



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ARINEY COSTA DE MIRANDA

**ESTUDO DO PERFIL DE PACIENTES SUBMETIDOS A PESQUISA DE
HELICOBACTER PYLORI: ANÁLISE ENDOSCÓPICA E DOS FATORES
DETERMINANTES DA ATIVIDADE LINFOCITÁRIA NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA GÁSTRICA (ROR-Y, FOXP3 E GATA3).**

BELÉM
2015

ARINEY COSTA DE MIRANDA

**ESTUDO DO PERFIL DE PACIENTES SUBMETIDOS A PESQUISA DE
HELICOBACTER PYLORI: ANÁLISE ENDOSCÓPICA E DOS FATORES
DETERMINANTES DA ATIVIDADE LINFOCITÁRIA NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA GÁSTRICA (ROR-Y, FOXP3 E GATA3).**

Tese apresentada à banca examinadora do
Programa de Pós-graduação em Doenças
Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da
Universidade Federal do Pará.
Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões
Quaresma

BELÉM
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NUCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

ARINEY COSTA DE MIRANDA

**ESTUDO DO PERFIL DE PACIENTES SUBMETIDOS A PESQUISA DE
HELICOBACTER PYLORI: ANÁLISE ENDOSCÓPICA E DOS FATORES
DETERMINANTES DA ATIVIDADE LINFOCITÁRIA NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA GÁSTRICA (ROR-Y, FOXP3 E GATA3).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de
Medicina Tropical/UFPA

Aprovada em:

Conceito:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma, NMT - UFPA
(Orientador)

Prof. Dr. João Paulo Mendes Filho, ICS - UFPA

Prof. Dr. Paulo Roberto Alves de Amorim, ICS - UFPA

Prof. Dr. Claudio E. C. Teixeira, NMT- UFPA

Prof. Dr. Ismaelino Mauro Nunes Magno, - CESUPA

DEDICATÓRIA

À minha querida e doce esposa Nádia Costa, companheira dedicada e amiga, sempre disponível em todos os momentos de minha jornada.

Ao meu amado filho Gabriel Costa, minha inesgotável fonte de energia e estímulo.

Aos meus pais Raimundo Ari e Maria Celeste, eterna gratidão e exemplos para condução de minha família.

Aos meus irmãos e irmãs, sobrinhos e sobrinhas, pela convivência diária e alegrias constantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai maior que nos alimenta e fortalece em todos os momentos, fazendo-nos entender o sentido da vida.

Ao Prof. Dr. Juarez A. S. Quaresma, meu orientador e amigo, o qual lançou esse desafio mostrando um novo caminho no universo da pesquisa.

Ao Laboratório de Imunopatologia do NMT-UFPA, pela colaboração e apoio na realização dessa pesquisa.

Ao meu amigo Dr. Cássio Caldato, em sua imensurável contribuição com a realização das endoscopias e coleta das amostras, meus sinceros agradecimentos.

À secretaria da Pós-graduação do NMT-UFPA, em especial à Sra. Socorro Cardoso, pelo carinho e apoio durante esse período.

As alunas de iniciação científica do CESUPA Camila, Corina e Suzanne, pela substancial ajuda na coleta de material para a tese.

À Sra. Vaneza Araújo Vale Monteiro, pelo seu valioso auxílio no trabalho final de formatação, carinho e atenção dispensados, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas de docência, pelo incentivo e apoio constantes.

Aos pacientes que aceitaram participar da pesquisa, assim como todos aqueles não citados que direta ou indiretamente merecem meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O *Helicobacter pylori* é conhecido pela sua capacidade de adaptação ao hospedeiro podendo evoluir para infecção crônica usando mecanismos diversos e eficazes de patogenicidade. Apresenta elevada incidência mundial e sua relação direta com úlcera péptica, gastrite, carcinoma e linfoma gástrico ocorre em uma minoria de indivíduos infectados. O melhor entendimento da regulação gênica da resposta imunológica gástrica, motivou essa pesquisa.

OBJETIVOS: Descrever os fatores de transcrição dos Linfócitos T positivos para ROR- γ , FOXP3 e GATA3, correlacionando-os com a intensidade, tipo e grau de atividade das gastrites, causadas pela infecção do *H. pylori*.

METODOLOGIA: Participaram do estudo 50 pacientes de ambos os sexos, submetidos à endoscopia digestiva alta com biópsia. Teste da urease e estudo histológico foram feitos para identificação e confirmação da infecção pela bactéria. *Trinta e cinco amostras foram encaminhadas para o laboratório de Imunopatologia do NMT-UFPA para estudo de expressão gênica dos fatores de transcrição dos linfócitos T (ROR- γ , FOXP3 e GATA3) pelo método RT-PCR.*

RESULTADOS: Obtivemos 48,5% de pacientes *H. pylori* positivos no teste da urease e 25,7% de *H. pylori* positivos no estudo histológico. A concordância de positividade para o *H. pylori* realizada pelos dois testes ocorreu em 11,7%. Relato de infecção prévia pelo *Helicobacter pylori* foi feito por 22% dos indivíduos da amostra. A idade e gênero dos indivíduos da amostra não influenciaram na expressão gênica dos fatores estudados. Houve maior expressão do gene GATA3 nos indivíduos *H. pylori* positivos, com relato de infecção prévia e que apresentaram gastrite leve erosiva de corpo classificada pelo Sistema Sydney via endoscopia digestiva alta. O gene ROR- γ apresentou-se com expressão aumentada somente ao compararmos amostras com ou sem positividade pelo *H. pylori* (estudo histológico), com a topografia do processo inflamatório evidenciado pela endoscopia. As expressões dos fatores em estudo apresentaram-se com maior significância, quando foi usado o gene constitutivo β -actina como padrão quando comparado com o gene GAPDH.

CONCLUSÕES: 1- A faixa etária adulta analisada em nossa amostra, não influenciou na expressão gênica dos fatores de transcrição estudados. 2- Não houve diferenças encontradas nas expressões dos genes em estudo com relação ao gênero dos indivíduos participantes da amostra. 3- Houve expressão gênica significativa tanto nos pacientes *H. pylori* positivos (análise histológica), como nos pacientes que relataram infecção prévia em nosso estudo. 4- Ao compararmos os achados endoscópicos da amostra, utilizando o Sistema Sydney, com a expressão gênica dos fatores de transcrição em estudo, obtivemos maior concordância somente em relação ao grau de atividade das gastrites. 5- O fator de transcrição GATA3 (perfil de resposta TH2) foi o gene de maior expressão nas amostras com gastrites endoscópicas e com positividade para o *H. pylori*. 6- O fator de transcrição ROR- γ (perfil de resposta TH17) apresentou-se com expressão aumentada ao compararmos as amostras com a topografia do processo inflamatório evidenciado pela endoscopia, independente da positividade pelo *H. pylori* (estudo histológico). 7- O gene da β -actina como gene-padrão constitutivo utilizado em nosso estudo foi o que mais apresentou resultados significativos nas expressões quantificadas, quando comparado com o gene GAPDH.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Helicobacter pylori* is known for its adaptability to the host may progress to chronic infection using diverse and effective mechanisms of pathogenicity. It has high worldwide incidence and its direct relationship with peptic ulcer, gastritis, gastric carcinoma and lymphoma occurs in a minority of infected individuals. A better understanding of the genetic regulation of gastric immune response, motivated this investigation. **OBJECTIVES:** Describe the transcription factors of T lymphocytes positive for ROR- γ , FOXP3 and GATA3, correlating them with the intensity, type and degree of activity of gastritis, caused by *H. pylori* infection **METHODS:** The study included 50 patients of both sexes who underwent upper gastrointestinal endoscopy with biopsy. Urease test and histology were made for identification and confirmation of infection by the bacteria. Thirty-five samples were sent to the immunopathology laboratory NMT-UFPA to study gene expression of transcription factors of T lymphocytes (ROR- γ , FOXP3 and GATA3) by RT-PCR method. **RESULTS:** We obtained 48.5% positive *H. pylori* urease test in patients and 25.7% positive of *H. pylori* in the histological study. The confirmation of *H. pylori* held by these two exams was 11.7%. In this sample, 22% of individuals reported having a previous *Helicobacter pylori* infection. The age and gender of the individuals did not influence the gene expression of the studied factors. The *H. pylori* positive individuals showed a higher expression of the GATA3 gene with prior infection report, and mild erosive gastritis body classified by the Sydney system via endoscopy. The ROR- γ gene presented with increased expression only when comparing samples with or without positive for *H. pylori* (histology), by the topography of the inflammatory process evidenced by endoscopy. The terms of the factors in the study were more significant when we used the β -actin gene as standard when compared to the GAPDH gene. **CONCLUSIONS:** The adult age group analyzed in our sample did not influence the gene expression of the studied transcription factors. 2- There were not found differences in the genes expressions that were studied, related to gender of the sample. 3- There was a significant gene expression not only in the patients that were *H. pylori* positive (histology), but also in the ones who reported previous infection in our study. 4-To compare the endoscopic findings of the sample using the Sydney system with the gene expression of transcription factors under study, we obtained better agreement only in the degree of activity of gastritis. 5- The transcription factor GATA3 (TH2 response profile) was the highest gene expression in samples with endoscopic gastritis and tested positive for *H. pylori*. 6- The transcription factor ROR- γ (TH17 response profile) presented with increased expression when comparing samples with the topography of the inflammatory process evidenced by endoscopy, regardless of positive *H. pylori* (histology). 7- The gene β -actin gene as a constituent standard used in our study was that showed significant results in quantified terms, when compared to the GAPDH gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1- Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA, em amostras submetidas ao teste da UREASE.....	31
GRÁFICO 2 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA, em amostras submetidas ao teste da UREASE.....	32
GRÁFICO 3 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA, em amostras submetidas ao teste da UREASE.....	32
GRÁFICO 4 – Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA, em amostras submetidas ao estudo histológico.....	33
GRÁFICO 5 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA, em amostras submetidas ao estudo histológico.....	34
GRÁFICO 6 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA, em amostras submetidas ao estudo histológico.....	34
GRÁFICO 7 – correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator ROR- γ com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene GAPDH.....	35
GRÁFICO 8 - correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator ROR- γ com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene da β -ACTINA.....	36
GRÁFICO 9 - correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator FOXP3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene GAPDH.....	36
GRÁFICO 10 - correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator FOXP3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene da β -ACTINA.....	37
GRÁFICO 11 - correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator GATA3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene GAPDH.....	37
GRÁFICO 12 - correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator GATA3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene da β -ACTINA.....	38
GRÁFICO 13 – expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA de acordo com o gênero.....	39

GRÁFICO 14 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA de acordo com o gênero.....	39
GRÁFICO 15 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA de acordo com o gênero.....	40
GRÁFICO 16 – expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA em pacientes submetidos ao teste da UREASE e estudo histológico...	41
GRÁFICO 17 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA em pacientes submetidos ao teste da UREASE e estudo histológico...	41
GRÁFICO 18 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA em pacientes submetidos ao teste da UREASE e estudo histológico...	42
GRÁFICO 19 – expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA em pacientes com e sem infecção prévia de <i>H. PYLORI</i>	43
GRÁFICO 20 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA em pacientes com e sem infecção prévia de <i>H. PYLORI</i>	43
GRÁFICO 21 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA em pacientes com e sem infecção prévia de <i>H. PYLORI</i>	44
GRÁFICO 22 – expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto a topografia da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	45
GRÁFICO 23 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto a topografia da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	45
GRÁFICO 24 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA 3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto a topografia da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	46
GRÁFICO 25 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto à categoria da gastrite segundo a classificação do sistema	

SYDNEY.....	47
GRÁFICO 26 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto à categoria da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	47
GRÁFICO 27 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto à categoria da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	48
GRÁFICO 28 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto ao processo inflamatório da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	49
GRÁFICO 29 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto ao processo inflamatório da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	49
GRÁFICO 30 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA quanto ao processo inflamatório da gastrite segundo a classificação do sistema SYDNEY.....	50
GRÁFICO 31 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA nas gastrites classificadas pelo sistema SIDNEY quanto à topografia e positividade ou não do <i>H. PYLORI</i> NAS amostras submetidas ao estudo histológico.....	51
GRÁFICO 32 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA nas gastrites classificadas pelo sistema SIDNEY quanto à topografia e positividade ou não do <i>H. PYLORI</i> das amostras submetidas ao estudo histológico.....	52
GRÁFICO 33 - expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH E β -ACTINA nas gastrites classificadas pelo sistema SIDNEY quanto à topografia e positividade ou não do <i>H. PYLORI</i> nas amostras submetidas ao estudo histológico.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GAPDH – gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase

