. 2009; 158:638-51.

MUNGAZI SG, CHIHAKA OB, MUGUTI GI. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic patients at surgical outpatient department: Harare hospitals. **Ann Med Surg** 2018; 35: 153–7.

MURRAY P. J. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology**. 2017; 79:541-566.

MURRAY PJ, ALLEN JE, BISWAS SK, FISHER EA, GILROY DW, GOERDT S, GORDON S, HAMILTON JA, IVASHKIV LB, LAWRENCE T, LOCATI M, MANTOVANI A, MARTINEZ FO, MEGE JL, MOSSER DM, NATOLI G, SAEIJ JP, SCHULTZE JL, SHIREY KA, SICA A, SUTTLES J, UDALOVA I, VANGINDERACHTER JA, VOGEL SN, WYNN TA. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity** 2014; 41: 14-20.

MURRAY PJ, WYNN TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat. Rev. Immunol**. 2011; 11: 723–37.

NATHAN CF, MURRAY HW, WLEBE IE, RUBIN BY. Identification of interferon- γ , as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J Exp Med** 1983; 158: 670–89.

NECCHI V, CANDUSSO M; TAVA F.; LUINETTI O.; VENTURA U.; FIOCCA R.; RICCI V.; SOLCIA E. Intracellular, intercellular and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *H. pylori*. **Gastroenterology**. 2007;132, 1009–1023.

NECCHI V, CANDUSSO ME, TAVA F, LUINETTI O, VENTURA U, FIOCCA R, RICCI V, SOLCIA E. Intracellular, Intercellular, and Stromal Invasion of Gastric Mucosa, Preneoplastic Lesions, and Cancer by *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology** 2007; 132: 1009–1023.

NORTH RJ. Cellular mediators of anti-Listeria immunity as an enlarged population of

short-lived, replicating T cells: Kinetics of their production. **Journal of Experimental Medicine** 1973; 138: 342–355.

O'KEEFFE J, MORAN AP. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to *Helicobacter pylori*. **Helicobacter** 2008; 13: 1– 19.

OBST B.; WAGNER S.; SEWING K.F.; BEIL W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. **Carcinogenesis**. 2000;21(6):1111-1115.

ODENBREIT S, LINDER S, GEBERT-VOGL B, RIEDER G, MORAN AP, HAAS R. Interleukin-6 induction by *Helicobacter pylori* in human macrophages is dependent on phagocytosis. *Helicobacter*. 2006;11:196-207.

OMAR A. A.; HAGLUND C.; VIROLAINEN S.; HÄYRY V.; ATULA T.; KONTIO R.; SALO T.; SORSA T.; HAGSTRÖM J. MMP-7, MMP-8, and MMP-9 in oral and cutaneous squamous cell carcinomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2015; 119:459-67.

OUYANG W, KOLLS J K, ZHENG Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. **Immunity**. 2008; 28: 454-467.

PACHECO FC. Perspectiva histórica da imunologia. *In*: AROSA FA, CARDOSO EM, PACHECO FC. **Fundamentos de Imunologia**. Lisboa: LIDEL, 2012. 1-30.

PAGLIARI M, MUNARI F, TOFFOLETTO M, LONARDI S, CHEMELLO F, CODOLO G, MILLINO C, DELLA BELLA C, PACCHIONI B, VERMI W, FASSAN M, DE BERNARD M, CAGNIN S. *Helicobacter pylori* Affects the Antigen Presentation Activity of Macrophages Modulating the Expression of the Immune Receptor CD300E through miR-4270. **Front Immunol**. 2017 Oct 12;8:1288.

PARENTE JML, DA SILVA BB, PALHA DIAS MPS, ZATERKA S, NISHIMURA N, ZEITUNE JMR. *Helicobacter pylori* infection in children of low and high socioeconomic status in northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. 2006; 75:509-512.

PARK H, LI Z, YANG X O, CHANG S H, NURIEVA R, WANG Y, HOOD Y, WANG L, ZHU Z, TIAN Q, DONG C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**. 2005; 6: 1133-1141.

PEEK JR. RM, BLASER MJ, MAYS DJ, FORSYTH MH, COVER TL, SONG SY, KRISHNA U, PIENTENPOL JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. **Cancer Res** 1999; 59: 6124-6131.

PEEK JR. RM, FISKE C, WILSON KT. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. **Physiol. Rev**. 2010; 90: 831–858.

PEEK RM JR, CRABTREE JE. *Helicobacter infection* and gastric neoplasia. **J Pathol**. 2006; 208:233-48.

PEGG AE. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life**. 2009; 61: 880–894.

PEREZ-PERE GI, ROTHENBACHER D, BRENNER H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, 2004; 9:1-6.

PETERSEN CP, MEYER AR, DE SALVO C, CHOI E, SCHLEGEL C, PETERSEN A, ENGEVIK AC, PRASAD N, LEVY SE, PEEBLES RS, PIZARRO TT, GOLDENRING JR. A signalling cascade of IL-33 to IL-13 regulates metaplasia in the mouse stomach. **Gut** 2017; 67: 2018.

PETERSEN CP, WEIS VG, NAM KT, SOUSA JF, FINGLETON B, GOLDENRING JR. Macrophages promote progression of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia after acute loss of parietal cells. **Gastroenterology** 2014; 146: 1727-1738.e8.

PETERSON W, LEE E, SKOGLUND M. The role of *Campylobacter pyloridis* in epidemic gastritis with hypochlorhydra. **Gastroenterology** 1987; 92: 1575.
PLUMMER M, DE MARTEL C, VIGNAT J, FERLAY J, BRAY F, FRANCESCHI S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* 2016; 4: e609–e616.

PLUMMER M.; DE MARTEL C.; VIGNAT. J.; FERLAY J., BRAY F. E.; FRANCESCHI S. Global cancer burden attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet Glob**. 2016; 4:609 -616.

POLK D.B.; PEEK JR. R.M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nat Rev Cancer**. 2010;10:593.

PRICE AB. The Sydney System: Histological division. **J Gastroenterol Hepatol** 1991; 6: 209–622.

QADRI Q, RASOOL R, GULZAR G M, NAQASH S, SHAH Z A. *H. pylori* Infection, Inflammation and Gastric Cancer. **Journal of Gastrointestinal Cancer**. 2014; 45: 126-132.

QUEIROZ DM, CARNEIRO JG, BRAGA-NETO MB, FIALHO ABC, FIALHO AM, GONCALVES MHB, ROCHA GA, ROCHA AMC, BRAGA LLB. Natural History of *Helicobacter pylori* Infection in Childhood: Eight-Year Follow-Up Cohort Study in an Urban Community in Northeast of Brazil. **Helicobacter** 2012; 17: 23–29.

QUIDING-JÄRBRINK M, RAGHAVAN S, SUNDQUIST M. Enhanced M1 Macrophage Polarization in Human *Helicobacter pylori*-Associated Atrophic Gastritis and in Vaccinated Mice. **PLoS ONE** 2010; 5: e15018.

RABELO-GONÇALVES EMA, HARA NH, SERVIDONI MFCP, NISHIMURA NF, ZATERKA S, PARENTE JML, ZEITUNE JMR. Prevalência da infecção pelo *H. pylori* na infância: comparação da pesquisa do antígeno fecal (HpSA) em crianças de diferentes níveis sócio-econômicos. *In: SEMANA BRASILEIRA DO APARELHO*

DIGESTIVO, 8., 2008, Brasília. **Anais** [...]. Brasília, 2008.

REDÉEN S, PETERSSON F, TÖRNKRANTZ E, LEVANDER H, MÅRDH E, BORCH K. Reliability of diagnostic tests for *helicobacter pylori* infection. **Gastroenterol Res Pract** 2011; 32: 320-322.

REN C, ZHANG X, SHI H, CHEN D, DUAN Z, ZHANG H, REN F. [Autophagy modulates the levels of inflammatory cytokines in macrophages induced by lipopolysaccharide]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**. 2017;33:581-585
ROBBINS RA, GRISHAM MB. Nitric oxide. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 1997; 29: 857–860.

ROBINSON K, ARGENT RH, ATHERTON JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 2007; 21:237-59.

RODRIGUES MN, QUEIROZ DMM, BRAGA ABC, ROCHA AMC, EULAILO EC, BRAGA LLBC. History of breastfeeding and *Helicobacter pylori* infection in children: Results of a community-based study from northeastern Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 2006; 100: 470–475.

ROSZER T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of Inflammation** 2015; 2015: 816460.

ROY AD, DEURI S, DUTTA UC. The diagnostic accuracy of rapid urease biopsy test compared to histopathology in implementing “test and treat” policy for *Helicobacter pylori*. **International Journal of Applied and Basic Medical Research** 2016; 6: 18.

SHAH DK, JAIN SS, MOHITE A, AMARAPURKAR AD, CONTRACTOR QQ, RATHI PM. Effect of *H. pylori* density by histopathology on its complications and eradication therapy. **Trop Gastroenterol**. 2015;36:101-6

SHI, C. E PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat. Rev. Immunol** 2011; 11:762-774.

SICA A, ERRENI M, ALLAVENA P, PORTA C. Macrophage polarization in pathology. **Cell. Mol. Life Sci**. 2015; 72: 4111–4126.

SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: *In vivo* veritas. **Journal of Clinical Investigation** 2012; 122: 787–795.

SINGH V, MISHRA S, RAO GRK, JAIN AK, DIXIT VK, GULATI AK, MAHAJAN D, MCCLELLAND M, NATH G. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60. **Helicobacter** 2018; 13: 30–34.

SIPPONEN P, PRICE AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 2011; 26: 31–34.

SOMMER F.; FALLER G.; KONTUREK P.; KIRCHNER T.; HAHN E.G.; ZEUS J.; RÖLLINGHOFF M.; LOHOFF M. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. **Infect Immun.**1998; 66(11):5543-6.

SONG H, EKHEDEN IG, ZHENG Z, ERICSSON J, NYRÉN O, YE W. Incidence of gastric cancer among patients with gastric precancerous lesions: Observational cohort study in a low risk Western population. **BMJ** 2015: 351.

SONNENBERG A, LASH RH, GENTA RM. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens. **Gastroenterology**. 2010; 139:1894-1901.

SPÓSITO L. **Caracterização biológica e prospecção terapêutica de *Casearia sylvestris* Swartz não incorporada e incorporada em sistema nanoestruturado na atividade anti-*Helicobacter pylori*.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP, 2017.

STEFATER JA, REN S, LANG RA, DUFFIELD JS. Metchnikoff's policemen: Macrophages in development, homeostasis and regeneration. **Trends Mol. Med.** 2011; 17: 743–752.

STEIN M, KESHAV S, HARRIS N, GORDON S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med** 1992; 176: 287–292.

STEIN M, RAPPUOLI R, COVACCI A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2000; 97:1263-8.

STOLTE M, MEINING A. The updated Sydney system: Classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. **Can J Gastroenterol** 2001; 15: 591-598.

STRAUSS-AYALI D, CONRAD SM, MOSSER DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. **Journal of Leukocyte Biology** 2007; 82: 244–252.

SUAREZ G, ROMERO-GALLO J, PIAZUELO MB, SIERRA JC, DELGADO AG, KAY WASHINGTON M, SHAH SC, WILSON KT, PEEK RM. Nod1 Imprints Inflammatory and Carcinogenic Responses toward the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. **Cancer Res** 2019; 79: 1600–1611.

SUERBAUM S. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. **Trends in Microbiology** 1995; 3: 168-170.

SUZUKI H, HISAMATSU T, CHIBA S, MORAN K, KITAZUME MT, SHIMAMURA K, NAKAMOTO N, MATSUOKA K, EBINUMA H, NAGANUMA M. Glycolytic pathway

affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. **Immunology Letters**. 2016; 176:18–27.

SUZUKI M, MIMURO H, KIGA K, FUKUMATSU M, ISHIJIMA N, MORIKAWA H, NAGAI S, KOYASU S, GILMAN RH, KERSULYTE D, BERG DE, SASAKAWA C. *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. **Cell Host Microbe**. 2009; 22:23-34.

SUZUKI T, KATO K, OHARA S, NOGUCHI K, SEKINE H, NAGURA H, SHIMOSEGAWA T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Pathol Int**. 2002;52:265-71.

SYCURO LK, PINCUS Z, GUTIERREZ KD, BIBOY J, STERN CA, VOLLMER W, SALAMA NR. Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. **Cell**. 2010; 141:822-33.

SZETO HH. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. **AAPS J**. 2006; 8: E277-E283.

TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology** 2005; 17: 1–14, 2005.

TANAKA J, SUZUKI T, MIMURO H, SASAKAWA C. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol** 2003; 5: 395–404.

TANAKA J, SUZUKI T, MIMURO H, SASAKAWA C. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol** 2003; 5: 395–404.

TARIQUE AA, LOGAN J, THOMAS E, HOLT PG, SLY PD, FANTINO E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2015; 53: 676–688.

TAYLOR PR, MARTINEZ-POMARES L, STACEY M, LIN HH, BROWN GD, GORDON S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol**. 2005; 23: 901–944.

TEREBIZNIK MR, VAZQUEZ CL, TORBICKI K, BANKS D, WANG T, HONG W, BLANKE SR, COLOMBO MI, JONES NL. *Helicobacter pylori* VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. **Infect Immun** 2006; 74: 6599–6614.

MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A., LOCATI, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**. 2004; 25: 667-686.

TRAVÉS PG, LUQUE A, HORTELANO S. Macrophages, Inflammation, and Tumor Suppressors: ARF, a New Player in the Game. **Mediated of Inflammation**. 2012, artículo ID 568783, 11 páginas.

TSUBAKIO-YAMAMOTO K.; MATSUURA F.; KOSEKI M.; OKU H.; SANDOVAL J.C.; INAGAKI M.; NAKATANI K.; NAKAOKA H.; KAWASE R.; YUASA-KAWASE M.; MASUDA D.; OHAMA T.; MAEDA N.; NAKAGAWA-TOYAMA Y.; ISHIGAMI M.; NISHIDA M.; KIHARA S.; SHIMOMURA I.; YAMASHITA S. Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;24;375(3):390-4.