ACTB – Beta actina

CagA – citotoxina associada ao gene A

VacA - citotoxina vacuolizante A

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

H. pylori - *Helicobacter pylori*

IL - Interleucina

MALT - Mucosa-associated lymphoid tissue

PCR - Reação em cadeia da polymerase

RNA - Ácido Ribonucleico

Th - células Tauxiliares

TRL - receptores toll-like

IBP- Inibidor da bomba de prótons

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	<i>Helicobacter Pylori</i>: histórico, patogênese e aspectos clínicos.....	14
2.2	Resposta imunológica específica ao <i>H. Pylori</i>, Linfócitos T e seus fatores de transcrição.....	17
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Geral.....	23
3.2	Específicos.....	23
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
4.1	Critérios de Inclusão.....	24
4.2	Critérios de Exclusão.....	24
4.3	Endoscopia Digestiva Alta e coleta de material – aspectos técnicos.....	25
4.4	Biologia Molecular.....	26
5	Quantificação dos fatores de transcrição para os perfis de resposta imunológica e periférica Do Tipo TH2, TH17 e TREG.	27
5	ANÁLISE DOS DADOS.....	29
6	RESULTADOS.....	30
6.1	Características da amostra.....	30
6.2	Achados Endoscópicos dos pacientes na amostra classificados pelo Sistema Sydney.....	30
6.3	Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR-γ, FOXP3 e GATA3 nas amostras analisadas para presença de <i>H. Pylori</i> pelo teste da Urease.....	31
6.4	Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR-γ, FOXP3 e GATA3 nas amostras analisadas para presença de <i>H. Pylori</i> pelo estudo histológico.....	33
6.5	Correlação linear entre a expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR-γ, FOXP3 e GATA3 das amostras e a idade dos	

pacientes.....	35
6.6 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 das amostras e o gênero dos pacientes	38
6.7 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 das amostras submetidas aos testes da urease e ao estudo histológico, entre pacientes positivos e negativos para o <i>H. pylori</i>	40
6.8 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 em amostras de pacientes <i>H. pylori</i> positivos e negativos identificados pelo estudo histológico com o relato de infecção prévia.....	42
6.9 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia.....	44
6.10 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOX P3 e GATA3 nas gastrites classificadas pelo sistema sidney quanto à categoria.....	46
6.11 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto ao grau de atividade do processo inflamatório.....	48
6.12 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3, nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia e a positividade ou não do <i>H. pylori</i> nas amostras submetidas ao estudo histológico.....	50
7 DISCUSSÃO.....	53
8 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	65
ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A descoberta do *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) nos anos oitenta, sua elevada taxa mundial de infecção, exigindo medidas simples, porém de difícil implantação nos diversos países com diferentes graus de desenvolvimento, sua relação direta com várias enfermidades do trato digestório e principalmente sua classificação como carcinógeno do Tipo I, tem estimulado diversos estudos sobre o assunto nas últimas décadas. Os meios utilizados pelo patógeno para manter-se adaptado ao seu hospedeiro no nicho gástrico, assim como os mecanismos de respostas imunológicas consequentes, tem exigido constante busca entre os pesquisadores para a melhor compreensão e controle desta infecção, que atualmente compromete, em média, metade da população mundial.

Apresentaremos a seguir em nossa proposta de trabalho os pontos que consideramos relevantes, com escopo no estudo da resposta imune adaptativa do hospedeiro em resposta ao patógeno *H. pylori*, buscando melhor entendimento dos fatores de transcrição dos linfócitos T presentes na resposta inflamatória induzida por este agente identificados por biologia molecular, com material coletado por biópsia gástrica de indivíduos infectados com ou sem lesões teciduais instaladas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Helicobacter Pylori*: histórico, patogênese e aspectos clínicos

A partir da década de 80, os resultados apresentados pelos médicos australianos Marshall e Warren (1984) modificaram a linha de entendimento dos pesquisadores em relação à presença de bactérias na luz gástrica. Revisando a literatura da época esses dois médicos encontraram relatos sobre o assunto em várias décadas anteriores, contudo sem dados consistentes. A parceria entre eles, persistência e seriedade de suas pesquisas, os levaram a explorar o significado das bactérias espiraladas reunindo material clínico e cultivando o microrganismo de mucosa gástrica obtido através de exames endoscópicos (WEYDEN; ARMSTRONG; GREGORY, 2005; DUNN; COHEN; BLASER, 1997).

Inicialmente, partindo de 100 pacientes no ano de 1981, Warren e Marshall iniciaram um estudo com o qual puderam demonstrar a presença de bactérias espiraladas ou curvas, com papel importante na patogenia da gastrite e da úlcera péptica (Marshall, 1983). A partir desta década, o *H. pylori* passou a ser o foco de vários e extensos estudos (COELHO; ZATERKA, 2005). Marshall e Warren (1984) romperam barreiras preestabelecidas na comunidade médica e, com persistência unida ao recurso técnico do endoscópio de fibra ótica, isolaram o microrganismo da mucosa de estômagos humanos e cultivaram esta bactéria com sucesso, levando a afirmar que os casos de gastrites e úlceras gástricas eram causados por colonização da mucosa gástrica pelo agente *H.pylori* e não por estresse, como proposto anteriormente por outros pesquisadores.

Em reconhecimento ao trabalho de Marshall e Warren, foi atribuído a eles no ano de 2005, o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia (GUZMÁN, 2006; WEYDEN; ARMSTRONG; GREGORY, 2005).

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa que coloniza a mucosa gástrica e passou a ser conhecida, com já citado, após o advento da endoscopia. Este microrganismo pode causar úlcera péptica, gastrite, carcinoma e linfoma gástrico em uma minoria de indivíduos infectados. Trata-se de uma bactéria, ligeiramente espiralada ou encurvada, de superfície lisa e extremidades arredondadas, mede aproximadamente entre 0,5_μm e 0,1_μm de largura, e 5,0_μm de comprimento, contém de quatro a seis flagelos unipolares embainhados, em forma de hélices e bulbos

terminais nas extremidades lisas, essenciais para a motilidade bacteriana. Cada flagelo possui aproximadamente 30 nm de comprimento e 2,5 nm de espessura (MARSHALL, 1994; WALKER; LOGAN, 2001).

A prevalência da bactéria estimada em todo o mundo é de aproximadamente 50%, atingindo valores superiores a 80% em países subdesenvolvidos (SOUTO et al, 1998; GOODWIN et al, 1989). O risco de infecção está aumentado em grupos socioeconômicos mais baixos, nas idades mais jovens, conforme estudos com soro positividade. Por esse motivo, não é possível assegurar clinicamente quando a infecção ocorreu, a maioria das informações geográficas e demográficas são taxas e estudos de soro-prevalência. Encontra-se o *H. pylori* nos cinco continentes sendo portanto considerado importante problema de saúde pública (BROWN, 2000).

Os quadros de infecção pelo *H. pylori* com presença de lesão celular, processo regenerativo e infiltrado inflamatório da mucosa gástrica, acrescida da presença de folículos linfóides, caracterizam as gastrites (CARPENTER; TALLEY, 2000). A designação de Gastropatia deve ser dada às outras causas de dano celular na mucosa gástrica, principalmente isquêmico, tendo o álcool, drogas anti-inflamatórias e refluxo biliar como agentes, porém, sem a presença de um agente infeccioso que estimule a resposta inflamatória (ROCHA et al, 1998).

O grande desafio na atualidade é identificar quais seriam as cepas do *H. pylori* com alta patogenicidade. Na verdade, o desenvolvimento da doença parece depender dos fatores agressivos da bactéria aliados aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Alguns fatores de virulência são comuns a todas as cepas de *H. Pylori* como colonização e persistência da bactéria, com associação direta a variados graus de dano celular. Porém, certos fatores de virulência são variáveis entre as cepas, o que pode justificar as diferenças de manifestações clínicas. Os dois mais importantes reconhecidos, até o momento, são as presenças do gene CagA (citotoxina associada ao gene A) e VacA (citotoxina vacuolizante A). Na verdade o gene CagA é um importante marcador da presença da "ilha de patogenicidade" que contém uma série de códigos (genes) que induzem à síntese de IL-8 na mucosa gástrica, uma citocina importante no recrutamento de células inflamatórias que levariam à agressão da mucosa e dano celular (CENSINI et al, 1996).

O outro fator de virulência, o gene VacA, expressa uma proteína capaz de

induzir vacuolização em células eucariotas in vitro. Apesar de todas as cepas possuírem a sequência gênica *VacA*, nem todas as cepas apresentam atividade vacuolizante. O estudo da sequência do DNA demonstrou diferenças entre as cepas. Identificaram-se umas produtoras de toxinas, chamadas de **s1**, e outras cepas não produtoras de toxinas, denominadas de **s2**. Ainda entre as cepas **s1**, as que produziam toxina em altos níveis apresentavam diferenças na sequência de aminoácidos e foram chamadas de **s1a** e as produtoras de toxina em baixos níveis, de **s1b** (ATHERTON et al, 1995).

As gastrites agudas associadas ao *H. pylori* são de difícil detecção ao exame endoscópico, uma vez que o diagnóstico clínico é infrequente e a correlação sintomatológica pobre. A gastrite crônica, que durante décadas pode permanecer em silêncio, devido ao equilíbrio dinâmico entre a bactéria e seu hospedeiro, ou evoluir para doenças mais graves, tais como gastrite atrófica, úlcera péptica, linfoma associado à mucosa gástrica ou adenocarcinoma, é mais detectada (ZARRILLI; RICCI; ROMANO, 1999). O aspecto histológico relevante é o infiltrado inflamatório, que é primariamente crônico, isto é, composto por linfócitos e plasmócitos. Entretanto, tal infiltrado pode ter um componente agudo variável, constituído por neutrófilos, que determinam o grau de atividade do processo inflamatório, e sua intensidade é normalmente proporcional à densidade do *H. pylori*. A presença de folículos linfóides, ocupando a porção mais profunda da lâmina própria, exibindo evidentes centros germinativos ou limitados a adensamentos linfóides, está frequentemente presente nas gastrites por *H. pylori* (DINOX et al, 1996; GENTA; HAMNER; GRAHAM, 1993; WHITERHEAD, 1995). O resultado da infecção pelo *H. pylori* não é influenciado apenas pela sua intensidade, mas principalmente pela resposta inflamatória da mucosa gástrica do indivíduo (CORREA; PIAZUELO; CAMARGO, 2004; PEEK; BLASER, 2002; RICCI; ROMANO; BOQUET, 2011).

A gastrite induzida por esta bactéria depende da severidade da infecção e da distribuição anatômica do patógeno. Indivíduos com gastrite predominantemente no corpo (fenótipo do câncer gástrico) são mais propensos a desenvolver hipercloridria, atrofia gástrica e, eventualmente, câncer gástrico. Aqueles com predominância da gastrite antral (fenótipo da úlcera duodenal) têm secreção ácida excessiva e maior propensão a desenvolver úlcera duodenal. Por fim, os com

gastrite mista branda de antro e corpo (fenótipo de gastrite benigna) têm secreção ácida quase normal. Estes fenótipos são quase totalmente excludentes e altamente influenciados por uma resposta inflamatória da mucosa gástrica geneticamente regulada pelo hospedeiro (RICCI; ROMANO; BOQUET, 2011).

2.2 Resposta imunológica específica ao *H. Pylori*, Linfócitos T e seus fatores de transcrição

As células gástricas epiteliais são o primeiro alvo da infecção por *H. pylori* e contribuem ativamente para o sistema imune inato por sinalização mediada por receptores Toll-like. LPS é o ligante bacteriano clássico de TLR4, mas os LPS derivados de *H. pylori* demonstram sinalização pelo TLR2 e baixa afinidade pelo TLR4, sendo este um mecanismo de evasão bacteriana. Como citado, o LPS do *H. pylori* induz uma resposta imune mais fraca que seus homônimos de outras bactérias. Outro mecanismo de evasão sugerido é a inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos (SZABO et al, 2000).

Mecanismos imunes inatos encontrados em células eucarióticas modernas são altamente complexos, a despeito de serem formados por estratégias moleculares comuns. A evolução selecionou um conjunto de peptídeos antimicrobiais e receptores reconhedores de patógenos (PRRs) que iniciam sinalizações celulares como primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Similarmente, patógenos microbiais empregam suas próprias estratégias para evadir, inibir ou manipular esta resposta imune inata. (REDDICK; ALTO, 2000).

Em resposta específica ao patógeno encontrado, as células apresentadoras de antígeno produzem sinais que orientam a diferenciação de uma célula Th em uma linhagem específica. Nesta conjuntura, os fatores de transcrição determinantes para a diferenciação em linhagens Th1, Th2 e Th17 são, respectivamente, T-box expresso em células T (T-bet), GATA-3 e retinoid-related orphan receptor γ (ROR γ t) (IVANOV et al, 2006).

Embora o mecanismo exato para a polarização de um perfil Th1 ou Th2 ainda não tenha sido esclarecido, a produção precoce de IFN- γ , IFN- α , ou IL-12 pelo sistema imune inato conduz a uma diferenciação Th1. Em contrapartida, na

ausência de IL-12, a produção inicial de IL-4 impulsiona a linhagem Th2 (EATON; MEFFORD; THEVENOT, 2001).

A predominância de uma resposta Th1 também é indicada pela expressão aumentada do fator T-bet (T-box expresso em células T) e pela supressão dos níveis de GATA-3 (EATON; MEFFORD; THEVENOT, 2001). O primeiro direciona a uma resposta Th1, marcada pelo INF- γ e apresenta correlação direta com a sua expressão (SZABO et al, 2000). Diferentemente, GATA3 é considerado o principal condutor ao perfil Th2 e agente crucial para anular diferenciação Th1 e produção de INF- γ (EATON; MEFFORD; THEVENOT, 2001; ZHENG; FLAVELL, 1997; YAGI; ZHU; PAUL, 2011).

O Fator Nuclear de Transcrição FoxP3 é um elemento chave ao desenvolvimento e função das células T reguladoras (células Treg) CD4⁺ [36]. Trata-se do marcador mais específico da atividade Treg, tendo sua expressão correlacionada à capacidade de supressão. Em humanos, é intensamente expresso em células T CD4 + CD25 high e em baixos níveis em células T CD4 + ativadas, embora sua expressão tenha sido observada em uma pequena fração do CD25-, CD25 intermediate, e subconjuntos de células T CD8 + (LORENZI; BARBOSA-LARENZI; ZANETTE, 2012).

Neste ponto, destaca-se a interação entre células Treg e Th17, mais especificamente, entre FOXP3 e ROR γ (retinoid-related orphan receptor γ). Trata-se, na verdade, de um equilíbrio entre FOXP3 e ROR γ (mais especificamente ROR γ t) e a sua regulação por citocinas, conduzindo à diferenciação celular em Treg ou Th17 de acordo com fatores negativos e positivos que favorecem determinada linhagem (BORLACE et al, 2012). Uma questão que igualmente destaca a importância do ROR γ na atividade imune do hospedeiro é a sua participação vital na organogênese de linfonodos e no desenvolvimento da placa de Peyer, visto que em sua ausência ambas as estruturas não se desenvolvem (GENTA; HAMNER; GRAHAM, 1993).

É amplamente aceito que a infecção por *H. pylori* conduz a uma resposta predominantemente Th1 e que a inflamação gástrica depende grandemente de uma resposta Th1 com elevada produção de IL-1 β , TNF- α e IL-8, a qual não obtém êxito em eliminar o agente e pode ocasionar patologias severas (ZHANG et al., 1997). Um

novo subtipo secretor de IL-17 foi identificado como Th17, que é distinto das Th1 e Th2 em suas funções e diferenciação. Recentemente, foi sugerido que a infecção por *H. pylori* leva a uma resposta TH17/Th1 e que isto promove a inflamação mucosa e contribui para colonização bacteriana, sendo corroborado pela redução destes processos quando do bloqueio da atividade Th17 em ratos (RICCI; ROMANO; BOQUET, 2011).

É provável que a via Th17 module a resposta celular Th1 e que ambas trabalhem sinergicamente para induzir à gastrite durante uma infecção por *H. pylori* ao recrutar células inflamatórias (RICCI; ROMANO; BOQUET, 2011). Outro progresso no entendimento da resposta Th17 é a mobilidade bacteriana ligada à resposta Th17. A deficiência em recrutar células T CD4+ e ausência de resposta Th17 foi demonstrada em experimentos com ratos onde o *H. pylori*, então, apresentava reduzida mobilidade, mas ainda com capacidade de colonização (D'ELIOS; CZINN, 2014).

Em estudo realizado por Lundgren e colaboradores (2005), no qual dois grupos foram comparados após análise de biópsias do antro gástrico e do duodeno de pacientes assintomáticos com diagnóstico de infecção por *H. pylori* com gastrite crônica moderada e de pacientes não infectados pela bactéria e sem sinais de gastrite que serviram como grupo controle, foi identificado em indivíduos positivos para infecção por *H. Pylori* que 60% das células T CD3+ eram CD4+, enquanto que apenas 30% dessas células foram T CD4+ em indivíduos não infectados pelo *H. pylori*. Foi demonstrado também, que as frequências de células CD25high entre as células CD4+, tanto do antro quanto no duodeno foram aumentadas de três a quatro vezes, em indivíduos infectados com *H. pylori* em relação a indivíduos não infectados, enquanto que a proporção de células CD4+ CD25high foi semelhante no sangue para os dois grupos de estudo. Além disso, os autores concluíram também, em continuidade ao estudo desses subtipos celulares, que o fator de transcrição FOXP3 é um marcador específico desses linfócitos T reguladores (LORENZI; BARBOSA-LARENZI; ZANETTE, 2012).

Podemos citar outro estudo experimental, seguindo essa linha de imunopatogênese, publicado em 2001, em que foi infectado determinado grupo de camundongos por *H. pylori* e estudada a resposta de hipersensibilidade tardia após

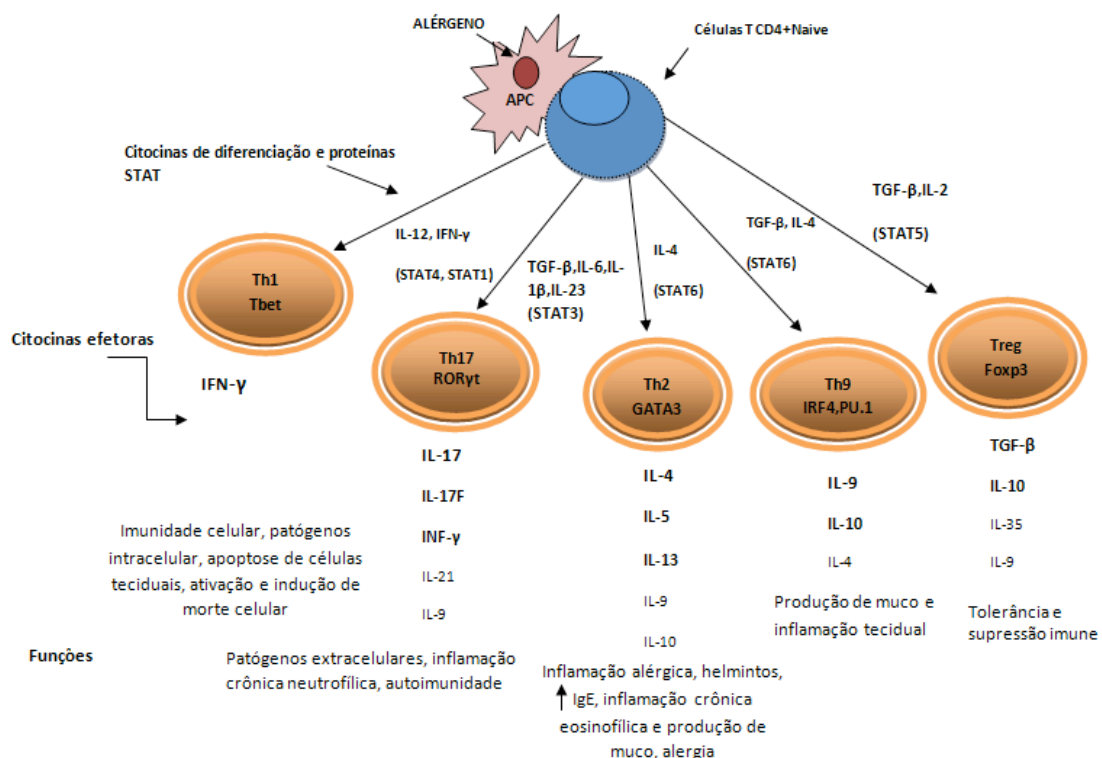
a injeção de linfócitos CD4⁺ de vários subtipos retirados do baço de outra linhagem de camundongos. A principal conclusão desses autores, após análise de seus resultados quanto os subtipos celulares presentes, quanto ao efeito dessa resposta sobre a gastrite induzida nesses animais, assim como das citocinas secretadas, após quatro a oito semanas de condução do estudo, foi que a resposta imune mediada pela infecção causada pelo *H. Pylori*, é do tipo Th1 (EATON; MEFFORD; THEVENOT, 2001).

Estudos já haviam relatado a ação das células CD4⁺CD25⁺ e, conseqüentemente, do FOXP3 em suprimir a resposta imune do hospedeiro ao *H. pylori* (DIXON et al, 1996; WHITEDEAD, 1995; BRITO, 1999). Segundo trabalho publicado por Jang (2010), gastrites associadas ao *H. pylori* expressam níveis elevados de FOXP3, apresentando correlação direta ao grau de inflamação crônica e ao número de folículos linfóides (BRITO, 1999) Recentemente, em outro estudo foi constatado que não só os níveis deste fator estavam elevados na mucosa afetada, como também tal aumento era progressivo de acordo com a severidade do acometimento, ao comparar a análise de uma população saudável com pacientes portadores de gastrite, ulcera péptica e câncer gástrico (CARPENTER; TALLEY, 1995).

A atividade Th-17, marcada pela secreção de IL-17, foi reconhecida no processo infeccioso por *H. pylori* na mucosa gástrica (BRITO, 1999), e está associada ao recrutamento e ativação neutrofílica mediada por citocinas (COELHO et al, 1996). Alguns estudos demonstraram que a infecção por bactéria estimula atividade Th17/IL-17 a qual, inesperadamente, não favorece a defesa do hospedeiro. Esses trabalhos demonstraram que o clearance bacteriano e a redução da inflamação são favorecidas pela neutralização da IL-17 e que a susceptibilidade do hospedeiro ao patógeno pode estar aumentada devido à elevada atividade TH17/IL-17 (EVANS et al, 1998). Dados semelhantes foram obtidos em demais estudos nos quais o aumento de IL-17 estava associado a maior inflamação na mucosa gástrica e cooperava para a permanência da bactéria (PEREZ-PEREZ et al, 2005; KAPARAKIS, 2006 42, 49). Hafsi e colaboradores (2004) observaram elevada atividade T-bet e baixa expressão GATA-3 em células T co-cultivadas com apresentação de *H. pylori*, comparadas às cultivadas sem tal apresentação. Os

autores chamaram atenção para o fato de que este resultado foi observado com maior intensidade em células T estimuladas pela membrana do patógeno do que sob estímulo do citosol, sugerindo que a natureza da resposta Th1 poderia ser impulsionada pelas proteínas expostas da membrana. A reação proporcionada pela membrana ou pelo citosol do *H. pylori* não apresentou influência na expressão de GATA-3 quando comparado à reação gerada pela bactéria intacta (ZHENG; FLAVELL, 1997).

Na figura abaixo, o esquema representa a diferenciação de células T naive após estimulação por alérgeno, o estado das células e o microambiente. As células T naive se diferenciam entre células T helper de diferentes subtipos, sendo eles Th1, Th2, Th17, Treg e Th9. Cada um destes subtipos tem fatores de transcrição e STATs específicos para seu destino de diferenciação, bem como suas respectivas citocinas efetoras e suas funções (Figura 1).



Fonte: ARAÚJO, 2013

Pelo exposto anteriormente, justificamos nossa pesquisa pela real necessidade de aumentarmos o conhecimento da regulação da resposta

imunológica do hospedeiro em relação ao *H. pylori* no ambiente intracelular, com foco nos fatores de transcrição dos linfócitos T.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Descrever os fatores de transcrição dos Linfócitos T positivos para, ROR-Y e FOXP3 e GATA3, correlacionando-os com a intensidade, tipo e grau de atividade das gastrites, causadas pela infecção do *H. pylori*.

3.2 Específicos

- Comparar a expressão dos fatores de transcrição dos linfócitos T (ROR-Y, FOXP3 E GATA3) com características clínicas da amostra e com os achados endoscópicos dos pacientes infectados ou não pelo *H. pylori*
- Descrever os principais achados endoscópicos dos pacientes *H. pylori* positivos e negativos na amostra estudada.
- Identificar as respostas celulares TH17 , TREG e TH2, pela identificação de seus respectivos fatores de transcrição ROR-Y, FOXP3 E GATA3.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Realizou-se um estudo Transversal, com consentimento permitido via TCLE, com material coletado em clínica particular localizado na cidade de Belém do Pará (UNIGASTRO), partindo de cinquenta pacientes de ambos os sexos com indicação clínica para serem submetidos à endoscopia digestiva alta e biópsia gástrica e que preencheram os critérios de inclusão. Os procedimentos foram executados por um profissional endoscopista experiente, seguindo protocolo descrito a seguir, somente após submissão e aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP e comitê de ética para análise de projetos de pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical - UFPA (Parecer: 576.418).