TUMMALA S.; KEATES S. KELLY C.P. Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. **Current Opinion in Gastroenterology**. 2004;20(6):592-597.

TYTGAT GNJ. The Sydney System: Endoscopic division. Endoscopic appearances in gastritis/duodenitis. **J Gastroenterol Hepatol** 1991; 6: 223–34.
VAN FURTH R, COHN ZA, HIRSCH JG, HUMPHREY JH, SPECTOR WG, LANGEVOORT HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull World Health Organ** 1972; 46: 845–852.

VERRECK FAW, DE BOER T, LANGENBERG DML, VAN DER ZANDEN L, OTTENHOFF THM. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. **J Leukoc Biol** 2006; 79: 285–293..

VINAGRE RMDF, VINAGRE IDF, VILAR-E-SILVA A, FECURY AA, MARTINS LC. *Helicobacter pylori* infection and immune profile of patients with different gastroduodenal diseases. **Arq Gastroenterol** 2018; 55: 122–127.

VOGEL DYS, GLIM JE, STAVENUITER AWD, BREUR M, HEIJNEN P, AMOR S, DIJKSTRA CD, BEELEN RHJ: Human macrophage polarization *in vitro*: Maturation and activation methods compared. **Immunobiology** 2014; 219: 695–703.

VOLAND DSP.; WEEKS DL.; MARCUS EA.; PRINZ C; SACHS G. Encoded by the urease gene cluster Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 2003; 284:96-106.

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; 284:G96–106.

WAGENER FA, VOLK HD, WILLIS D, ABRAHAM NG, SOARES MP, ADEMA GJ, FIGDOR CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. **Pharmacol Rev**. 2003;55:551-71.

WANG J, ZHANG Q, LIU Y, HAN J, MA X, LUO Y, LIANG Y, ZHANG L, HU Y.

Association between HLA-IIgene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in Asian and European population: **A meta-analysis. Microb Pathog** 2015; 82: 15–26.

WANG YK, KUO FC, LIU CJ, WU MC, SHIH HY, WANG SSW, WU JY, KUO CH, HUANG YK, WU DC. Diagnosis of *helicobacter pylori* infection: Current options and developments. **World J Gastroenterol** 2015; 21: 11221–11235.

WARREN J, MARSHALL BJ. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet.** 1984;16.8390: 1311-5.

WATANABE T., ASANO N., FICHTNER-FEIGL S., GORELICK P. L., TSUJI Y., MATSUMOTO Y., CHIBA T., FUSS I. J., KITANI A., STROBER W. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. **J Clin Invest.** 2010; 120: 1645–1662.
WEISSER. S. B.; MCLARREN K. W.; KURODA E.; SLY L. M. Generation and Characterization of Murine Alternatively Activated Macrophages. **Basic Cell Culture Protocols.** 2013; 946:225-239.

WEISSER. S. B.; MCLARREN K. W.; KURODA E.; SLY L. M. Generation and Characterization of Murine Alternatively Activated Macrophages. **Basic Cell Culture Protocols.**946:225-239, 2013.

WEN S, MOSS SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **The Cancer letter** 2009; 282: 1-8.

WILLIAMS SM., CHEN YU-TING, ANDERMANN T M., CARTER J. E, MCGEE D J., OTTEMAN K M. N. *Helicobacter pylori* Chemotaxis Modulates Inflammation and Bacterium-Gastric Epithelium Interactions in Infected Mice. **Infect Immun.** 2007;75:3747-57.

WILSON K. T.; CRABTREE J. E. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. **Gastroenterology.** 2007;133: 288-308.

WROBLEWSKI LE, PEEK JR., RM, WILSON KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. **Clin Microbiol Rev.** 2010; 23: 713-739.

WU G, MORRIS SM. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal** 1998; 336: 1–17.

WYNN TA, CHAWLA A, POLLARD JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature** 2013; 496: 445–455.

XU W.; ZHAO X.; DAHA M.R.; VAN KOOTEN C. Reversible differentiation of pro and anti-inflammatory macrophages. **Mol. Immunol.** 2013; 53:179–186.

XU X.; GRIJALVA A.; SKOWRONSKI A.; VAN EIJK M.; SERLIE M.J; FERRANTE A.W. JR. Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. **Cell Metab.** 2013 18(6):816-30.

YAMAMOTO TK, MATSUURA F, KOSEKI M, OKU H, SANDOVAL JC, INAGAKI M, NAKATANI K, NAKAOKA H, KAWASE R, YUASA-KAWASE M, MASUDA D, OHAMA T, MAEDA N, NAKAGAWA-TOYAMA Y, ISHIGAMI M, NISHIDA M, KIHARA S, SHIMOMURA I, YAMASHITA S. Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** 2008; 24: 375-390.

YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA T, SAWAI N, IMANISHI J. *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. **Gastroenterology** 1996; 110: 1744–52.

YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA T, SAWAI N, KASHIMA K, IMANISHI J. Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with helicobacter pylori infection. **Scand J Gastroenterol** 1995; 30: 1153–9.

YAMAOKA Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. **J Infect Dev Ctries.** 2008; 2:174-81.

YANG J, ZHANG L, YU C, YANG XF, WANG H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark. Res.** 2014; 2: 1-14.

YANG J, ZHANG L, YU C, YANG XF, WANG H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark. Res.** 2014; 2: 1-14.

YOKOTA S ICHI, KONNO M, FUJIWARA S ICHI, TOITA N, TAKAHASHI M, YAMAMOTO S, OGASAWARA N, SHIRAISHI T. Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intrasporousal, *Helicobacter pylori* Infection in Japan Determined by Multilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. **Helicobacter** 2015; 20: 334–342.

ZAMANI M, EBRAHIMTABAR F, ZAMANI V, MILLER WH, ALIZADEH-NAVAEI R, SHOKRI-SHIRVANI J, DERA KHSHAN MH. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** 2018; 47: 868-876.

ZATERKA S, EISIG JN, CHINZON D, ROTHSTEIN W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter** 2007; 12: 82–8.

ZELLFORSCH Z, JESSEN H, E MOE H. The Fine Structure of Macrophages in the Enamel Organ, with Special Reference to the Microtubular System. 2012, 126:188-466.

APÊNDICE

APÊNDICE A – PRODUÇÃO DURANTE O CURSO



Increased Glycated Hemoglobin Levels in Patients With *Helicobacter pylori* Infection Are Associated With the Grading of Chronic Gastritis

Selma Maluf^{1,2,3}, João Victor Salgado⁴, Dalila Nunes Cysne³, Daniel Monte Freire Camelo³, Johnny Ramos Nascimento^{1,3}, Bianca Vitória T. Maluf³, Luís Douglas Miranda Silva¹, Marta Regina de Castro Belfort¹, Lucilene Amorim Silva^{3,5}, Rosane Nassar Meireles Guerra^{3,5}, Natalino Salgado Filho⁶ and Flávia Raquel F. Nascimento^{3,5*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Marina De Bernard,
University of Padua, Italy

Reviewed by:
Holly Algood,
Vanderbilt University, United States
Mario M. D'Elia,
University of Florence, Italy

***Correspondence:**
Flávia Raquel F. Nascimento
nascimento.frf@yahoo.com.br

Specialty section:
This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 14 April 2020

Accepted: 05 August 2020

Published: 10 September 2020

Citation:
Maluf S, Salgado JV, Cysne DN,
Camelo DMF, Nascimento JR,
Maluf BVT, Silva LDM, Belfort MRC,
Silva LA, Guerra RNM,
Salgado Filho N and Nascimento FRF
(2020) Increased Glycated
Hemoglobin Levels in Patients With
Helicobacter pylori Infection Are
Associated With the Grading
of Chronic Gastritis.
Front. Immunol. 11:2121.
doi: 10.3389/fimmu.2020.02121

¹ Health Science Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ² Gastroenterology Service of the University Hospital, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ³ Immunophysiology Laboratory, Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ⁴ Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ⁵ Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ⁶ Department of Medicine I, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

Background: Recent studies have found an association between *Helicobacter pylori* infection and prediabetes. Whether *H. pylori* *per se* or host factors are involved in the disturbance of glycated hemoglobin needs further investigation. The aim of this study was to determine the association of glycated hemoglobin levels with endoscopic diagnosis and the inflammatory response in *H. pylori* infection.

Methods: A cross-sectional study was carried out in 88 dyspeptic non-diabetic adults who underwent esophagogastroduodenoscopy. The diagnosis of *H. pylori* infection was performed through urease test and histopathological exam. Cases were initially distributed into two groups: control (without *H. pylori* infection, $n = 22$) and HP (patients with *H. pylori* infection, $n = 66$). HbA1c was measured to determine prediabetes status according to the American Diabetes Association criteria, and then the groups were subdivided into non-prediabetic ($n = 14$), prediabetic ($n = 8$), non-prediabetic HP ($n = 26$) and prediabetic HP ($n = 40$) groups. Gastric mucosa was histologically evaluated to determine *H. pylori* density and inflammatory activity according to Sydney System. To investigate the balance of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines we measured interleukin 10 (anti-inflammatory) and Tumor Necrosis Factor- α (pro-inflammatory) in the plasma or in the gastric mucosa.

Results: Patients with *H. pylori* infection had higher mean HbA1c levels than those without *H. pylori* infection. However, increased HbA1c levels were not associated with *H. pylori*-related factors but with the bacterial density, the intensity of inflammation and the activity of the chronic gastritis. In addition, *H. pylori* infection *per se* did not alter

IL-10 and TNF- α neither in the plasma nor in the gastric mucosa, but the bacterial density was negatively correlated with systemic and local IL-10 expression. Although no correlation was found between systemic cytokines and HbA1c levels, local anti-inflammatory cytokine was correlated with HbA1c levels.

Conclusion: Long-term *H. pylori* infection is associated with prediabetes. This association is not related to the presence of *H. pylori per se* but depends on the extent of bacterial colonization and the degree of both local inflammation and activity of the chronic gastritis.

Keywords: *Helicobacter pylori*, glycated hemoglobin, prediabetes, chronic gastritis, cytokines, inflammation

INTRODUCTION

Helicobacter pylori infects nearly half of the global population, with a higher prevalence in developing countries (1). The infection is acquired mainly during childhood and may persist in the gastric environment throughout the life of the host, despite the immune and humoral response (2). In Brazil, the prevalence of *H. pylori* infection in adults is between 65 and 82% (3). *H. pylori* infection, a major cause of chronic gastritis, is associated with duodenal and gastric ulcers, lymphoma, and cancer. Furthermore, *H. pylori* has also been linked to extragastric diseases such as type 2 diabetes mellitus (T2DM) (4, 5).

The role of *H. pylori* infection in glucose metabolism and T2DM development has not been fully established. Although it has been reported that patients with chronic *H. pylori* infection have an increased risk of developing T2DM (6), some studies have not found a correlation between this infection and glycemic levels in diabetic patients (7).

The impact of *H. pylori* infection on other organs could be mediated by increased levels of inflammatory markers such as IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α), all of which are also involved in the development of insulin resistance and T2DM (5). These cytokines could induce the phosphorylation of serine residues in the insulin receptor substrate, preventing their interaction with insulin receptors, leading to systemic disruption of insulin sensitivity and impaired glucose homeostasis (8, 9).

Few studies have investigated the association between prediabetes and *H. pylori* infection. Yang et al. (10) found that gastric *H. pylori* infection is associated with the risk of diabetes mellitus but not prediabetes. Recent studies have shown a positive association between *H. pylori* infection and prediabetes (11, 12).

The diagnosis of prediabetes is very critical to the preclinical diagnosis of T2DM and further prevention of vascular complications. Glycated hemoglobin (HbA1c), which is used to diagnose prediabetes, is an indicator of long-term glycemic control. Increased HbA1c levels are correlated with an increased risk of T2DM (13). Whether *H. pylori*-related factors or host factors are associated with the disturbance of glycated hemoglobin levels needs investigation.

Therefore, the aim of this study was to determine the association of glycated hemoglobin levels (HbA1c) with endoscopic diagnosis and local and systemic anti- and pro-inflammatory cytokines release in *H. pylori* infection.

MATERIALS AND METHODS

Sample Population

A cross-sectional study was carried out in 88 patients with dyspepsia who underwent esophagogastroduodenoscopy at the Endoscopy Unit of the University Hospital, Federal University of Maranhão (UFMA), during a period of 4 months. The patients eligible for the study were selected through systematic random sampling according to the demands of the Endoscopy Service. Patients of both genders who were ≥ 18 years of age and who did not have a history of diabetes were included. The following patients were not included in the study: pregnant women, patients with chronic consumptive disease (cancer and AIDS), gastric surgery patients, chronic renal failure patients on hemodialysis, patients with recent blood transfusion, patients previously treated for *H. pylori* eradication, and patients who had been medicated with H2 receptor antagonists or proton pump inhibitors within 2 weeks or antibiotics within 4 weeks prior to testing.

The patients included completed a sociodemographic survey to collect information on educational level, lifestyle, medical history, and medication use and for dyspepsia evaluation. The body mass index (BMI) was also calculated, and the patients were classified as eutrophic (BMI values < 25 kg/m²) and overweight/obese (BMI values ≥ 25 kg/m²). Any participant who self-declared as a regular smoker, regardless of the quantity of cigarettes smoked, was considered a smoker. The National Committee for Research Ethics (CONEP) approved this study according to CAAEE 07989412.0.0000.5086. Those patients who accepted the invitation to participate in the study signed an informed consent form.