4.1 Critérios de Inclusão:

- 1- Indicação clínica para serem submetidos à endoscopia digestiva alta e biópsia gástrica
- 2- Presença de gastrite endoscópica- Classificação de Sydney Modificada
- 3- Idade igual ou maior que 18 anos
- 4- Concordância em participar do estudo (TCLE)

4.2 Critérios de Exclusão:

- 1- Uso de antibióticos, imunoterápicos, inibidores da bomba de prótons ou bloqueadores dos receptores H₂ nos 30 dias que antecedem a realização do estudo
- 2- Pacientes com endoscopia digestiva alta considerada normal
- 3- Pacientes que, a critério do médico investigador, não tiveram condições físicas ou mentais de participação no estudo

4.3 Endoscopia Digestiva Alta e coleta de material – aspectos técnicos:

Após jejum de pelo menos 8 horas, os pacientes receberam solução de Dimeticona na dose de 40 gotas diluídos em 10 ml de água, dez minutos antes do exame endoscópico. Foi feita anestesia tópica da faringe com Cloridrato de Xilocaína Spray a 10% na dose máxima de 100mg.

A sedação foi realizada com solução de Midazolan e Fentanil por via endovenosa, administrados separadamente e de forma progressiva até atingir níveis adequados de relaxamento e sedação.

Os pacientes foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o aparelho foi introduzido sob visão direta analisando-se esôfago, estômago e duodeno, até a segunda porção, com avaliação da forma, distensibilidade e aspecto da mucosa com posterior descrição dos achados endoscópicos.

A detecção do *H. pylori* foi realizada pelo teste rápido da Urease (Renilab®), imediatamente ao término da endoscopia a partir de fragmentos de biópsias gástricas, obtidas da região de antro e corpo (3 amostras de cada). Demais fragmentos coletados foram colocados em frascos-padrão e encaminhados para análise histopatológica.

As gastrites endoscópicas foram classificadas de acordo com classificação de Sydney modificada (**TABELA 1**)

TABELA 1- Classificação endoscópica de gastrites: Sistema SYDNEY

TOPOGRAFIA	CATEGORIA	GRAU DE ATIVIDADE
PANGASTRITE	ENANTEMATOSA	LEVE
GASTRITE DO ANTRO	EROSIVA PLANA	MODERADA
GASTRITE DO CORPO	EROSIVA ELEVADA	INTENSA
	ATRÓFICA	
	HEMORRÁGICA	
	REFLUXO	
	PREGAS MUCOSAS	
	HIPERPLÁSICAS	

Fonte: DIXON et al, 1996

4.4 Biologia Molecular

Isolamento e quantificação do RNA

De cada paciente, o RNA total, foi extraído de fragmentos de biopsia gástrica, sendo maceradas utilizando nitrogênio líquido. A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. Em microtubo de 1,5mL, foram acrescentadas às biopsias maceradas 1000µl de Trizol (Trizol[®] Reagent – Invitrogen) e 200µl de clorofórmio (Merk) a cada tubo. Após homogeneização por 2 minutos em Agitador Vortex Quimis, o conteúdo foi centrifugado na centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R a 12.000 rpm por 10 minutos a 6^oC. Após este período, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro microtubo de 1,5mL, contendo 500µl de isopropanol (Merk) e em seguida homogeneizado manualmente. Este microtubo foi armazenado em refrigerador a -20^oC para precipitação por um período de 24 horas. Decorrido este período, uma nova centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos a 6^oC, foi realizada. Após centrifugação, foi retirado o sobrenadante, restando o pellete de RNA no lado e no fundo do tubo, e a este RNA precipitado foi acrescentado 1000µl de etanol 70% (Merk) em água DEPC (dietil pirocarbonato) onde foi centrifugado a 12.000 rpm, por 20 minutos a 6^oC, para ser realizada a lavagem do RNA posterior. Após esta lavagem, o pellete de RNA foi desidratado por evaporação a 37^oC, e diluído em 30µL de água DEPC.

A análise de qualidade do RNA foi realizada em gel de agarose e formaldeído. Neste gel pode-se avaliar a contaminação por DNA genômico, assim como, verificar se ocorreu degradação da amostra. No gel deverão estar presentes duas bandas, 28S e 18S, sendo que a banda de 28S deve estar mais intensa que a de 18S. A ocorrência de outra banda, de tamanho superior a de 28S, denota contaminação por DNA genômico. Neste caso a amostra deverá ser submetida à re-extração por Trizol.

Após este procedimento, as amostras foram quantificadas utilizando o equipamento Invitrogen Qubit[®] Fluorometer e o Q32852 Quant-iT RNA Assay Kit, 100 assays *5-100ng* (250pg/µL-100ng/µL) para a leitura das amostras, seguindo as instruções do fabricante.

Síntese de cDNA

A transcrição reversa das amostras foi realizada para a obtenção do cDNA a ser utilizado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Deste modo, neste procedimento foi realizado utilizando o kit Superscript III (Superscript® III Reverse Transcriptase – Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Na reação foram acrescentados 1mg da amostra de RNA de cada paciente (previamente quantificadas), oligo dT 500 pmol/mL e dNTP a 10mM, com volume final de 13ml. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler) e transferida imediatamente para o gelo. Foram adicionados, então, tampão 5x (first strand buffer), DTT (ditiotreitól) 10mM, MgCl₂ a 50mM e Super script III 10.000U – 200U/ml, com volume final de 20 ml, levando-se a reação a 50°C por 50 minutos. Depois a enzima foi inativada, aquecendo-se a solução a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação, em cada amostra, foi acrescentado 10ml de água destilada ultra pura Gibco (Invitrogen), totalizando um volume final de 30ml.

4.5 Quantificação dos fatores de transcrição para os perfis de resposta imunológica e periférica Do Tipo TH2, TH17 e TREG

No presente estudo, foi realizada a quantificação relativa. Para a detecção dos amplicons foi utilizado o agente fluorescente Sybr Green. As amostras foram feitas em duplicata.

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para as reações de RT-PCR foram *primers* para o fator de transcrição Gata3 que é característico para o perfil de resposta imunológica do tipo Th2, *primers* para o fator de transcrição ROR-γ que é característico para o perfil de resposta para as células TH 17 e *primers* para o fator de transcrição Foxp3 que é característico para o perfil de resposta imunológica para as células Treg.

A reação de RT-PCR foi realizada no StepOne Plus (Real Time PCR Systems - Applied Biosystems) com o reagente Sybr Green (Applied Biosystems). A partir da reação de transcrição reversa, foi utilizado cDNA, SYBR Green pcr master mix (2x), primers (18uM) sentido e reverso, e água Milli Q autoclavada qsp 20ml.

Após um período de 10 minutos a 50°C para ativação da enzima e desnaturação de 5 minutos a 95°C, foram executados 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle da especificidade da reação.

Os resultados foram analisados pelo StepOne™ Software v2.0. Para a quantificação relativa foi realizado o seguinte cálculo: inicialmente determinou-se o cycle threshold (CT), dado pelo número do ciclo em que o sinal de fluorescência atingiu a linha limiar (threshold line), ou seja, a linha em que a emissão de fluorescência esteve acima do ruído de fundo (background). O CT encontra-se invariavelmente na região correspondente à fase exponencial da amplificação, o que torna mais acurada a estimativa de quantificação dos transcritos na amostra original. Os valores de CT dos genes de interesse foram normalizados em relação ao CT dos genes constitutivos, o GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e a β -actina, resultando o Δ CT, que é o $CT_{\text{gene}} - CT_{\text{constitutivo}}$. Por fim, foi calculado o $2^{-\Delta CT}$, sendo este o valor trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene.

5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos durante os experimentos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL e analisadas utilizando o Intervalo de Confiança das médias ao nível de 95% (95% IC) e o teste de correlação linear de Pearson. As representações gráficas utilizadas foram gráficos de colunas simples e diagramas de dispersão.

6 RESULTADOS

6.1 Características da amostra

A amostra foi constituída por 50 pacientes com idades entre 18 e 68 anos e média de 42,2 anos, sendo que 29 (58,0 %) pacientes eram do sexo feminino e 21 (42,0 %) pacientes eram do sexo masculino. Desse total 35 pacientes foram submetidos ao teste rápido da urease e exame histológico para identificação dos indivíduos *H. pylori* positivos e negativos. Obtivemos no teste da urease 17 (48,5%) pacientes urease positivos e 18 (51,4%) urease negativos. A análise histológica revelou 26 (74,2%) pacientes negativos e 9 (25,7%) pacientes positivos para o *H. pylori*. Positividade para o *H. pylori* no teste da urease e estudo histológico ocorreu em nossa amostra em 4 (11,7%) pacientes. O relato de infecção prévia para esta bactéria no total da amostra foi obtido em 11 (22%) pacientes, contra 39 (78,4%) sem relato de infecção.

6.2 Achados Endoscópicos dos pacientes na amostra classificados pelo Sistema Sydney

Na amostra os achados endoscópicos classificados pelo Sistema Sydney foram: Quanto à topografia, pangastrite em 20 (40,0%) pacientes, gastrite de antro em 19 (38,0%) pacientes e gastrite de corpo gástrico em 11 (22,0%) pacientes. Quanto à categoria, enantematosa leve em 44 (88,0%) pacientes e erosiva plana em 6 (12,0%) pacientes. Quanto ao grau de atividade, leve em 41 (82,0%) pacientes e moderada em 9 (18,0%) pacientes.

6.3 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 nas amostras analisadas para presença de *H. Pylori* pelo teste da Urease

Utilizou-se *primers* específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ , FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico, realizadas por endoscopia digestiva alta com imediata submissão ao teste da Urease. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. Não observamos diferença na expressão desses genes nas amostras, como mostram os intervalos de confiança de 95% das médias de expressão.

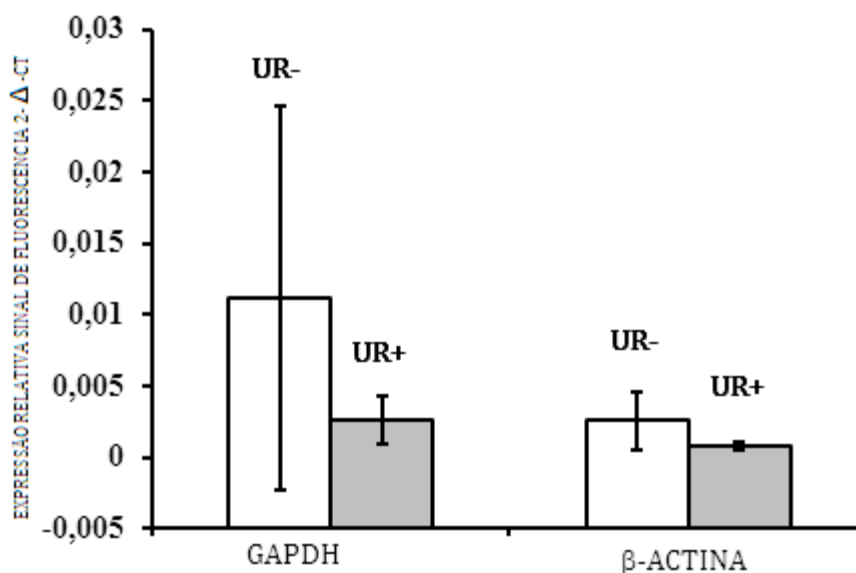


Gráfico 34- Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina, em amostras submetidas ao teste da UREASE.

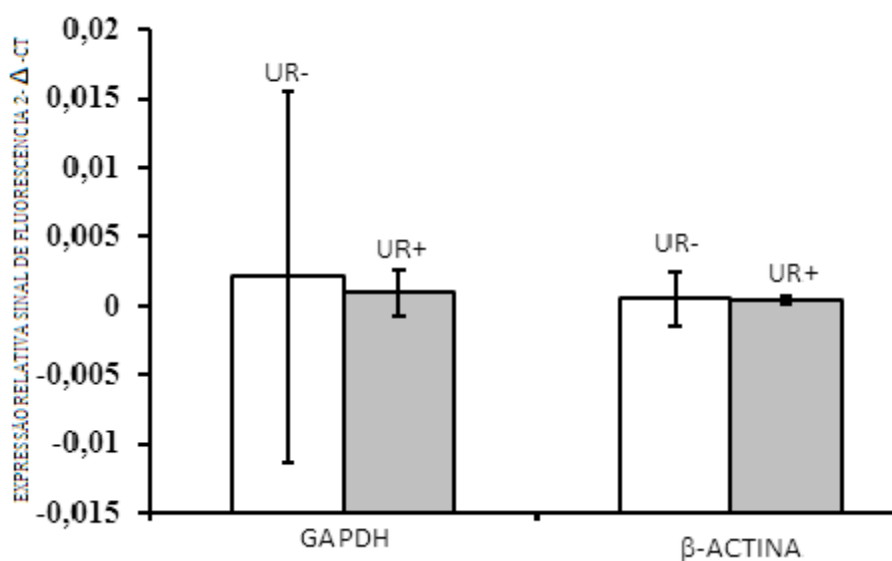


Gráfico 35 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina, em amostras submetidas ao teste da UREASE.