Diagnosis of *H. pylori* Infection

Helicobacter pylori infection was determined using the rapid urease test (RUT) and a histopathological exam. Gastric mucosa samples were collected during endoscopic biopsies. For the RUT, two specimens of gastric mucosa (antrum and body) were collected using autoclavable biopsy forceps and placed in a sterile tube containing urea and a pH indicator (phenol red) (Uretest Promedical, Brazil). The sample was kept at room temperature and after 2 h was read. A color change from dark yellow to red indicated positivity for *H. pylori* infection. For the histopathological exam, four tissue fragments (two

fragments each from the body and antrum) were collected using sterile biopsy forceps. The samples were placed in a single vial containing 10% formaldehyde, which was properly labeled and submitted to the Department of Pathology of the HUUFMA. Giemsa staining techniques were used to facilitate bacterial visualization. Identification of *H. pylori* in any test was considered a positive result in accordance with the IVth Brazilian Consensus Conference on *H. pylori* infection (14).

Endoscopic Diagnosis

A member of the research team performed all endoscopies. An Olympus Exera II system (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) was used for digestive endoscopy. Before the esophagogastroduodenoscopy exams, dimethicone drops and lidocaine spray (10% Xylestesin; Cristália, Brazil) were applied to the oropharynx. Sedation was performed using intravenous midazolam (Dormonid Roche, Brazil). During endoscopy, the esophagus, stomach, and duodenum were evaluated, and the endoscopic findings were reported. Diagnoses of chronic gastritis and duodenitis were made based on the Sydney System (15). A peptic ulcer lesion was described as an area of mucosal continuity with a perceived depth of more than 0.5 cm.

Morphological Analysis of the Gastric Mucosa

The gastric mucosa obtained from the endoscopic biopsy were routinely prepared with paraffin, and sections were cut (5- μ m thick) perpendicular to the surface and were stained with hematoxylin and eosin. Two experienced pathologists without knowledge of other data performed the microscopic examinations. Histological analysis evaluated morphological variables according to Updated Sydney System (16): inflammation, activity and density of *H. pylori*. A three-grade system of mild, moderate and severe was applied to morphological variables according the standard grading scale of the System and each successive grade represents an increment in severity of approximately one-third. Inflammation refers to the presence of mononuclear inflammatory infiltrate in lamina propria and categorizes the gastritis as chronic. We adopt HP 0/1 for mild degree of inflammation; HP 2/3 for moderate and severe degree of inflammation. Activity in the context of chronic gastritis refers to the presence of polymorphonuclear leukocytes alongside the mononuclear inflammatory infiltrate. Activity can be particularly related to the presence of *H. pylori* (17). The neutrophil activity was graded as mild when less than one-third of the epithelial grooves and the surface were infiltrated by neutrophils; it was considered to be of moderate intensity when neutrophil infiltration occurred in one to two-thirds of the surface and severe when more than two-thirds of the surface of the epithelium showed neutrophil infiltration. We use HP 0/1 to grade neutrophil activity as mild; HP 2/3, for moderate and severe degree of activity. The density of *Helicobacter-like* organisms present is grading in mild colonization when individual organisms, or small groups, covering less than one-third of the mucosal surface ($1^+/3^+$). Severe colonization is the presence of large groups of organisms on the surface and upper

pits of more than two-thirds of the mucosal surface examined ($3^+/3^+$). Moderate colonization is between these two ($2^+/3^+$). We classify in HP dens1, the mild colonization; HP dens2, the moderate colonization and HP dens3, severe colonization.

Evaluation of Cytokines in Plasma by CBA

For the evaluation of cytokines, one sample of blood (5 mL) was collected from each patient and sent to the Immunophysiology Laboratory, UFMA. The concentrations of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , and TNF- α were determined using a cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, United States). For this study only the data of IL-10 and TNF- α were used. The plasma samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, United States) previously calibrated with "setup beads" incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) according to the manufacturer's recommendation. A standard curve was generated for each cytokine. The results were analyzed in FCAP Array Software (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, United States), and the values were expressed as pg/mL for each cytokine. The limit of detection for each cytokine is defined as the corresponding concentration at two standard deviations above the median fluorescence of 30 replicates of negative control (0 pg/mL).

Evaluation of Cytokines in Gastric Mucosa by Immunohistochemistry

Tissue microarray blocks (TMAs) were assembled and the 3 μ m thick histological sections were placed on silanized slides (StarFrost® Advanced Adhesive, Knittel, Germany) and taken to an oven at 65°C for 1 h. The gastric tissue was deparaffinized with xylol and dehydrated in alcohol. Endogenous peroxidase enzyme blockade was performed with H₂O₂ (hydrogen peroxide) solution (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) at 3%. Antigenic recovery was performed by heating the tissue for 40 min at a temperature between 97 and 100°C. Then, the antibody diluted in PBS-Tween 20/BSA 1% was applied over gastric tissue and incubated for 40 min. Rabbit polyclonal anti-IL-10 antibody (Biorbyt, Cambridge, United Kingdom) and anti-TNF- α antibody (Scytek, Utah, United States) were used. The slides were washed with PBS-Tween 20 pH 7.4 solution and incubated with the chromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma, St Louis, MO, United States, D5637-1G) diluted in DAB Substrate, for 5 min, at room temperature. Counterstaining was done with Hematoxylin. The cuts were dehydrated in alcohol and xylol solutions and subsequently assembled. The positive control for TNF- α was performed with lymph node sections. The positive control for IL-10 was performed with kidney sections. The expression of IL-10 and TNF- α was evaluated in epithelial cells and the lamina propria of the gastric mucosa by using an ECLIPSE E800 electronic microscope (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Netherlands) with a 20 $\times$ objective on the EGFP filter (Emission Green Fluorescent Protein). The counting of the marked cells in five fields of the histological section was

performed. The fields were determined as “upper left field,” “upper right field,” “lower left field,” “lower right field,” and “center.” After counting, the sum of the five fields was made to obtain an estimate of the cells marked for IL-10 or TNF- α , per patient slide.

Statistical Analysis

The absolute and relative frequencies are used to describe the qualitative variables. The mean and standard deviation or median and interquartile range are used to describe quantitative variables according to the Shapiro–Wilk normality test.

To evaluate the association between the quantitative variables and the presence of *H. pylori* infection, the Mann–Whitney test or Student's *t*-test for independent samples was used. The Kruskal–Wallis test followed by Dunnett's test or ANOVA followed by Bonferroni's test were used to verify the differences in the quantitative variables between the study groups.

Qualitative variables were assessed by Fisher's exact and Chi-square tests for the presence of *H. pylori* and for the analysis of differences between the study groups. For the correlation analyses, the Spearman test was used. Differences were considered significant when the *p*-value ≤ 0.05 . The data were tabulated and analyzed using the data and statistical analysis software STATA® version 14.0 and GraphPad Prism 6.0 software.

RESULTS

Evaluation of Sociodemographic Parameters

There were no significant differences regarding age, sex, BMI, gastric symptoms, smoking habits, or alcohol consumption. The majority of the study population consisted of women with an average age of approximately 40 years with BMI less than 25 (Table 1).

Prevalence of *H. pylori* Infection, Symptoms, and Endoscopic Findings

Approximately 75% of patients were infected with *H. pylori*. Most of them were women aged 18–54 years. Half of the patients complained of epigastric pain. Enanthematous pangastritis was the most frequent endoscopic finding in patients infected with *H. pylori* (Table 1).

Helicobacter pylori Infection Was Associated to Increased HbA1c Levels

Patients with *H. pylori* infection had higher mean HbA1c levels than patients without *H. pylori* infection (Figure 1).

There Was an Association Between Increased *H. pylori* Density and the Increase in HbA1c Levels

The mean HbA1c levels were higher in the *H. pylori*-infected group with a higher bacterial density 3⁺/3⁺ (HPdens3) than in the control group. There was no significant difference

between controls and low-density infected patients (HPdens1) as well as between controls and infected patients with moderate bacterial density (HPdens2). There were also no significant differences between the infected groups HPdens1 and HPdens2, HPdens2 and HPdens3, and HPdens1 and HPdens3 (Figure 2A). However, bacterial density was positively correlated with HbA1c levels (Figure 2B).

Endoscopic Diagnosis Was Not Associated With High Levels of HbA1c, but Rather the *H. pylori* Related-Factors

Among patients with endoscopic diagnoses of pangastritis and among patients with peptic ulcers, HbA1c levels were higher in patients with *H. pylori* infection than in those without infection (Figures 3A,B). When we compared patients presenting peptic ulcer, but without *H. pylori* infection with patients presenting gastritis, but with *H. pylori* infection we observed that HbA1c levels were higher in patients with *H. pylori* infection and gastritis diagnosis (Supplementary Figure S1). These data suggest that the endoscopic diagnosis does not appear to be associated with HbA1c levels, but rather the *H. pylori* related-factors.

There Was an Association Between Increased HbA1c Levels With Severe Degree of Inflammation and Activity of Chronic Gastritis

There was an increase in HbA1c levels in patients infected with *H. pylori* with moderate and severe chronic inflammation of the gastric mucosa compared to those in the control group (no infection with normal mucosa or mild inflammation). However, there was no change in the HbA1c levels between the control group and the HP group with mild inflammation (Figure 4A).

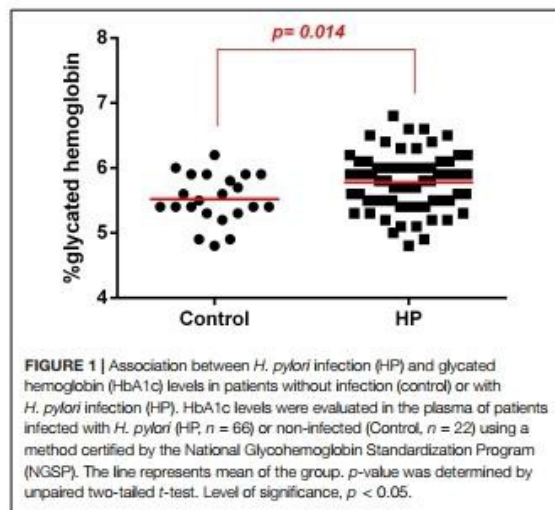
Similarly, HbA1c levels were increased in *H. pylori*-infected patients with moderate to high gastric mucosa activity compared to those in the control group. There was no change in HbA1c levels between the control group and the HP group with mild activity (Figure 4B). Furthermore, chronic inflammation and neutrophil activity were positively correlated with the HbA1c levels (Figures 4C,D). These data suggest that the intensity of the neutrophil activity and the inflammation of the chronic gastritis may be predisposing factors for prediabetes.

The Presence of *H. pylori* Infection Did Not Alter Systemic Levels of IL-10, TNF- α or Alter the Expression of the Cytokines TNF- α and IL-10 in Gastric Mucosa

Considering that the inflammation of the chronic gastritis may be predisposing factors for prediabetes, we evaluated two antagonistic cytokines, IL-10 (anti-inflammatory) and TNF- α (pro-inflammatory) in the plasma and in the gastric mucosal and tested if they could be associated with the presence of the bacterium by itself. However, there was no difference in IL-10 or TNF- α levels in the plasma of *H. pylori*-infected patients compared to those in non-infected patients (Figures 5A,B). Similarly, there was no difference in the IL-10 or TNF- α

TABLE 1 | General characteristics of patients according to the presence of infection.

Characteristics	<i>H. pylori</i>				<i>p</i> -Valor
	Negative		Positive		
	n	%	N	%	
Age (years)					
Mean ± SD	39.5 ± 12.8	41.2 ± 11.9	0.9		
Sex					
Male	5	22.7	24	36.3	0.3
Female	17	77.2	42	63.6	
HbA1c (%)					
Mean ± SD	5.5 ± 0.3	5.7 ± 0.4	0.0		
BMI (kg/m ²)					
Median (interquartile range)	23.5 (25.9–22.3)	24.4 (27.6–22.8)	0.2		
HbA1c (%)					
<5.7	16	68.1	30	45.4	0.0
≥ 5.7	7	31.8	36	54.5	
BMI (kg/m ²)					
<25	14	63.6	37	56.0	0.5
≥25	8	36.3	29	43.9	
Symptoms					
Epigastric pain	12	54.5	31	46.9	0.4
Fullness	1	4.5	11	16.6	
Epigastric pain + fullness + satiety	9	40.9	24	36.3	
Endoscopy					
Normal	5	22.7	13	19.7	0.0
Pangastritis	7	31.8	38	57.5	
Peptic ulcer	10	45.4	15	22.7	
Smoking habits					
Yes	2	9.0	4	6.1	0.6
No	20	90.9	61	93.8	
Alcoholism					
Yes	4	19.0	55	85.9	0.7
No	17	80.9	9	14.0	