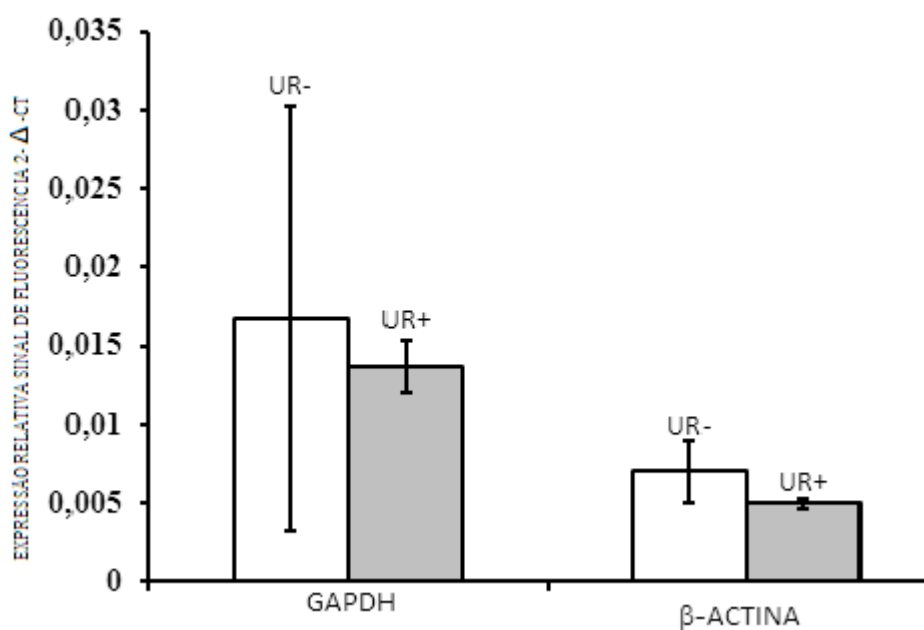


Gráfico 36 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina, em amostras submetidas ao teste da UREASE.

6.4 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 nas amostras analisadas para presença de *H. Pylori* pelo estudo histológico

Utilizou-se **primers** específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico, realizadas por endoscopia digestiva alta e enviadas para estudo histológico. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. Observou-se maior expressão gênica do fator GATA3 nas amostras dos indivíduos positivos para *H. Pylori* em comparação com as amostras dos indivíduos negativos para *H. pylori*, como mostram os intervalos de confiança de 95% das médias de expressão. Esta diferença não foi encontrada quando utilizamos o GAPDH como padrão de expressão gênica. (Gráficos 4-6).

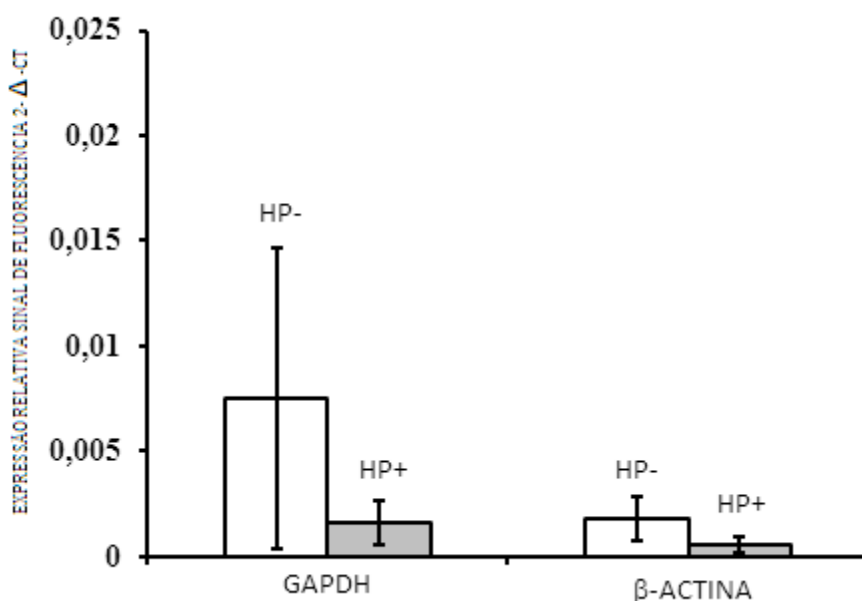


Gráfico 37 – Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina, em amostras submetidas ao estudo histológico.

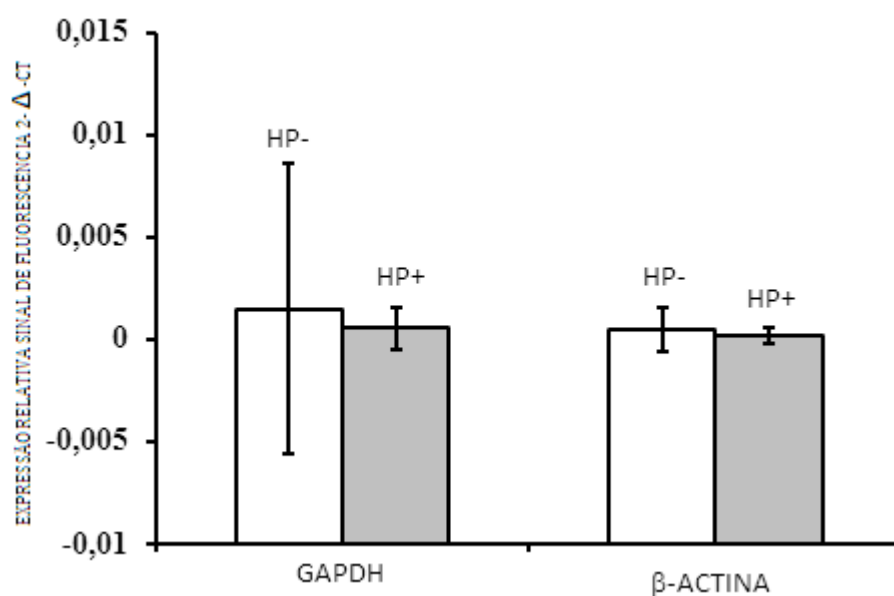


Gráfico 5 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β-actina, em amostras submetidas ao estudo histológico.

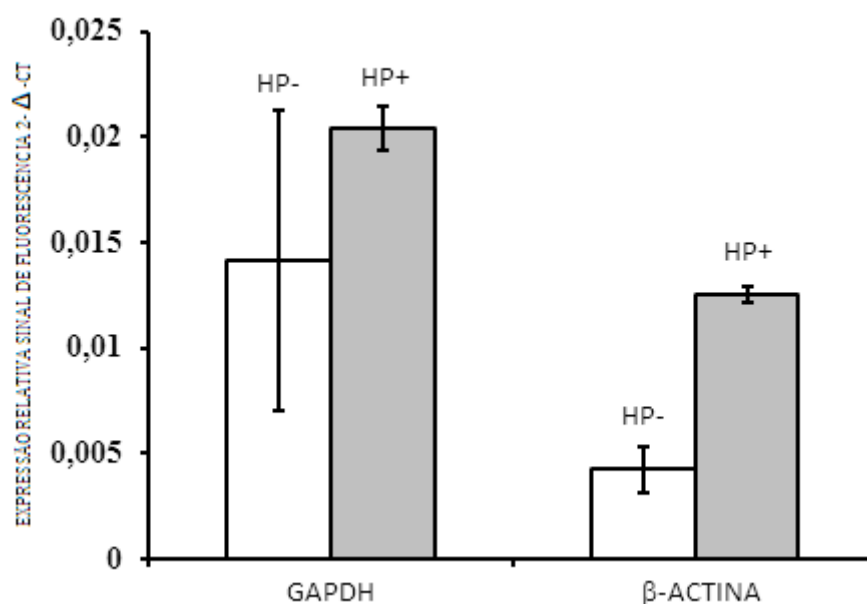


Gráfico 38 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β-actina, em amostras submetidas ao estudo histológico.

6.5 Correlação linear entre a expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 das amostras e a idade dos pacientes.

Utilizou-se *primers* específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ , FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Realizamos correlação desses dados com a idade dos pacientes. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. Não observou-se correlação significativa entre a idade dos indivíduos e a expressão dos genes em estudo ($r \approx 0$) (Gráficos 7-12).

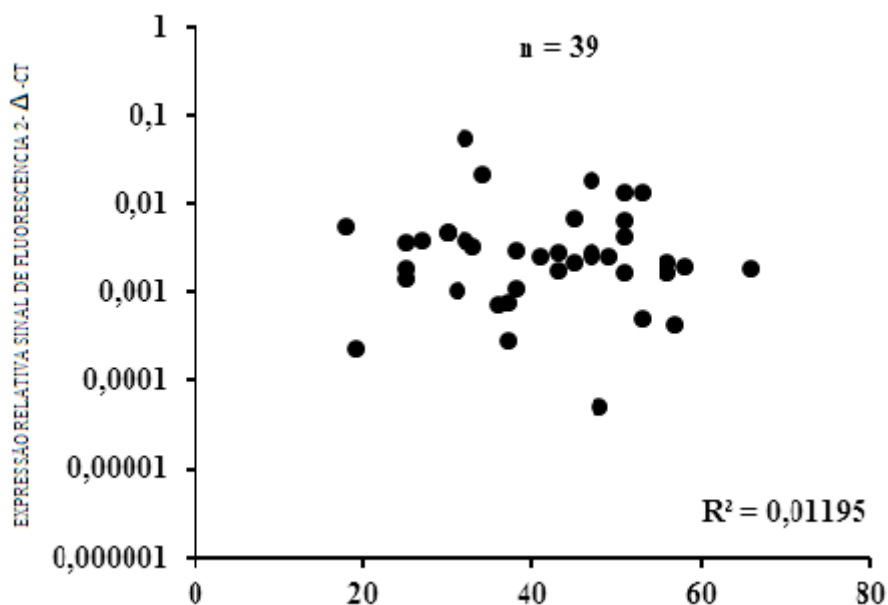


Gráfico 7 – Correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator ROR- γ com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene GAPDH.

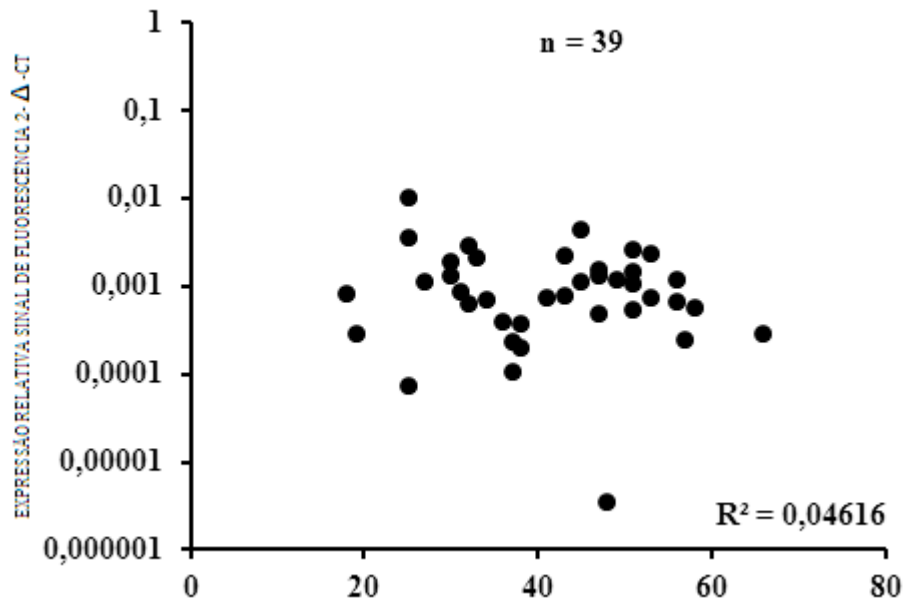


Gráfico 8 - Correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator ROR- γ com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene da β -actina

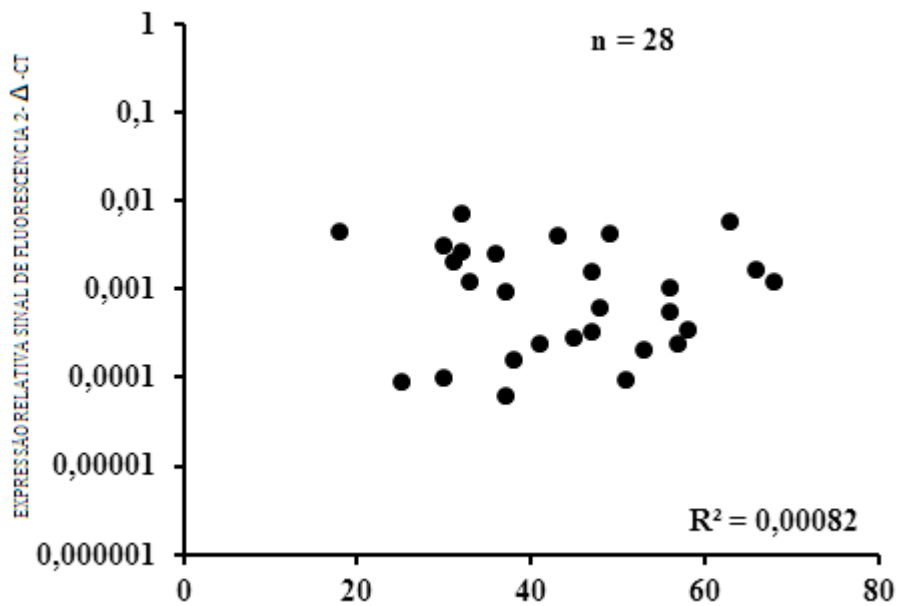


Gráfico 9 - Correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator FOXP3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene GAPDH.