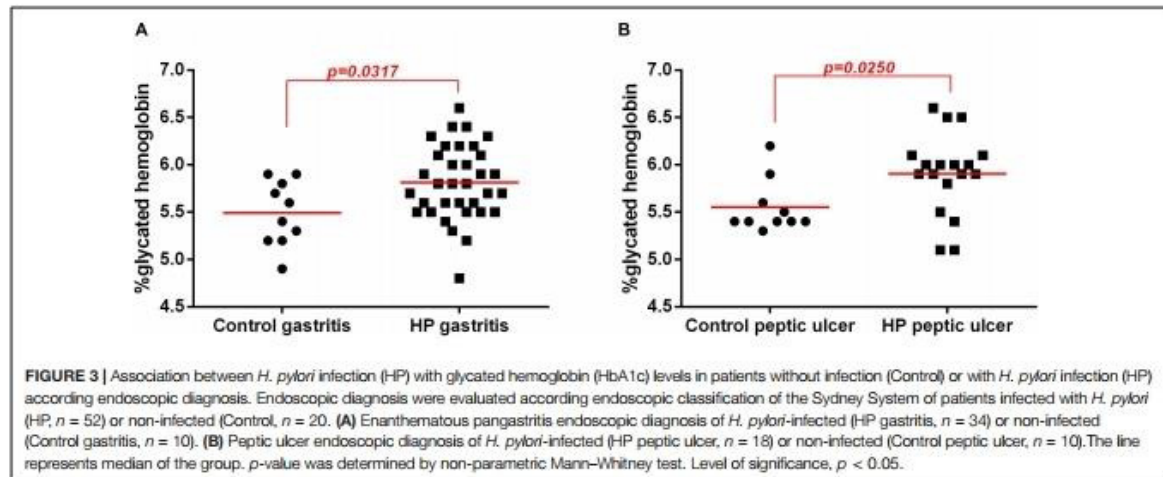
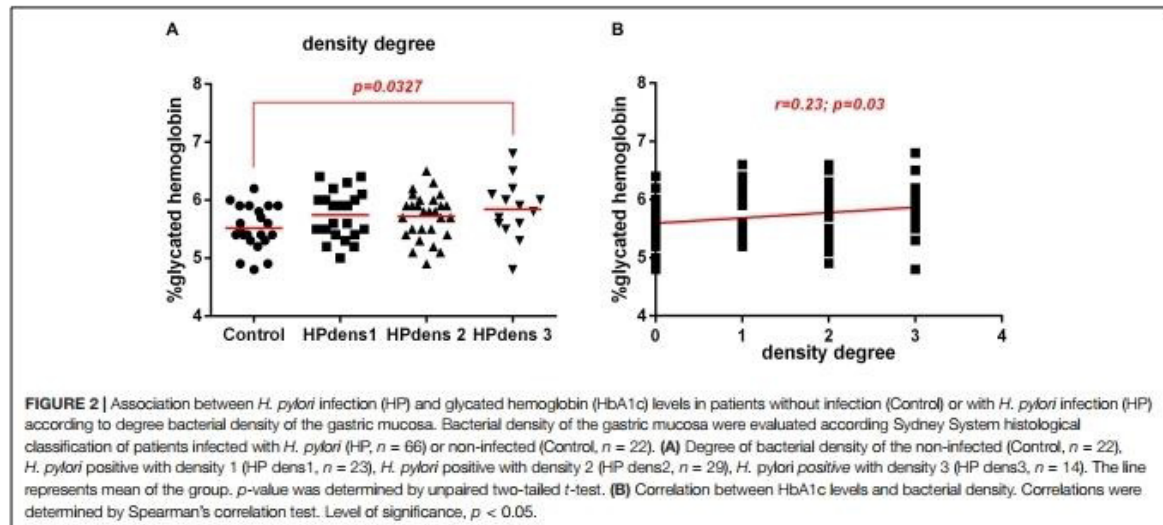


expression in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected patients compared to those non-infected patients (Figures 5C,D).

Bacterial Density and the Activity of the Chronic Gastritis Were Associated With IL-10 Levels in Plasma

Since we observed that the bacterial density as well as the intensity of gastric mucosa activity and the chronic inflammatory process could be predisposing factors for prediabetes in *H. pylori*-infected patients, we investigated whether the cytokines were associated with inflammation of the gastric mucosa and the bacterial load. Our results showed a decrease in the expression of IL-10 in plasma and in the gastric mucosa in *H. pylori*-infected patients with increased bacterial density and a higher degree of neutrophil activity.

In the plasma, IL-10 levels decreased in the group HPdens3 when compared with control, but there was no significant difference between HPdens1 and the control or HPdens2 and the control. Additionally, no difference was found in plasmatic



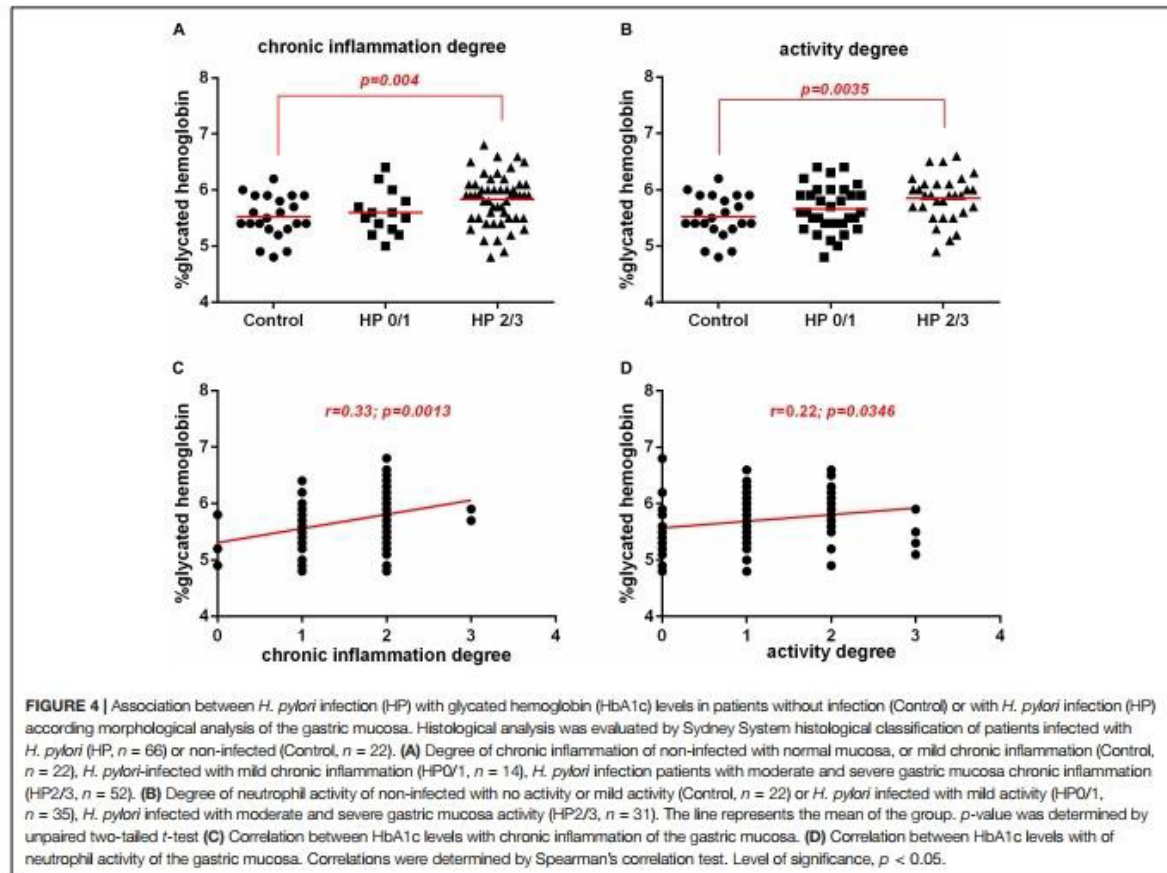
IL-10 levels when comparing the infected groups HPdens1 with HPdens2, HPdens2 with HPdens3 and HPdens3 with HPdens1 (Figure 6A). Furthermore, IL-10 levels in plasma was correlated negatively with the bacterial density (Supplementary Figure S2).

There was no significant association between plasmatic IL-10 levels and the degree of chronic inflammation (Figure 6C). However when the plasmatic expression of the cytokine IL-10 and the activity of the chronic gastritis were analyzed, a significant decrease in IL-10 was observed in the infected groups with moderate and intense gastric mucosa activity (HP2/3) compared with that in the non-infected group with mild activity (Control). However, there was no significant difference between the HP1-infected group and the control group. In addition, there was no significant difference in plasmatic IL-10 levels between the HP1 and HP 2/3 groups (Figure 6E). There was no significant association between the TNF- α levels in plasma with the results

of the morphological analysis (Figures 6B,D,F) or the bacterial density (Supplementary Figure S2).

Bacterial Density and the Activity and Chronic Inflammation of the Gastric Mucosa Were Associated With IL-10 Levels in Gastric Mucosa by Immunohistochemistry

IL-10 expression was lower in HPdens2/3 than in the control, but there was no significant difference between HPdens1 with control; in addition, there was no difference between HPdens1 with HPdens2/3 (Figure 7A). According to the degree of chronic inflammation, there was decreased IL-10 expression in *H. pylori*-infected with moderate/intense chronic inflammation (HP 2/3) compared with that in the control. However, there



was no significant difference between *H. pylori*-infected with low chronic inflammation (HP 0/1) and the control. In addition, there was no significant difference between infected groups HP 0/1 and HP2/3 (Figure 7C). According to activity of the chronic gastritis, there was decreased IL-10 expression in *H. pylori*-infected with moderate/intense activity (HP2/3) compared with that in the control (non-infected, with no activity or low activity). However, there was no significant difference between *H. pylori*-infected with low activity (HP 0/1) and the control. In addition, there was no significant difference between infected groups HP 0/1 and HP2/3 (Figure 7E). There was no significant difference in TNF- α level in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected patients according to morphological analysis (Figures 7B,D,F).

The Expression of IL-10 and TNF- α in the Gastric Mucosa Were Positively Correlated With HbA1c Levels

There was no correlation between the plasma levels of IL-10, TNF- α with the HbA1c levels (Figures 8A,B). However, the expression of IL-10 and TNF- α in the gastric mucosa was

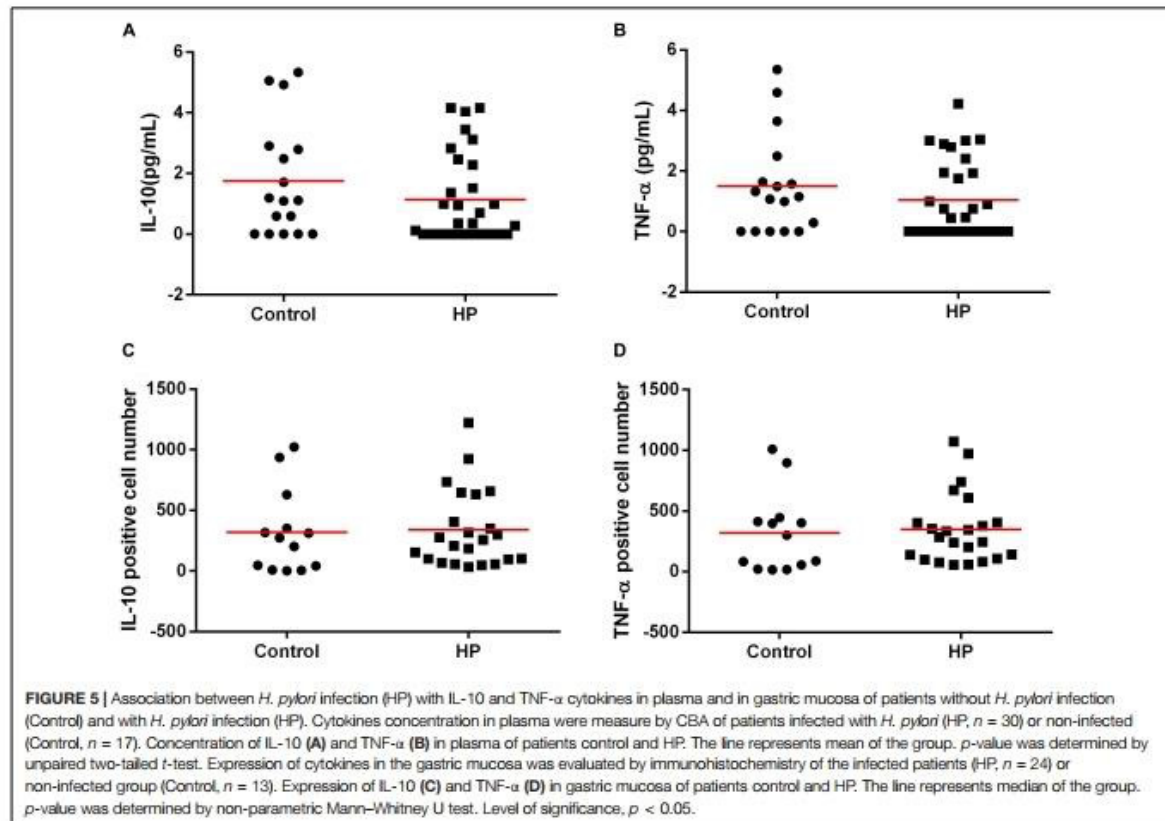
positively correlated with the HbA1c levels (Figures 8C,D), suggesting that inflammatory and anti-inflammatory markers released in the gastric mucosa during infection by *H. pylori* may be involved in the disturbance of glucose metabolism.

There Was No Correlation Between the Levels of Plasma Cytokines and Gastric Mucosa Cytokines

There was no correlation between the plasma levels of IL-10 with expression of IL-10 in the gastric mucosa (Figure 9A). Similarly, there was no correlation between the plasma levels of TNF- α with the expression of TNF- α in the gastric mucosa (Figure 9B).

DISCUSSION

The present study showed that patients infected with *H. pylori* had higher mean HbA1c levels than non-infected patients, suggesting a positive association between *H. pylori* infection and prediabetes. However, this association is not related to the presence of *H. pylori* by itself but depends on the density of



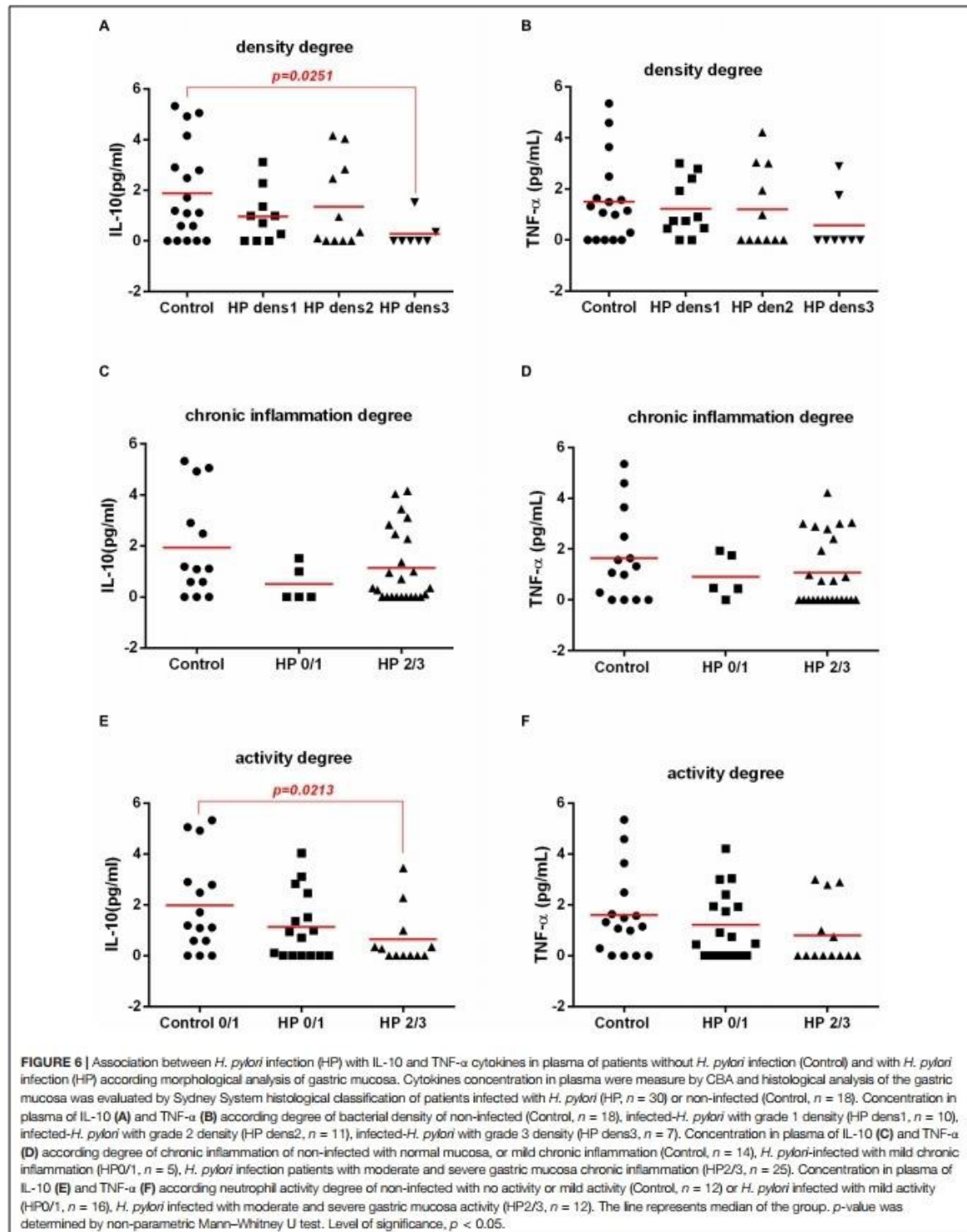
bacterial colonization and the degree of both inflammation and the activity of the chronic gastritis.

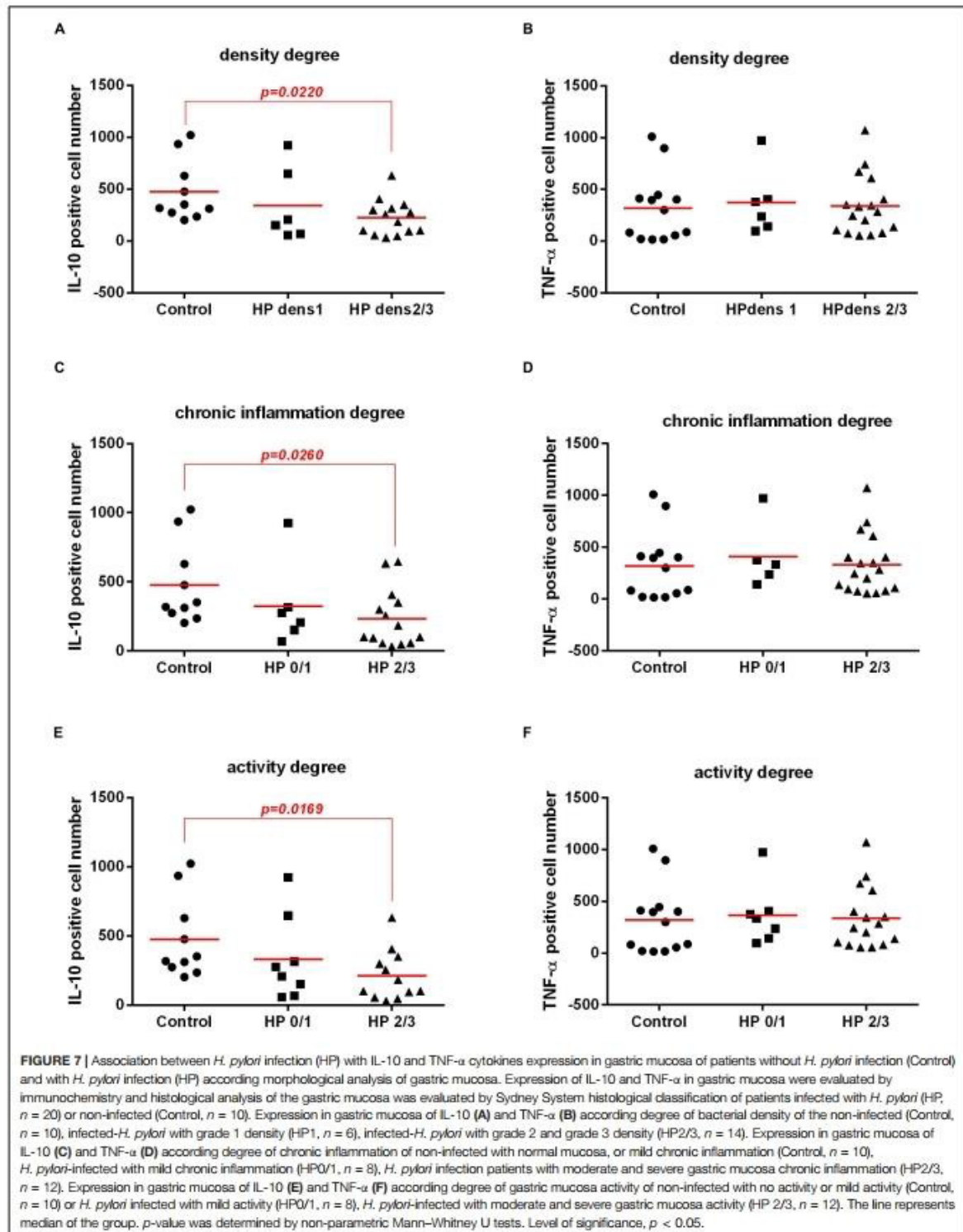
The association of *H. pylori* with prediabetes and diabetes is still controversial. According to a systematic review and meta-analysis, *H. pylori* infection was associated with higher HbA1c levels in patients with type I diabetes but not with T2DM (18). In contrast, in other studies of patients with T2DM, a positive association between *H. pylori* infection and suboptimal glycemic control was shown (19, 20). A positive association was previously noted between *H. pylori* infection and prediabetes (11, 12). Draz et al. (11) assessed the association between HP and prediabetes in adults using the oral glucose tolerance test (OGTT) for prediabetes diagnosis and histopathological examination for *H. pylori* diagnosis. In the present study, we used HbA1c to infer prediabetes status. The use of HbA1c has several advantages over the use of fasting plasma glucose and OGTT, which include increased convenience (fasting is not required), greater preanalytical stability and reduced day-to-day variation due to stress and illness (13). We employed the RUT and histopathological examination for *H. pylori* diagnosis. The RUT is a highly accurate invasive test for the diagnosis of *H. pylori* infection (21). By collecting body and antrum tissue fragments, as we did in this study, we reduced the probability of false negative results (22). Histological examination is considered the

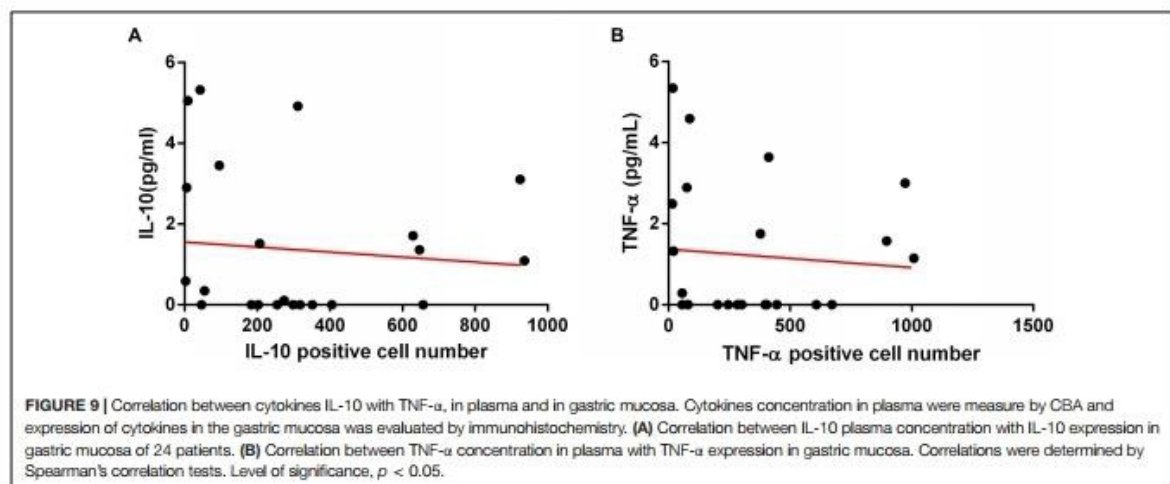
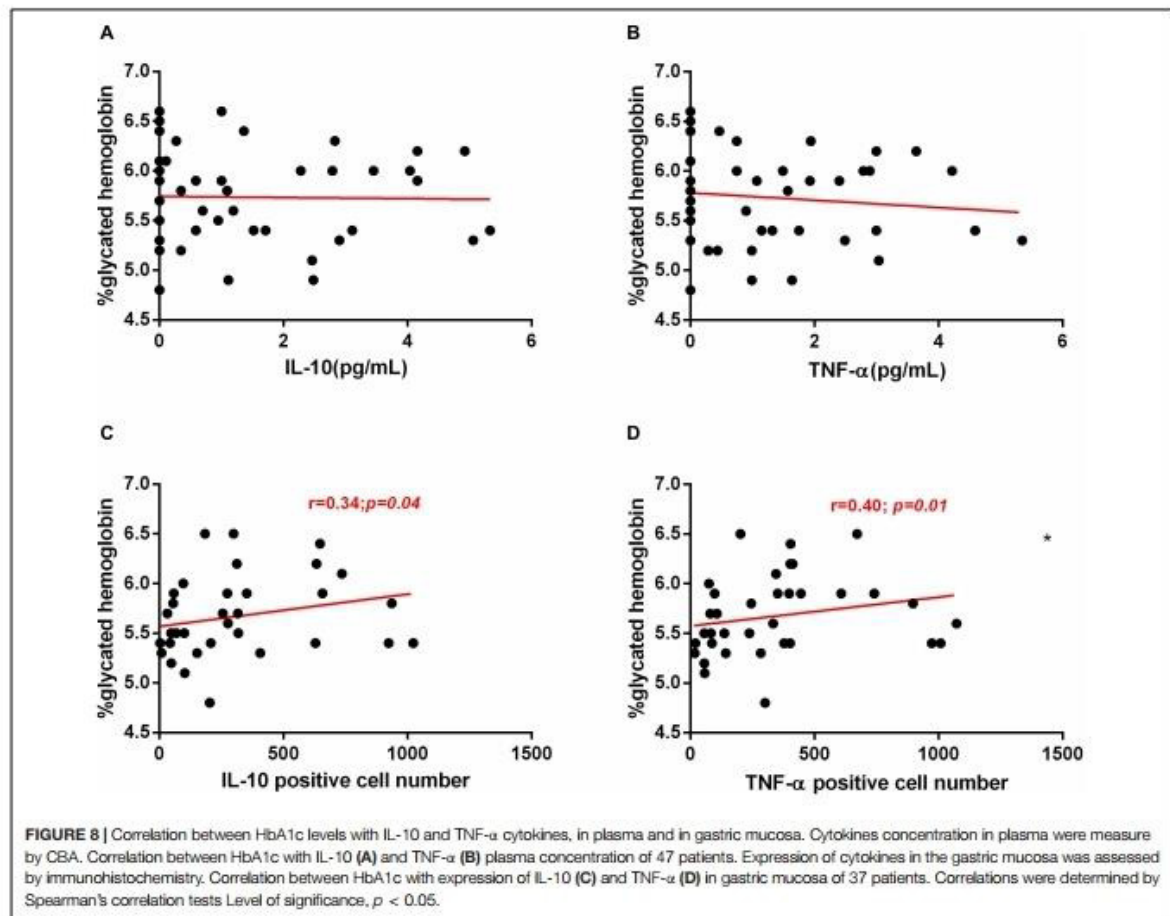
gold standard method for detecting *H. pylori* infection and allows morphological analysis of the gastric mucosa (23).

Several hypotheses exist regarding the role of gastric *H. pylori* infection in glucose regulation and type 2 diabetes development. *H. pylori* titers were shown to be independent predictors of hyperglycemia and abnormal pancreatic β -cell function, despite their relatively low adiposity (24). In addition, *H. pylori* infection induced insulin resistance in hepatocytes by activating the c-Jun/miR-203/SOCS3 signaling pathway (25). Furthermore, *H. pylori* infection may induce local and systemic increases in proinflammatory cytokines by inducing structural changes in insulin receptors and the inhibition of insulin action (9).

This study was designed to investigate whether *H. pylori* *per se* or host-related factors are involved in the disturbance of glycated hemoglobin. We observed that *H. pylori*-infected patients had higher mean HbA1c levels than those not infected with *H. pylori*. It was interesting to note that when the groups were stratified into HP-infected and non-infected groups and into prediabetic and non-prediabetic groups, it was observed that even in the patients considered non-prediabetic but who were infected with HP, HbA1c levels were higher than those in patients considered non-prediabetic but who were not infected with HP (Supplementary Figure S3), suggesting that HP is an important agent related to the increase in HbA1c.