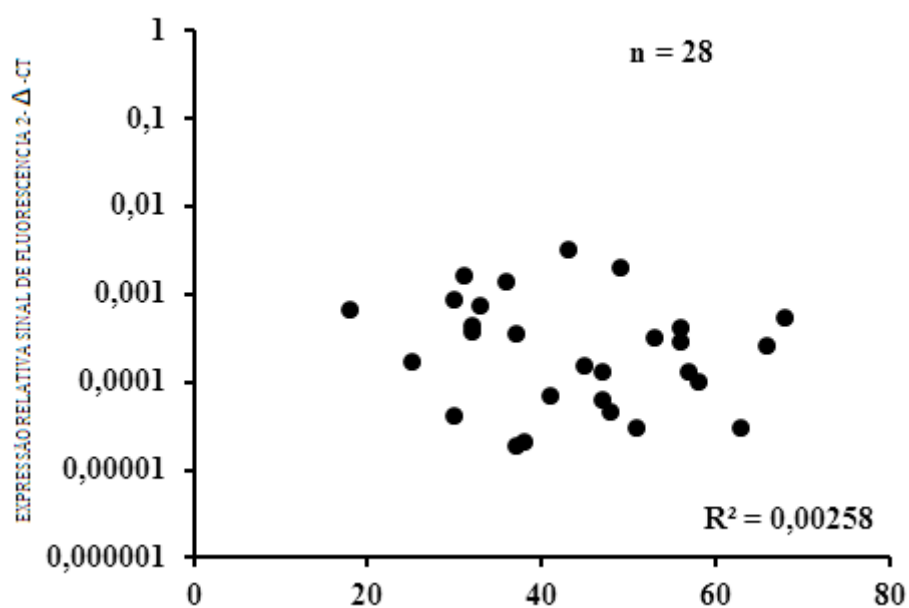


Gráfico 39 - Correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator FOXP3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene da β -actina.

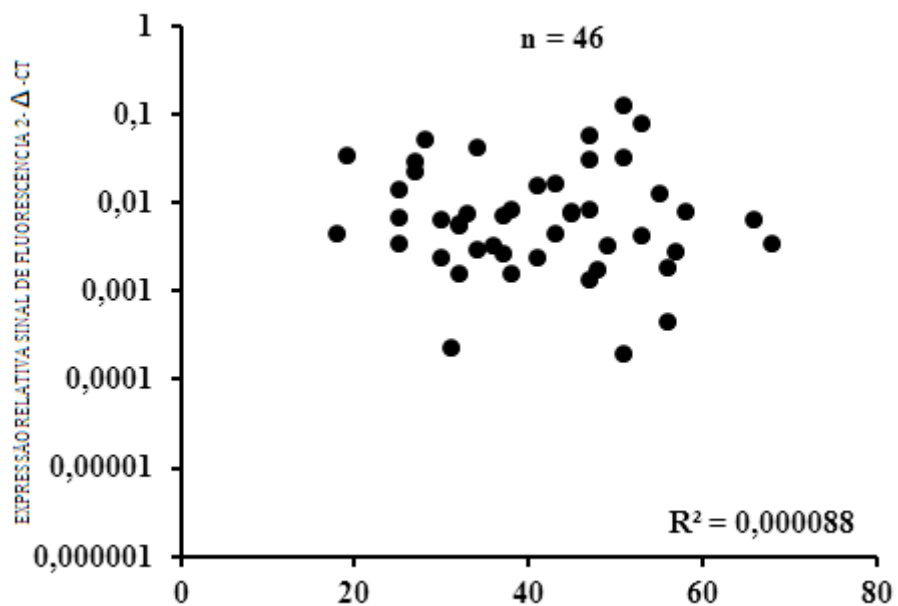


Gráfico 11 - Correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator GATA3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene GAPDH.

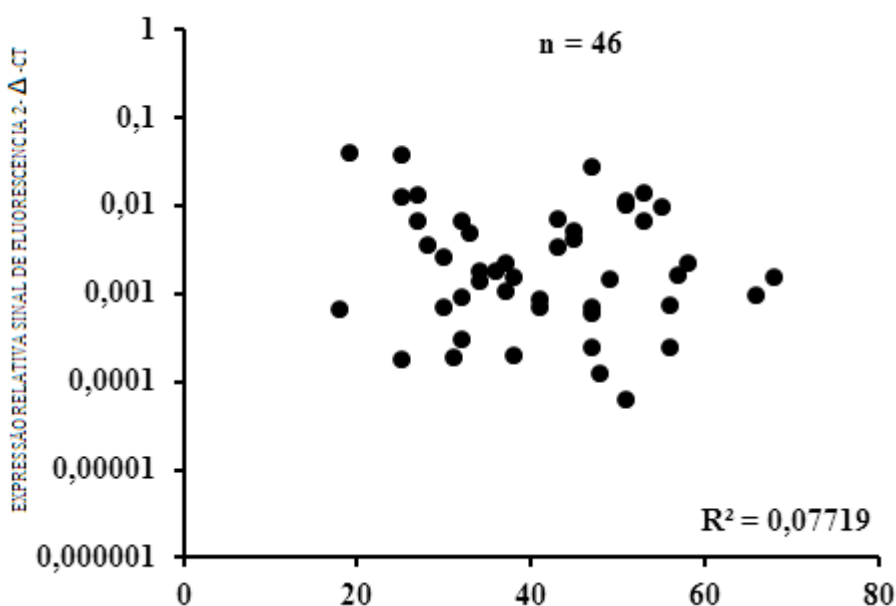


Gráfico 12 - Correlação linear da expressão quantitativa gênica do fator GATA3 com a idade dos pacientes, normalizados pelo gene da β -actina.

6.6 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 das amostras e o gênero dos pacientes

Utilizou-se **primers** específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ , FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Avaliamos a expressão a ocorrência de possíveis diferenças na expressão desses genes entre os gêneros. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. Não observou-se diferença significativa de expressão dos genes em estudo entre os gêneros dos indivíduos participantes da amostra. (Gráficos 13-15).

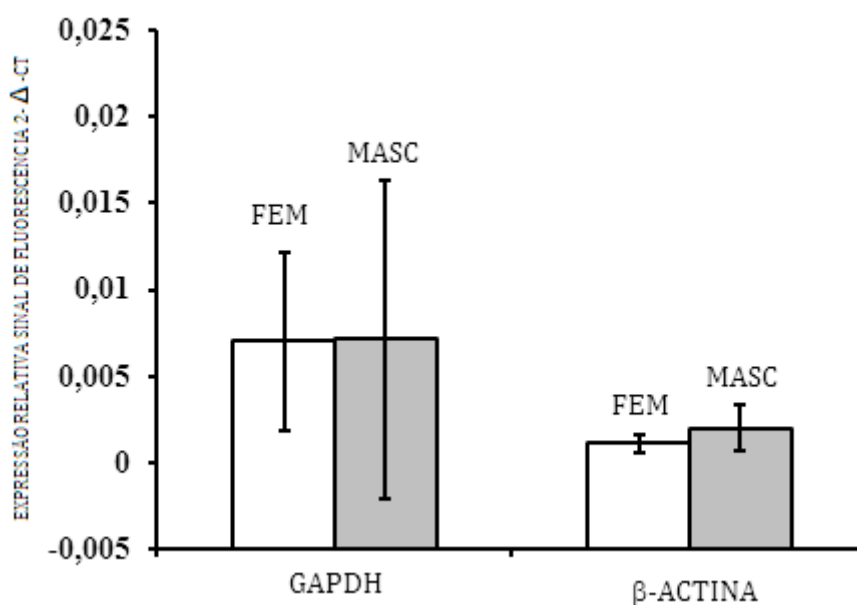


Gráfico 13 – Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina de acordo com o gênero.

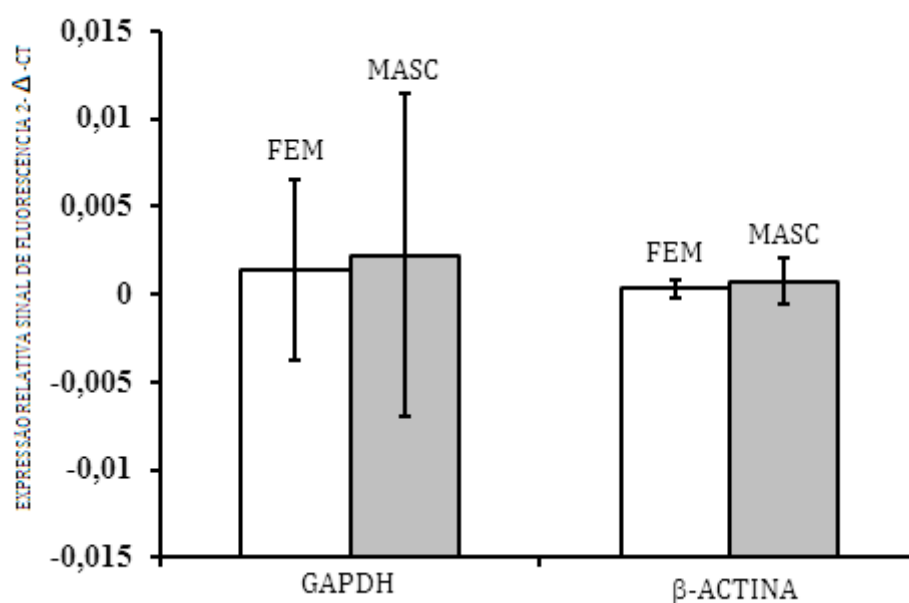


Gráfico 1440 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina de acordo com o gênero.

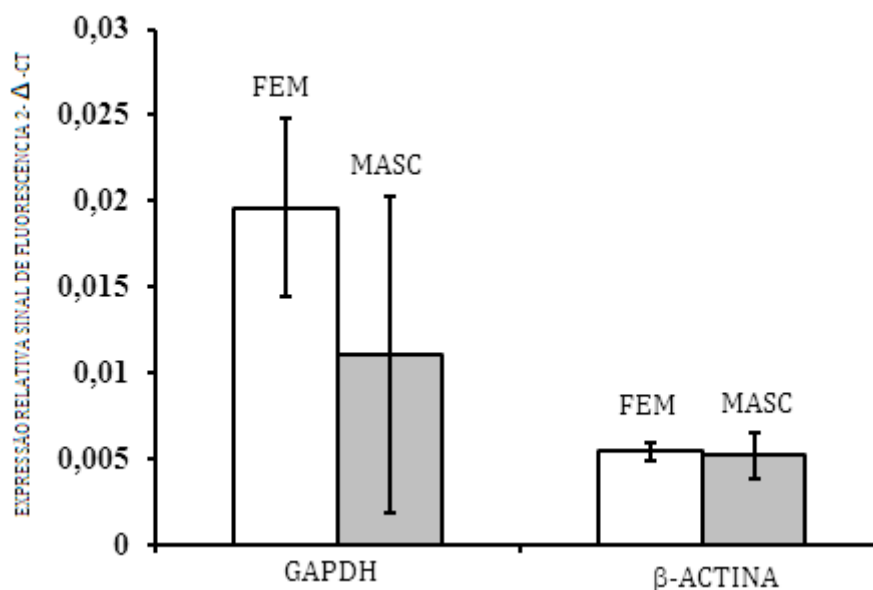


Gráfico 15 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina de acordo com o gênero

6.7 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 das amostras submetidas ao teste da Urease e ao estudo histológico, entre pacientes positivos e negativos para o *H. pylori*

Utilizou-se **primers** específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ , FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Comparamos as amostras submetidas ao testes da urease e ao estudo histológico para identificação dos pacientes positivos e negativos para o *H. pylori*. A avaliação da expressão gênica foi organizada de acordo com os resultados obtidos pelo teste da urease e avaliação histopatológica entre os grupos: urease negativo (UR-) e *H. pylori* negativo (HP-), urease positivo (UR+) e *H. pylori* positivo (HP+), urease positivo (UR+) e *H. pylori* negativo (HP-), urease negativo (UR-) e *H. pylori* positivo (HP+). Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. A expressão do gen GATA3 no grupo HP+ e UR+ foi significativamente maior que no grupo HP- e UR-, como mostram os intervalos de confiança de 95% das médias de expressão. Esta diferença não foi

encontrada quando utilizamos o GAPDH como padrão de expressão gênica. (Gráficos 16-18).