Then, we compared the endoscopic diagnosis results with the HbA1c levels and observed that among patients diagnosed with pangastritis, HbA1c levels were significantly higher in those with *H. pylori* infection than in those without infection. Similarly, among patients with peptic ulcers, HbA1c levels were significantly higher in those with *H. pylori* infection than in those without infection. Moreover, when we compared a group of patients with endoscopic diagnosis of pangastritis associated with *H. pylori* infection with another group of patients with endoscopic diagnosis of peptic ulcer who were not infected, the HbA1c levels were significantly higher in the group with *H. pylori* infection than in the group without infection. These data have allowed us to initially assume that *H. pylori*-related factors could induce disturbances in HbA1c levels.

Interestingly, when we histologically evaluated the gastric mucosa, a significant increase in HbA1c levels was noted in the group of infected patients with moderate and intense activity and chronic inflammation of the gastric mucosa when compared to that in the controls. However, there was no change in HbA1c levels between the control group and the infected group with mild inflammation and low neutrophil activity. These data suggest that the degree of chronic inflammation and the degree of the activity of the gastric mucosa can influence HbA1c levels. Furthermore, we observed increased HbA1c levels in *H. pylori*-infected patients with increased bacterial density. Studies show that increased bacterial density is associated with a more intense active chronic inflammatory process (26). Thus, we support the hypothesis that the severity of the inflammatory process in the gastric mucosa is a risk factor for prediabetes.

The cross-sectional design of this study is a limitation because only allows us to establish associations, not being able to define a cause-effect relationship. However, epidemiological studies showed that *H. pylori* infection is acquired in childhood (27). In developing countries the rate of acquisition of the pathogen can reach up to 50% of children at the age of five (28), similar to the prevalence rate in adults (1). Natural clearance of *H. pylori* infection is difficult to determine and infection can perpetuate throughout the life of the host (2). Therefore, it is possible to believe that *H. pylori* infection occurred long time before T2DM. Jeon et al. (29) using a prospective cohort demonstrated that individuals seropositive for *H. pylori* whose diabetic status was not known at the initiation of the study were two times more likely to develop diabetes than those who were seronegative, even after adjusting for age, sex, education, and covariates such as smoking, BMI, blood pressure, and lipids. Chen and Blaser (30) showed that *H. pylori* seropositivity, and *H. pylori* *cagA* positivity in particular, was associated with higher mean HbA1c levels, an association that persisted after excluding individuals with a history of diabetes mellitus and controlling for potential confounders. Study performed by Hsieh et al. (31) observed that long-term *H. pylori* infection was significantly associated with high levels of HbA1c, decreased insulin secretion, and a higher prevalence of T2DM in Taiwanese patients.

The pathogenesis of T2DM has been associated with a subclinical chronic inflammation and activation of the immune system. *H. pylori* infection will invariably induce chronic low-grade inflammation with positive regulation of pro-inflammatory

cytokines and mediators, such as C-reactive protein, tumor necrosis factor and interleukine-6, which may affect peripheral insulin action and secretion of pancreatic β cells (32, 33).

Type 2 diabetes mellitus is characterized by a metabolic disorder between increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines like interleukin- IL-1, IL-6, tumor necrosis factor-(TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β) and decreased anti-inflammatory cytokines like IL-4, IL-10, IL-13 (34), which are involved with peripheral insulin resistance (8) and beta cell apoptosis in T2DM (34).

In this study, there was no significant differences in the plasma levels between anti-inflammatory (IL-10), and pro-inflammatory cytokine (TNF- α) between groups with and without *H. pylori* infection. There was also no association between plasma levels of interleukins IL-10 and TNF- α with HbA1c levels. Similar results described by Yang et al. (35) showed that chronic *H. pylori* infection affects glucose metabolism, but plasma levels of systemic mediators were not involved in these effects. We showed that *H. pylori* infection might disrupt glucose metabolism, but circulating levels of anti- and pro-inflammatory cytokines do not appear to depend on bacterium's factors, but on the inflammatory response of the host mucosa.

Our results demonstrated that the bacterial density was negatively correlated with IL-10 cytokine plasma levels. The data shown that although the infection is considered local, it results in systemic impairment of the inflammatory response and depends on the density of *H. pylori* colonization. Moreover, a decrease in IL-10 expression in the gastric mucosa was observed by immunohistochemistry in *H. pylori*-infected patients with an increased density of *H. pylori* colonization and an increased degree of both neutrophil activity and chronic inflammation of the gastric mucosa. Vinagre et al. (36) detected low levels of IL-10 in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected patients with an increased degree of inflammation and increased neutrophil activity of the chronic gastritis. Could the decrease in IL-10 expression during *H. pylori* infection, as observed in this study, lead to an increase in bacterial colonization and the bacterial density would to increased glycated hemoglobin levels? Or, conversely, could the increase in bacterial density induce decreased expression of IL-10? Could plasmatic IL-10 levels be used as a marker to detect the possible risk of prediabetes in an *H. pylori*-infected patient? In this study, although a correlation between the levels of cytokines in plasma with cytokines in the gastric mucosa was not demonstrated, the expression of the IL-10 cytokine showed a corresponding systemic and local pattern in *H. pylori* infection. This suggests that plasma levels of IL-10 reflect the load of bacterial colonization and the intensity of inflammatory process in the gastric mucosa, which reinforces the possibility of serum IL-10 being used as a risk marker for prediabetes in *H. pylori*-infected patients. Studies indicated the association between the low levels of IL-10 with the high HbA1c levels. For this reason, it is possible to consider the blood levels of IL-10 as one of the predictors of glycemia (37, 38).

In this study, we found no correlation between plasma levels of IL-10 or TNF- α with HbA1c levels. On the other hand, in the gastric mucosa, we observed a positive correlation

between IL-10 and TNF- α expression with HbA1c. Wang et al. (39) observed that plasma levels of IL-10 were positively associated with prediabetes or T2DM, in disagreement with other studies that showed that IL-10 improve impaired insulin signaling (40) and prevent pancreatic beta cell destruction (41). However, we observed in our study that *H. pylori*-infected patients with a higher degree of mucosal inflammation and higher bacterial density had increased levels of HbA1c and reduced levels of IL-10 in the plasma and gastric mucosa. Thus, the increase in HbA1c levels would be dependent on inflammatory response degree of the host mucosa, which is dependent of bacterial density. Most studies found that subjects with insulin resistance or T2DM had increased levels of TNF- α (42). It has been reported that chronic exposure of insulin-producing pancreatic cells (β cells) to the pro-inflammatory cytokine TNF- α can inhibit insulin secretion and induce apoptosis of pancreatic β cells (42). The progression from normal glucose tolerance to prediabetes and T2DM is characterized by continuous defects in β cell function (43). In this study, patients infected with *H. pylori* showed a positive correlation between TNF- α expression in the gastric mucosa and HbA1c levels, which suggests that the pro-inflammatory cytokines induced by *H. pylori* infection play an important role in the disorder of glucose metabolism.

Another question to keep in mind is whether eradicating *H. pylori* infection could reduce HbA1c levels in *H. pylori*-infected patients without prediabetes. Data are conflicting regarding the impact of *H. pylori* eradication on glucose metabolism. *H. pylori* eradication improved the mean HbA1c values in non-diabetic patients (44) and in patients with T2DM (45).

We consider *H. pylori* infection to be a risk factor for prediabetes, and we believe this is an additional reason to eradicate *H. pylori* infection in adulthood. Special attention should be given to those patients with higher bacterial loads and higher degrees of inflammation and neutrophil activity of the chronic gastritis. In these patients, the evaluation of HbA1c levels would be of interest.

More studies are necessary to elucidate whether *H. pylori* *per se* or host-related factors are involved in disturbances of glycated hemoglobin. Detailed analysis of the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in the gastric mucosa and glycated hemoglobin levels in patients infected with *H. pylori* appears to be of relevance for further study.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The National Committee for Research Ethics (CONEP) approved this study according to CAAEE 07989412.0.0000.5086. The

patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SM, NS, and FN conceived and designed the experiments. SM, DNC, DMC, JN, BM, LDS, and MB performed the experiments. SM, JS, DMC, LAS, JN, RG, and FN analyzed the data. NS, RG, and FN contributed reagents, materials, analysis tools. SM, JN, LAS, RG, NS, and FN wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Brazilian funding agencies FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento em Pesquisa), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support and author fellowships. We thank to IECT Biotechnology (FAPEMA). We are also grateful to Dr. Gyl Eanes for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.02121/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Association between *H. pylori* infection (HP) with glycated hemoglobin (HbA1c) levels in patients without (Control) or with *H. pylori* infection (HP) according endoscopic diagnosis. Endoscopic diagnosis were evaluated according endoscopic classification of the Sydney System of patients infected with *H. pylori* and with pangastritis (HP gastritis, $n = 34$) or non-infected with peptic ulcer (Control peptic ulcer, $n = 10$).

FIGURE S2 | Correlation between cytokines IL-10 and TNF- α , in plasma and in gastric mucosa with degree bacterial density of the gastric mucosa. Cytokines concentration in plasma were measure by CBA, expression of cytokines in the gastric mucosa were evaluated by immunohistochemistry and degree bacterial density was evaluated by Sydney System histological classification. Correlation between bacterial density of the gastric mucosa with IL-10 (A) and TNF- α (B) plasma concentration of 47 patients. Correlation between bacterial density of the gastric mucosa with expression of IL-10 (C) and TNF- α (D) in gastric mucosa of 37 patients. Correlations were determined by Spearman's correlation tests. Level of significance, $p < 0.05$.

FIGURE S3 | Association between *H. pylori* infection (HP) with glycated hemoglobin (HbA1c) levels in patients non-prediabetic (Non-prediabetic HP) and prediabetic (Prediabetic HP) with *H. pylori* infection, patients non-prediabetic (Non-prediabetic control) and prediabetic (Prediabetic control) without *H. pylori* infection. HbA1c levels were evaluated in the plasma of patients Non-prediabetic HP ($n = 22$), Prediabetic HP ($n = 40$), Non-prediabetic control ($n = 13$) and Prediabetic control ($n = 9$) using a method certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). p -value was determined by unpaired two-tailed t -test. * $p < 0.05$ compared Non-prediabetic HP and Non-prediabetic control group. ** $p < 0.0001$ compared Non-prediabetic control and Prediabetic control groups. * $p < 0.0001$ compared Non-prediabetic HP and Prediabetic HP groups. Level of significance, $p < 0.05$.