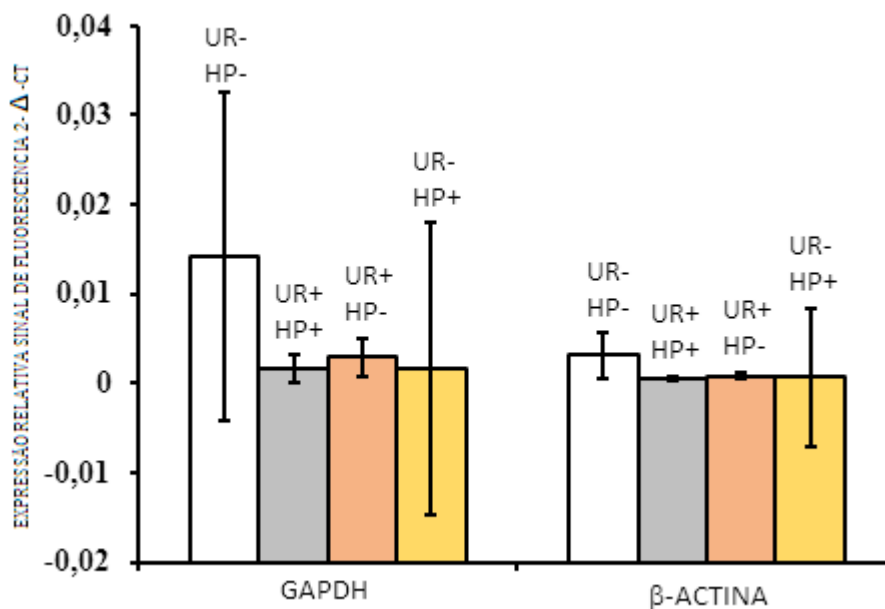


Gráfico 16 – Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina em pacientes submetidos ao teste da urease e estudo histológico.

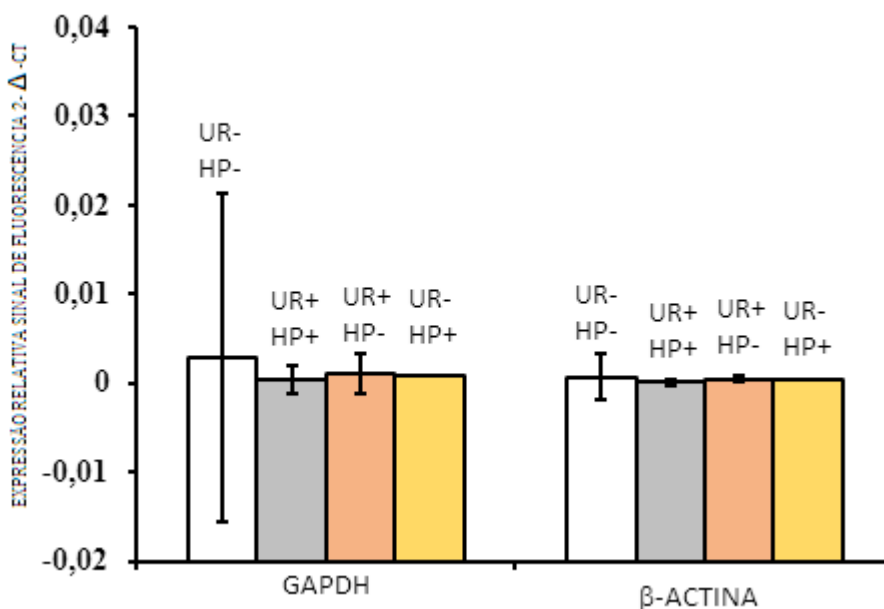


Gráfico 41 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina em pacientes submetidos ao teste da urease e estudo histológico.

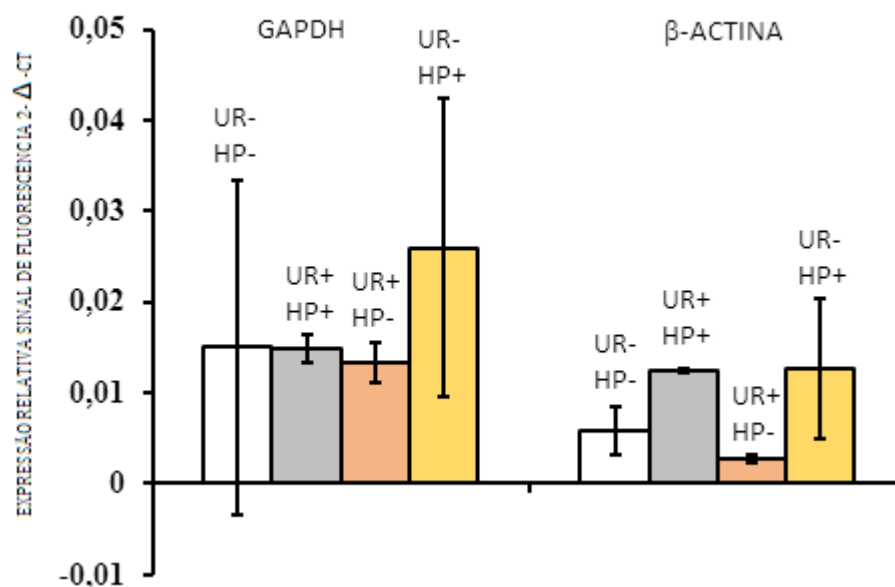


Gráfico 18 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina em pacientes submetidos ao teste da urease e estudo histológico.

6.8 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 em amostras de pacientes *H. pylori* positivos e negativos identificados pelo estudo histológico com o relato de infecção prévia.

Utilizou-se **primers** específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ , FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Comparamos as amostras de pacientes positivos e negativos para o *H. pylori* identificados pelo estudo histológico e o relato de infecção prévia fornecido pelos indivíduos participantes do estudo. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. A expressão gênica do fator GATA3 foi significativamente maior nos indivíduos *H. pylori* positivos ao estudo histológico que haviam relatado infecção prévia por esta bactéria, como mostram os intervalos de confiança de 95% das médias de expressão. Esta diferença não foi encontrada quando utilizamos o GAPDH como padrão de expressão gênica. (Gráficos 19-21).

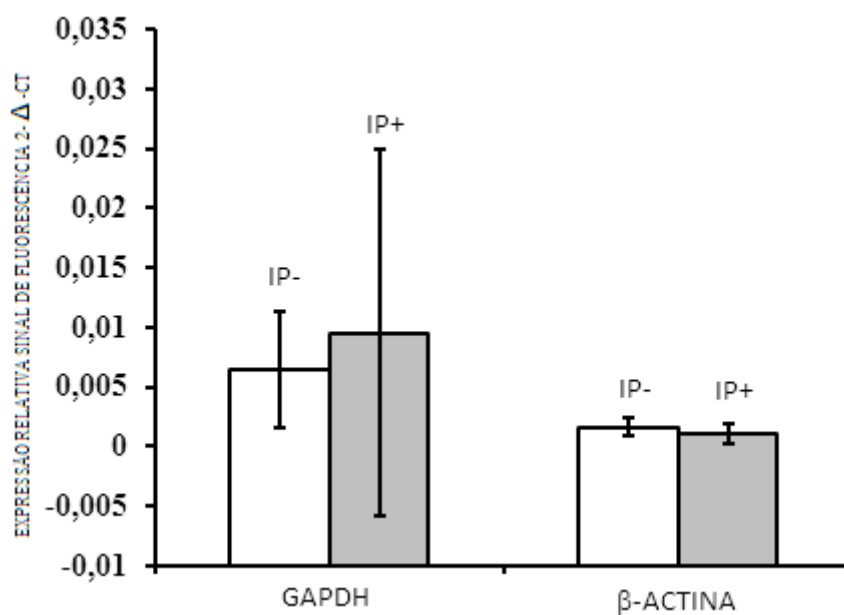


Gráfico 19 – Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina em pacientes com e sem infecção prévia de *H. pylori*.

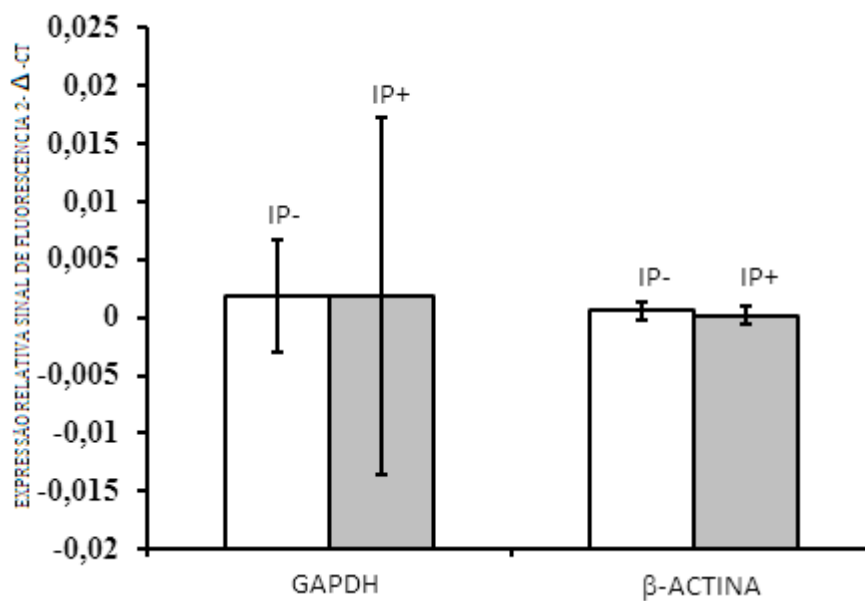


Gráfico 20 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina em pacientes com e sem infecção prévia de *H. pylori*.

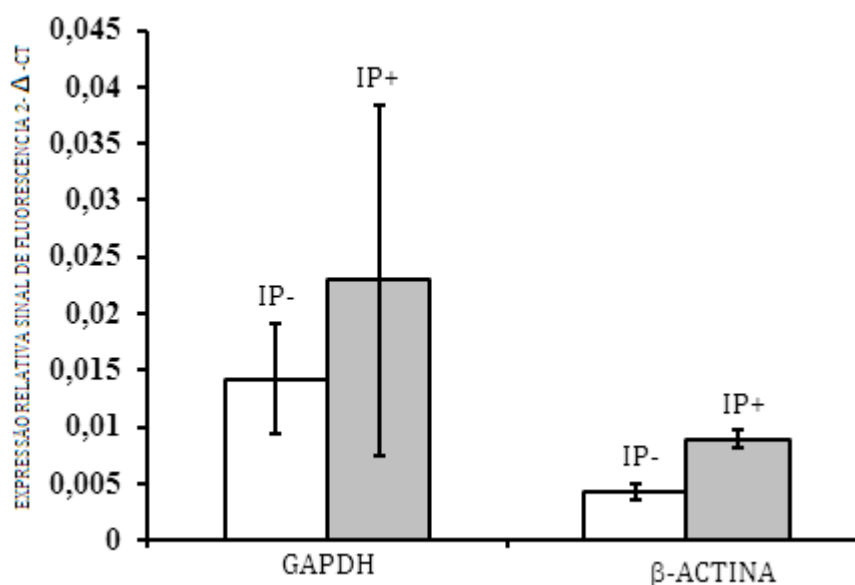


Gráfico 21 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina em pacientes com e sem infecção prévia de *H. pylori*

6.9 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia

Utilizou-se **primers** específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ , FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), em biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Analisamos a expressão dos genes em estudo nas amostras com gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. A expressão do gene GATA3 foi significativamente maior nas amostras de indivíduos com gastrite da região de corpo quando comparada às amostras de indivíduos com pangastrite, como mostram os intervalos de confiança de 95% das médias de expressão. Esta diferença não foi encontrada quando utilizamos o GAPDH como padrão de expressão gênica. (Gráficos 22-24).