REFERENCES

- Zamani M, Ebrahimbabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* (2018) 47:868–76. doi: 10.1111/apt.14561
- Abadi ATB. Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. *World J Gastroenterol.* (2017) 23:2870–82. doi: 10.3748/wjg.v23.i16.2870
- Zatarka S, Eisig JN, Chinzon D, Rothstein W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. *Helicobacter.* (2007) 12:82–8. doi: 10.1111/j.1523-5378.2007.00474.x
- Franceschi F, Zuccala G, Roccarina D, Gasbarrini A. Clinical effects of *Helicobacter pylori* outside the stomach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* (2014) 11:234–42. doi: 10.1038/nrgastro.2013.243
- He C, Yang Z, Lu NH. *Helicobacter pylori* infection and diabetes: is it a myth or fact. *World J Gastroenterol.* (2014) 20:4607–17. doi: 10.3748/wjg.v20.i16.4607
- Han X, Li Y, Wang J, Liu B, Hu H, Li X, et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with type 2 diabetes among a middle- and old-age Chinese population. *Diabetes Metab Res Rev.* (2016) 32:95–101. doi: 10.1002/dmrr.2677
- Horikawa C, Kodama S, Fujihara K, Yachi Y, Tanaka S, Suzuki A, et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with glycemic control in patients with diabetes: a meta-analysis. *J Diabetes Res.* (2014) 2014:250620. doi: 10.1155/2014/250620
- Arora P, Garcia-Bailo B, Dastani Z, Brenner D, Villegas A, Malik S, et al. Genetic polymorphisms of innate immunity-related inflammatory pathways and their association with factors related to type 2 diabetes. *BMC Med Genet.* (2011) 12:95. doi: 10.1186/1471-2350-12-95
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* (2005) 115:1111–9. doi: 10.1172/JCI25102
- Yang GH, Wu JS, Yang YC, Huang YH, Lu FH, Chang CJ. Gastric *Helicobacter pylori* infection associated with risk of diabetes mellitus, but not prediabetes. *J Gastroenterol Hepatol.* (2014) 29:1794–9. doi: 10.1111/jgh.12617
- Draz U, Rathore R, Butt NF, Randhawa FA, Malik U, Waseem T. Presence of pre-diabetes in *Helicobacter pylori* positive versus *Helicobacter pylori* negative patients having dyspepsia. *J Pak Med Assoc.* (2018) 68:939–41.
- Htun NSN, Odermatt P, Müller I, Yap P, Steinmann P, Schindler C, et al. Association between gastrointestinal tract infections and glycated hemoglobin in school children of poor neighborhoods in Port Elizabeth, South Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* (2018) 12:e0006332. doi: 10.1371/journal.pntd.0006332
- American Diabetes Association 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes–2019. *Diabetes Care.* (2019) 42(Suppl. 1):S13–28.
- Coelho LGV, Marinho JR, Genta R, Ribeiro LT, Passos MDCF, Zatarka S, et al. IVth Brazilian consensus conference on *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol.* (2018) 55:97. doi: 10.1590/s0004-2803.201800000-20
- Tytgat GN. The Sydney system: endoscopic division. Endoscopic appearances in gastritis/Duodenitis. *J Gastroenterol Hepatol.* (1991) 6:223–34. doi: 10.1111/j.1440-1746.1991.tb01469.x
- Stolte M, Meining A. The updated sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Can J Gastroenterol.* (2001) 15:591–8. doi: 10.1155/2001/367832
- Rauws EA, Langenberg W, Houthoff HJ, Zanen HC, Tytgat GN. *Campylobacter pyloridis*-associated chronic active antral gastritis. *Gastroenterology.* (1988) 94:33–40. doi: 10.1016/0016-5085(88)90606-3
- Dai YN, Yu WL, Zhu HT, Ding JX, Yu CH, Li YM. Is *Helicobacter pylori* infection associated with glycemic control in diabetics? *World J Gastroenterol.* (2015) 21:5407–16. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5407
- Ibrahim A, Zaher T, Ghonemy TA, El-Azim SA, El-Azim MA, Ramadan A. Impact of cytotoxin-associated gene A of *Helicobacter pylori* strains on microalbuminuria in type 2 diabetes. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* (2010) 21:694–700. doi: 10.4314/ajnt.v3i2.58892
- Wang SZ, Shi YN, Zhao J, Wang ZD. The effect of *Helicobacter pylori* on blood glucose fluctuations in patients with type 2 diabetes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* (2009) 89:958–61. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2009.14.007
- Wang YK, Kuo FC, Wu DC. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: current options and developments. *World J Gastroenterol.* (2015) 21:11221–35. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11221
- Parihar V, Holleran G, McNamara D. A combined antral and corpus rapid urease testing protocol can increase diagnostic accuracy despite a low prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients undergoing routine gastroscopy. *UEG J.* (2015) 3:432–6. doi: 10.1177/2050640615573374
- Moon SW, Kim TH, Lee OJ. United rapid urease test is superior than separate test in detecting *Helicobacter pylori* at the gastric antrum and body specimens. *Clin Endosc.* (2012) 45:392–6. doi: 10.5946/ce.2012.45.4.392
- So WY, Tong PC, Ko GT, Ma RC, Ozaki R, Kong AP, et al. Low plasma adiponectin level, white blood cell count and *Helicobacter pylori* titre independently predict abnormal pancreatic β -cell function. *Diabetes Res Clin Pract.* (2009) 86:89–95. doi: 10.1016/j.diabres.2009.08.010
- Zhou X, Liu W, Gu M, Zhou H, Zhang G. *Helicobacter pylori* infection causes hepatic insulin resistance by the c-Jun/miR-203/SOCS3 signaling pathway. *J Gastroenterol.* (2015) 50:1027–40. doi: 10.1007/s00535-015-1051-6
- Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopathology of *Helicobacter pylori*. *J Bras Patol Med Lab.* (2003) 39:335–42. doi: 10.1590/S1676-24442003000400011
- Yokota S, Konno M, Fujiwara S, Toita N, Takahashi M, Yamamoto S, et al. Intrafamilial, preferentially mother-to-child and intrasporousal, *H. pylori* infection in Japan determined by multilocus sequence typing and random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Helicobacter.* (2015) 20:334–42. doi: 10.1111/hel.12217
- Parente JM, da Silva BB, Palha-Dias MP, Zatarka S, Nishimura NF, Zeitune JM. *Helicobacter pylori* infection in children of low and high socioeconomic status in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* (2006) 75:509–12. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.509
- Jeon CY, Haan MN, Cheng C, Clayton ER, Mayeda ER, Miller JW, et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with an increased rate of diabetes. *Diabetes Care.* (2012) 35:520–5. doi: 10.2337/dc11-1043
- Chen Y, Blaser MJ. Association between gastric *Helicobacter pylori* colonization and glycated hemoglobin levels. *J Infect Dis.* (2012) 205:1195–202. doi: 10.1093/infdis/jis106
- Hsieh MC, Wang SS, Hsieh YT, Kuo FC, Soon MS, Wu DC. *Helicobacter pylori* infection associated with high HbA1c and type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest.* (2013) 43:949–56.
- Hamed SA, Amine NF, Galal GM, Helal SR, Tag El-Din LM, Shawky OA, et al. Vascular risks and complications in diabetes mellitus: the role of *Helicobacter pylori* infection. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* (2008) 17:86–94. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2007.10.006
- Abolfaz S, Nodoushan H, Nabavi A. The interaction of *Helicobacter pylori* infection and type 2 diabetes mellitus. *Adv Biomed Res.* (2019) 8:15. doi: 10.4103/abr.abr_37_18
- Saxena M, Srivastava N, Banerjee M. Association of IL-6, TNF- α and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep.* (2013) 40:6271–9. doi: 10.29333/ejgm/82250
- Yang Z, Li W, He C, Xie C, Zhu Y, Lu NH. Potential effect of chronic *Helicobacter pylori* infection on glucose metabolism of Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol.* (2015) 21:12593–604. doi: 10.3748/wjg.v21.i44.12593
- Vinagre RMDF, Vinagre IDF, Vilar-e-Silva A, Fecury AA, Martins LC. *Helicobacter pylori* infection and immune profile of patients with different gastroduodenal diseases. *Arq Gastroenterol.* (2018) 55:122–7. doi: 10.1590/S0004-2803.201800000-21
- Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV. Evaluation of serum interleukin-10 levels as a predictor of glycemic alteration in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol.* (2015) 19:388–92. doi: 10.4103/0972-124X.150876
- Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV. Effect of scaling and root planning on serum interleukin-10 levels and glycemic control in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol.* (2015) 19:188–93. doi: 10.4103/0972-124X.148644
- Wang Z, Shen X-H, Feng W-M, Ye G-F, Qiu W, Li B. Analysis of inflammatory mediators in prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes patients. *J Diabetes Res.* (2016) 2016:7965317. doi: 10.1155/2016/7965317

40. Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism*. (2013) 62:1543–52. doi: 10.1016/j.metabol.2013.07.001
41. Saxena M, Agrawal CC, Bid HK, Banerjee M. An interleukin-10 gene promoter polymorphism. (–592A/C) associated with type 2 diabetes: a North Indian study. *Biochem Genet*. (2012) 50:549–59. doi: 10.1007/s10528-012-9499-z
42. Wang C, Guan Y, Yang J. Cytokines in the progression of pancreatic β -cell dysfunction. *Int J Endocrinol*. (2010) 2010:10. doi: 10.1155/2010/515136. 515136
43. Weyer C, Hanson RL, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia. *Diabetes*. (2000) 49:2094–101. doi: 10.2337/diabetes.49.12.2094
44. Roca-Rodríguez MM, Coin-Aragüez I, Cornejo-Pareja I, Alcalde J, Clu-Fernández C, Muñoz-Garach A, et al. Carbohydrate metabolism improvement after *Helicobacter pylori* eradication. *Diabetes Metab*. (2016) 42:130–4. doi: 10.1016/j.diabet.2015.11
45. Zojaji H, Ataei E, Sherafat SJ, Ghobakhlo M, Fatemi SR. The effect of the treatment of *Helicobacter pylori* infection on the glycaemic control in type 2 diabetes mellitus. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. (2013) 6:36–40.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Maluf, Salgado, Cysne, Camelo, Nascimento, Maluf, Silva, Belfort, Silva, Guerra, Salgado Filho and Nascimento. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APÊNDICE B – PRODUÇÃO DURANTE O CURSO

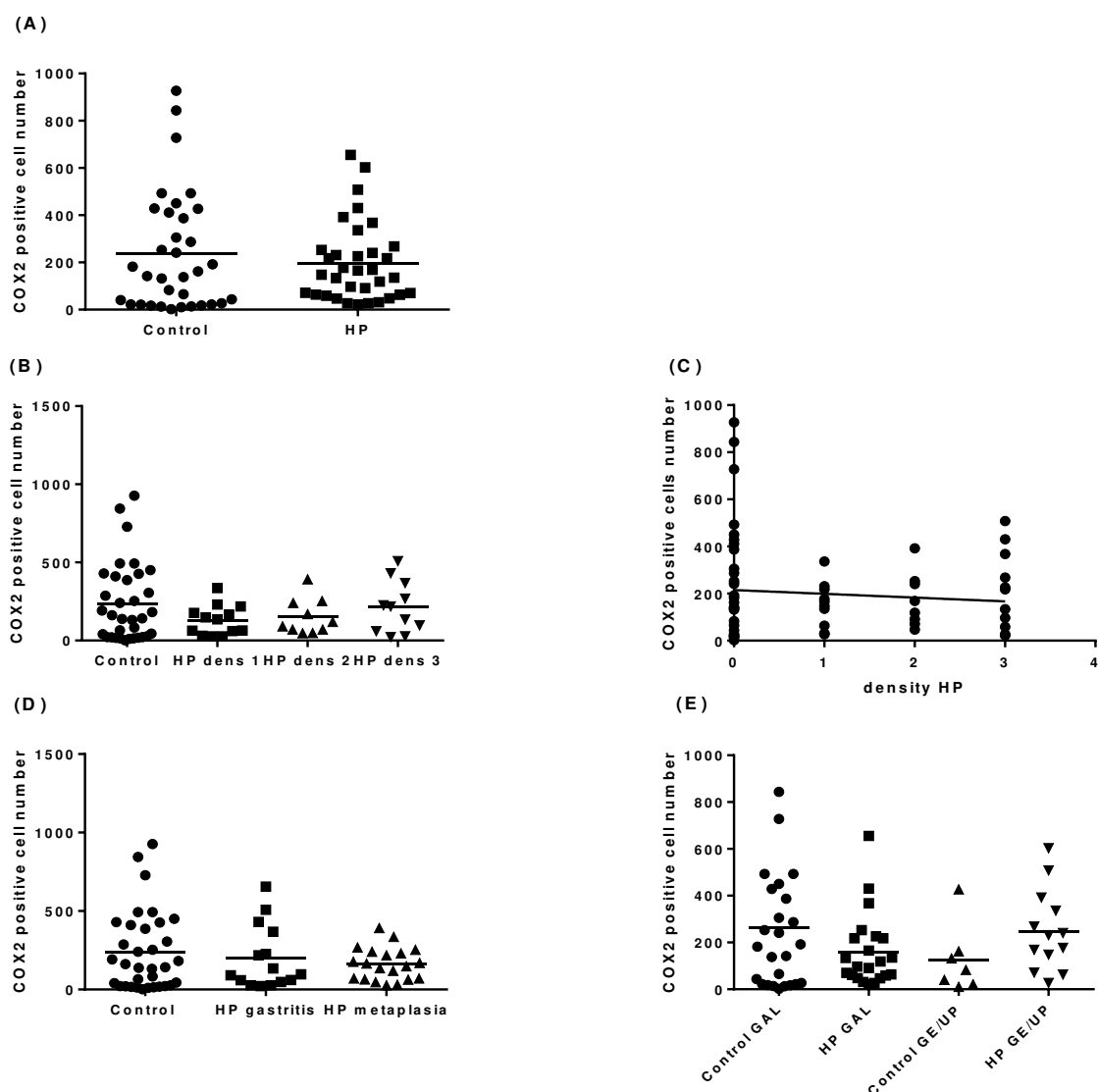


Figura Suplementar 1. Perfil de expressão de Ciclooxygenase 2 (COX2) na mucosa gástrica de pacientes com infecção por *H. pylori*. A expressão de COX2 na mucosa foi avaliada por imunohistoquímica. A densidade bacteriana, a presença ou ausência de lesões pré-neoplásicas e o diagnóstico endoscópico foram avaliados de acordo com Sistema Sydney, em pacientes infectados com *H. pylori* (HP) ou não infectados (Control). A densidade foi classificada em densidade 1 (HP dens 1), densidade 2 (HP dens 2) e densidade 3 (HP dens 3) ou densidade 0 (Control). Histologicamente foi considerada a presença (HP metaplasia) ou ausência de lesões pré-neoplásicas (HP gastritis) em pacientes infectados. À endoscopia, foram considerados os grupos com Pangastrite enantematosa leve infectados com *H. pylori* (HP GAL) e não infectados (Control GAL) e os grupos com Gastrite erosiva e ou Úlcera péptica em infectados com *H. pylori* (HP GE/UP) ou não infectados (Control GE/UP). Expressão de COX2 na mucosa de pacientes com infecção (HP) e sem infecção por *H. pylori* (Control) (FS1 A). Expressão de COX2 de acordo com a densidade bacteriana (FS1 B). Correlação entre expressão de COX2 na mucosa e densidade (FS1 C). Expressão de COX2 de acordo com a presença ou ausência de lesões pré-neoplásicas FS1 D). Expressão de COX2 de acordo com o diagnóstico

endoscópico (FS1 E). A linha representa a mediana do grupo. p valor foi determinado por teste não paramétrico Mann-Whitney test. Nível de significância, $p < 0.05$. N= 35 (HP) e N=33 (Control).

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

		HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO/HU/UFMA													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP															
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA															
Título da Pesquisa: INFECÇÃO POR HELICOBACTER PYLORI EM DIABÉTICOS TIPO 2 E SUA ASSOCIAÇÃO COM NÍVEL DE HEMOGLOB(…)															
Pesquisador: NATALINO SALGADO FILHO															
Área Temática:															
Versão: 2															
CAAE: 07989412.0.0000.5086															
Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA															
DADOS DO PARECER															
Número do Parecer: 177.577															
Data da Relatoria: 18/12/2012															
Apresentação do Projeto:															
Helicobacter pylori (H. pylori) é uma bactéria patogênica que coloniza a mucosa gástrica humana produzindo processo inflamatório. É uma importante causa de gastrite crônica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma gástrico, a infecção pelo H. pylori tem sido associada a diversas doenças extragástricas. Estudos que associam diabetes mellitus a infecção pelo H. pylori têm resultados conflitantes em relação a dados epidemiológicos, consequências clínicas e metabólicas. Trata-se de um estudo caso-controle que tem por objetivo avaliar a associação da infecção pelo H. pylori aos níveis de hemoglobina glicada e aos marcadores inflamatórios em pacientes diabéticos tipo 2 dispépticos. Serão incluídos no estudo um grupo com 143 pacientes diabéticos tipo 2 e outro grupo com 143 pacientes não diabéticos, com sintomas dispépticos, atendidos nos Serviços de Diabetes e de Endoscopia do Hospital Universitário Presidente Dutra (UFMA), no período de setembro de 2012 a agosto de 2013. Os procedimentos para a coleta de dados incluem aplicação de uma ficha protocolo, coleta de duas amostras de sangue para exames laboratoriais e realização de endoscopia. O diagnóstico da infecção pelo H. pylori será feito através do teste da urease e do histopatológico. Análise dos dados contemplados no projeto. Financiamento próprio.															
Objetivo da Pesquisa:															
Objetivo Primário: Avaliar a associação entre a infecção por H. pylori e o nível de hemoglobina glicada e dos marcadores inflamatórios em pacientes diabéticos tipo 2.															
Objetivos Secundários:															
- Caracterizar a população com relação aos aspectos sociodemográficos, clínicos e															
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 40%;">Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227</td> <td style="width: 20%;"></td> <td style="width: 40%;">CEP: 65.020-070</td> </tr> <tr> <td>Bairro: CENTRO</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: MA</td> <td>Município: SAO LUIS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (98)2109-1250</td> <td>Fax: (98)2109-1223</td> <td>E-mail: cep@huufma.br</td> </tr> </table>				Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227		CEP: 65.020-070	Bairro: CENTRO			UF: MA	Município: SAO LUIS		Telefone: (98)2109-1250	Fax: (98)2109-1223	E-mail: cep@huufma.br
Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227		CEP: 65.020-070													
Bairro: CENTRO															
UF: MA	Município: SAO LUIS														
Telefone: (98)2109-1250	Fax: (98)2109-1223	E-mail: cep@huufma.br													



**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA**



laboratoriais;

- Determinar e comparar a frequência da infecção pelo H. pylori em pacientes diabéticos e não diabéticos;
- Determinar os sintomas dispépticos mais frequentes da amostra em estudo; Determinar marcadores inflamatórios relacionados à infecção por H.pylori: Proteína C Reativa (PCR), Interleucina -6 (IL-6), Fator de necrose tumoral alfa (TNFa) na amostra em estudo; -Comparar nível de hemoglobina glicada entre pacientes diabéticos com e sem a infecção pelo H. pylori.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos físicos estão associados a punção venosa que pode causar algum desconforto, ou a utilização da medicação utilizada para a realização da endoscopia digestiva alta, que pode causar sonolência e tonturas passageiras que podem ser momentâneas e podem ser revertidas com a disponibilização de medicamentos. Os benefícios referem-se a oportunidade de verificar os níveis de glicemia em jejum durante os 3 meses anteriores a coleta de sangue através do exame de hemoglobina glicada, e possibilita o diagnóstico precocemente de casos de diabetes e da infecção pelo H. pylori.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Proposta de estudo relevante pela associação entre casos de diabetes mellitus e infecção pelo H. pylori, podendo trazer resultados conflitantes em relação a dados epidemiológicos e consequências clínicas e metabólicas. A relevância se traduz pela possibilidade de diagnóstico precoce das patologias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo cumpre com as exigências em relação aos "Termos de apresentação obrigatória": Folha de rosto, Projeto de pesquisa, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) orçamento e currículo do(s) pesquisador(es). Atende portanto às exigências da Resolução CNS/MS nº 196/96.

Recomendações:

Não Há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador atendeu as pendências referidas na versão 1ª, sendo o protocolo considerado aprovado por atender aos requisitos da Resolução nº 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/HU/UFMA



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O PROJETO atende aos requisitos fundamentais da Resolução nº 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo

SAO LUIS, 18 de Dezembro de 2012

Assinador por:

Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
(Coordenador)

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

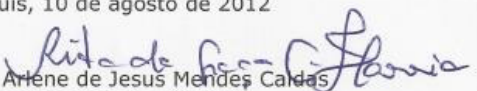
Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

Fax: (98)2109-1223

E-mail: cep@huufma.br

ANEXO B – APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFMA

 	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DIRETORIA ADJUNTA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO COMISSÃO CIENTÍFICA - COMIC			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;"> PARECER CONSUBSTANCIADO NATUREZA DO PROJETO Graduação () Especialização () Mestrado (X) Doutorado () Serviço/HUUFMA () Outros () </td> <td style="width: 50%;"> Nº do Protocolo: 003156/2012-90 Data de Entrada no COMIC: 18/07/2012 Nº do Parecer: 56 Parecer: APROVADO </td> </tr> </table>			PARECER CONSUBSTANCIADO NATUREZA DO PROJETO Graduação () Especialização () Mestrado (X) Doutorado () Serviço/HUUFMA () Outros ()	Nº do Protocolo: 003156/2012-90 Data de Entrada no COMIC: 18/07/2012 Nº do Parecer: 56 Parecer: APROVADO
PARECER CONSUBSTANCIADO NATUREZA DO PROJETO Graduação () Especialização () Mestrado (X) Doutorado () Serviço/HUUFMA () Outros ()	Nº do Protocolo: 003156/2012-90 Data de Entrada no COMIC: 18/07/2012 Nº do Parecer: 56 Parecer: APROVADO			
I - Identificação: Título: Infecção por <i>Helicobacter Pylori</i> em diabéticos tipo 2 e sua associação com nível de hemoglobina glicada e marcadores inflamatórios Identificação do Pesquisador Responsável: Natalino Salgado Filho Identificação da Equipe Executora: Selma Santos Maluf; Flávia Raquel F. Nascimento Unidade do HUUFMA onde será realizado: HUPD Sector de realização: Serviço de Diabetes Mellitus e Serviço de Endoscopia Cooperação estrangeira: Não Multicêntrico: Não				
II – Objetivos Geral: Avaliar a associação entre a infecção pelo <i>H. pylori</i> e o nível de hemoglobina glicada e dos marcadores inflamatórios em pacientes diabéticos tipo 2. Específicos: Caracterizar a população com relação aos aspectos sociodemográficas, clínicos e laboratoriais; Determinar e comparar a frequência da infecção pelo <i>H. pylori</i> em pacientes diabéticos e não-diabéticos; Determinar os sintomas dispépticos mais frequentes da amostra em estudo; Determinar marcadores inflamatórios relacionados à infecção por <i>H. pylori</i> : Proteína C Reativa (PCR), Interleucina -6 (IL-6), Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) na amostra em estudo; Comparar nível de hemoglobina glicada entre pacientes diabéticos com e sem a infecção pelo <i>H. pylori</i> .				
III - Resumo do projeto: (Enfocando o tipo de pesquisa, objetivo, metodologia, cronograma, análise dos dados, financiamento e relevância). Trata-se de um estudo caso-controle, no qual serão avaliados pacientes portadores de DM tipo 2, atendidos no Serviço de Diabetes do Hospital Universitário Presidente Dutra-UFMA (HU-UFMA) e não-diabéticos encaminhados para realizar exames de endoscopia digestiva alta no Serviço de Endoscopia do HU-UFMA. Tem como objetivo Avaliar a associação entre a infecção pelo <i>H. pylori</i> e o nível de hemoglobina glicada e dos marcadores inflamatórios em pacientes diabéticos tipo 2. Os dados coletados serão armazenados em um banco de dados específico criado no programa EPI INFO 2000®. A responsabilidade financeira para o desenvolvimento do estudo é de responsabilidade dos pesquisadores.				
IV - Parecer Consubstanciado ☒ X APROVADO ☐ COM PENDÊNCIA (Em caso de pendência fazer a descrição) ☐ RETIRADO (Em caso de retirada descrever o motivo) ☐ NÃO APROVADO (Em caso de não aprovado descrever o motivo) OBS: Apresentar relatório final.				
São Luís, 10 de agosto de 2012  Prof. Dra. Arlene de Jesus Mendes Caldas Coordenadora da COMIC				
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão Rua Barão de Itapary, 227 Centro C.E.P. 65. 020-070 São Luís – Maranhão Tel: (98) 2109-1250 E-mail: cep@huufma.br				

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

Nº: _____

Título: Infecção por *Helicobacter pylori* em diabéticos tipo 2 e sua associação com nível de hemoglobina glicada e marcadores inflamatórios.

A) Proposta

Prof. Dr. Natalino Salgado Filho e Prof.^aDr^a. Flávia Raquel F. Nascimento, professores da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), estão conduzindo um estudo com a finalidade de avaliar a infecção pelo *Helicobacter pylori* em pacientes diabéticos atendido no Serviço de Diabetes do Hospital Universitário Presidente Dutra- UFMA e não diabéticos atendidos no Serviço de Endoscopia do mesmo hospital, associando o nível de hemoglobina glicada (exame que indica a variação da glicose do sangue que ocorre no período de 3 meses) e exames de sangue que indicam inflamação. Os pacientes com sintomas de dor no estômago, má digestão, enjôos, empachamento, vômitos, azia que são encaminhados para realizar investigação através de exame de endoscopia digestiva alta serão convidados a participar deste estudo.

B) Procedimento

Se você concordar em participar, as seguintes coisas acontecerão:

1. Você responderá a um questionário que investigará aspectos socioeconômicos, sintomas atuais, doenças associadas, medicações em uso.
2. Você será submetido a um exame físico de rotina. O exame físico é feito para avaliar a sua saúde geral e descobrir outros fatores que podem afetar o plano de tratamento. Isto levará cerca de 20 minutos.
3. Você realizará exames laboratoriais, coletando amostras de sangue por meio de punção venosa.
4. Você fará um exame de endoscopia digestiva alta para investigar a causa dos seus sintomas digestivos. Para esse exame você receberá dimeticona gotas para eliminação de saliva do estômago e xilocaina spray na orofaringe. Alguns pacientes necessitam receber um medicamento na veia, um calmante que relaxa e torna mais confortável a passagem do aparelho. Este após passagem pela orofaringe irá examinar o esôfago, estômago e duodeno e será coletada pequena amostra do estômago para diagnosticar a bactéria.

C) Riscos e Desconforto

Os riscos para o desenvolvimento de complicações médicas são muito pequenos. A punção venosa poderá causar algum desconforto, que durará poucos minutos, O calmante poderá causar sonolência e tonturas, que são passageiras e podem ser revertidas com outras medicações.

D) Benefícios

Os testes de laboratório irão auxiliar na investigação do seu estado de saúde , assim como a endoscopia vai diagnosticar doenças no estômago e detectar presença de uma bactéria, que pode levar a outras doenças como úlceras no estômago. Isto poderá trazer benefício direto para você ao participar deste estudo, como também auxiliar outros pacientes com sintomas similares no futuro.

E) Custo

Você não será cobrado por qualquer dos procedimentos realizados no estudo.

F) Reembolso

Você não será reembolsado por participar deste estudo.

G) Confiabilidade dos dados

A participação em projetos de pesquisa pode resultar em perda de privacidade, entretanto, procedimentos serão tomados pelos responsáveis por este estudo, no intuito de proteger a confidencialidade das informações que você irá fornecer. As informações serão codificadas e mantidas em um local reservado o tempo todo. Após o término deste estudo, as informações serão transcritas dos questionários para arquivos em computador e estes serão mantidos arquivados em local reservado. Os dados deste estudo poderão ser discutidos com pesquisadores de outras instituições, mas nenhuma identificação será fornecida.

H) Tratamento e compensação por injúria

Se você apresentar alguma alteração em qualquer dos exames laboratoriais e do exame de endoscopia seu médico endocrinologista irá lhe orientar e você será encaminhado para um gastroenterologista.

Se você sofrer qualquer injúria, como resultado da sua participação neste estudo, ou se acreditar que não tenha sido tratado razoavelmente, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável por este estudo Dr. Natalino Salgado Filho, no serviço de Nefrologia do Hospital Presidente Dutra ou pelo telefone 98 – 2109.1000. Entretanto, a Universidade Federal do Maranhão não prevê nenhuma forma de compensação financeira por possíveis injúrias. Para qualquer outra informação deverá contatar o médico responsável.

I) Questões

Este termo de consentimento explica o projeto de pesquisa. Por favor, leia-o atentamente. Faça perguntas sobre aquilo que não compreender. Se você não tiver perguntas

agora, você poderá fazê-las depois. Durante este estudo, você será comunicado a respeito de qualquer novo fato que possa afetar a sua vontade de permanecer no estudo. Você deverá compreender estas opções antes de assinar este termo. Se você tiver perguntas, você poderá contatar o médico novamente.

Se você concordar a coleta desse material será armazenado no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão e você poderá autorizar a sua utilização em pesquisa futuras, caso o protocolo seja aprovado dentro dos princípios éticos. Ou caso deseje, você optará pela necessidade de ser contatado a cada proposta de estudo, que utilize o material armazenado, para permitir ou não a sua utilização. No final desse documento você poderá escolher uma dessas opções.

Se você tiver alguma pergunta a respeito dos seus direitos como participante deste estudo de pesquisa, você deverá entrar em contato com Prof. Dr. Dorlene M^a Cardoso de Aquino coordenadora do Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos no Hospital Universitário Presidente Dutra, localizado na Rua Barão de Itapary, 227 – São Luís – MA, ou pelo telefone 2109.1223.

J) Consentimento

As informações referentes aos procedimentos estão claras para mim, bem como tenho a garantia de confidencialidade e a certeza de que terei esclarecimentos a qualquer momento se precisar. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento. Ficou claro que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo neste serviço.

() Caso necessário, as minhas amostras armazenadas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão precisem ser utilizadas para pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário.

() Desejo ser contatado para autorizar a utilização ou descarte das mesmas cada vez que seja necessário.

() Neste caso, se no futuro não tiver condições de consentir na utilização ou descarte de meu material biológico, armazenado indico o nome das pessoas abaixo como responsável (s) pelos direitos sobre este material.

Nome e assinatura do(a) paciente

Data

Nome e assinatura do responsável legal/testemunha parcial

Data

pesquisador responsável

Data