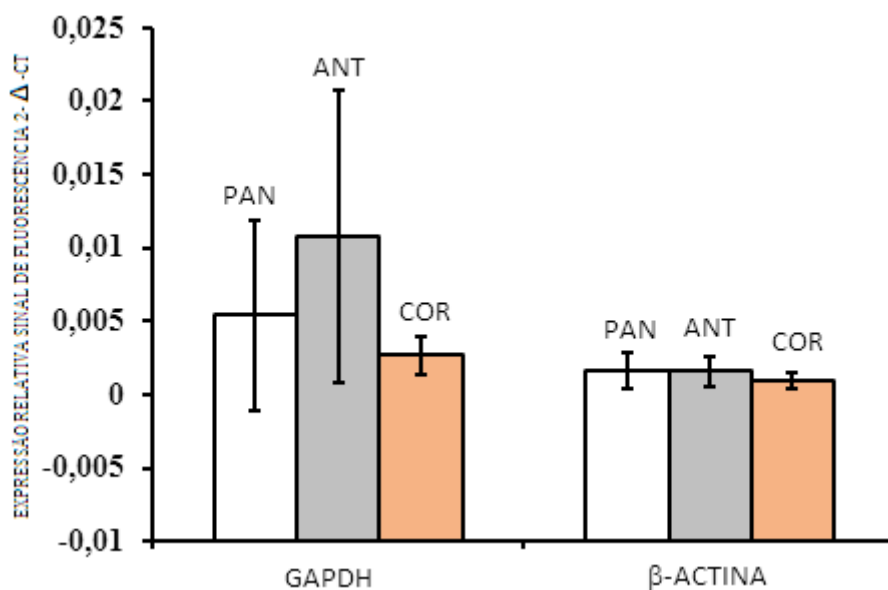


Gráfico 22 – Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto a topografia da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

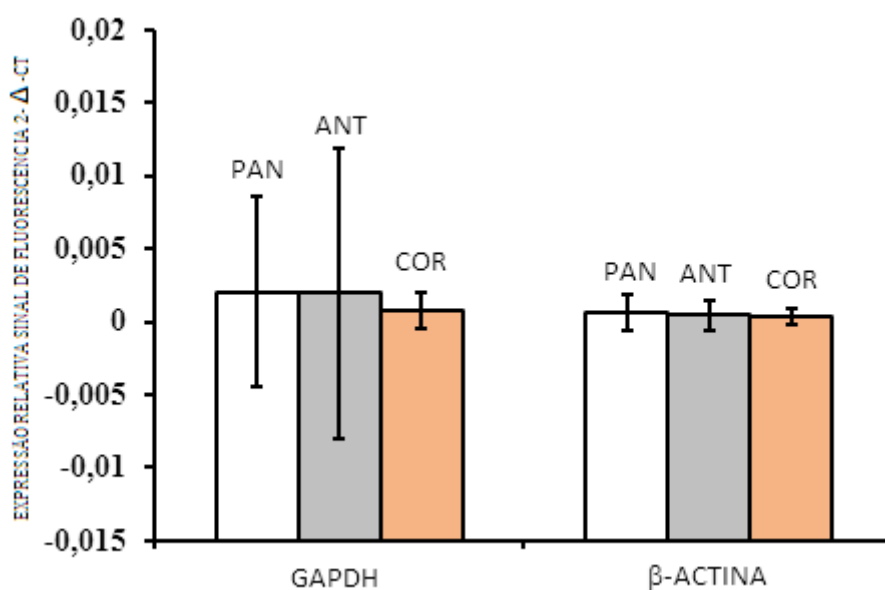


Gráfico 42 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto a topografia da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

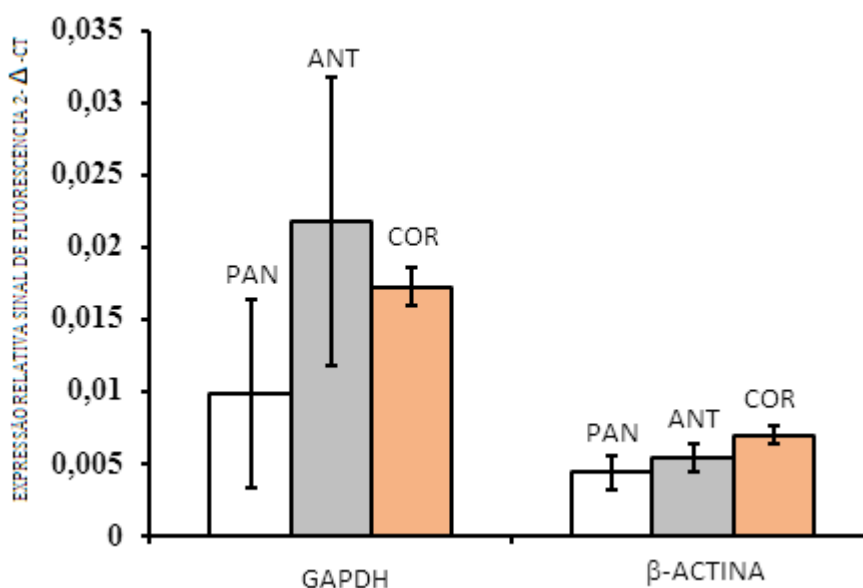


Gráfico 24 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto a topografia da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

6.10 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOX P3 e GATA3 nas gastrites classificadas pelo sistema sidney quanto à categoria

Utilizou-se **primers** específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ FOX P3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Analisamos a expressão dos genes em estudo nas amostras com gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à categoria. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. Observou-se significativa expressão do fator GATA3 nas amostras com gastrite erosiva quando comparada aos indivíduos com categoria enantematosa, como mostram os intervalos de confiança de 95% das médias de expressão. Esta diferença não foi encontrada quando utilizamos a β -actina como padrão de expressão gênica. (Gráficos 25-27).

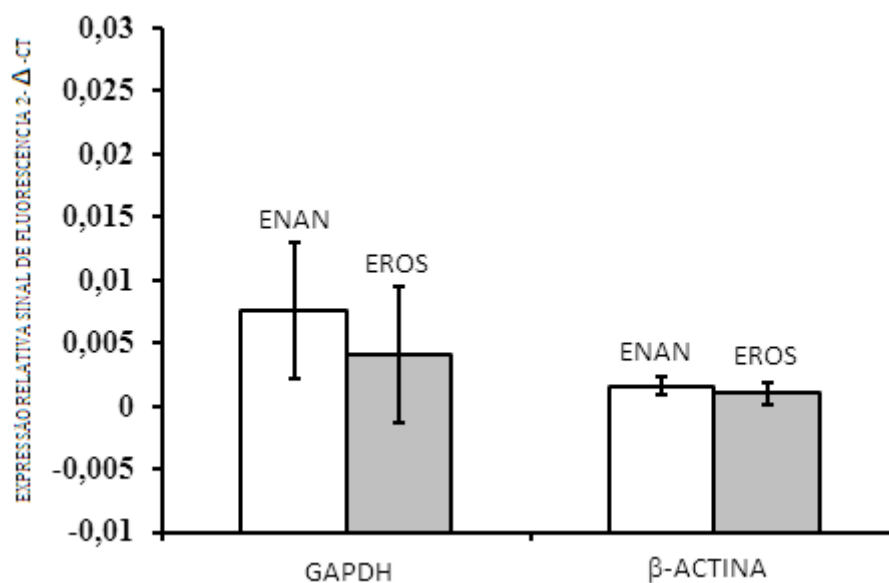


Gráfico 25 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto à categoria da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney

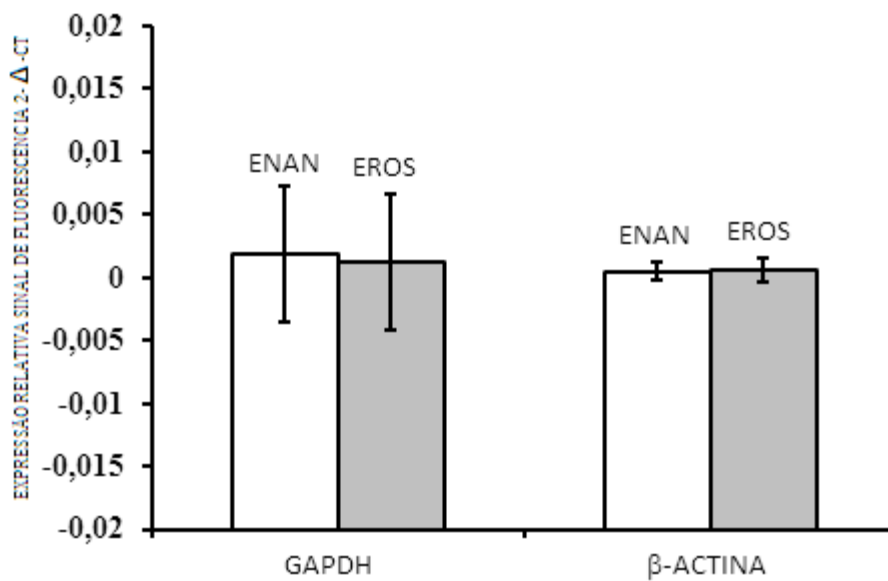


Gráfico 26 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto à categoria da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

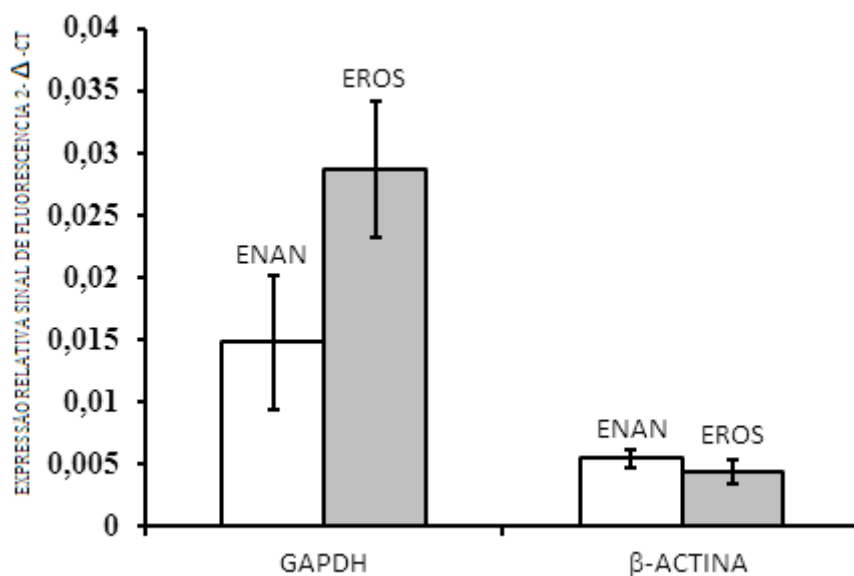


Gráfico 27 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto à categoria da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

6.11 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3 nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto ao grau de atividade do processo inflamatório.

Utilizou-se *primers* específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ , FOXP3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Analisamos a expressão dos genes em estudo nas amostras com gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto ao grau de atividade do processo inflamatório. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. Observou-se maior expressão do fator GATA3 nas amostras com grau de atividade leve quando comparada aos indivíduos com atividade moderada, como mostram os intervalos de confiança de 95% das médias de expressão. Esta diferença foi encontrada quando utilizamos tanto a β -actina como o GAPDH como padrão de expressão gênica. (Gráficos 28-30).

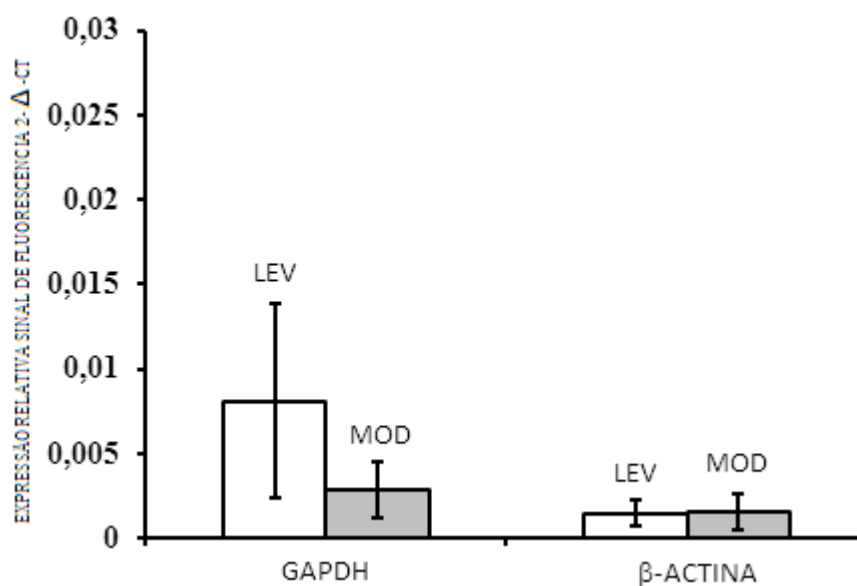


Gráfico 28 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto ao processo inflamatório da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

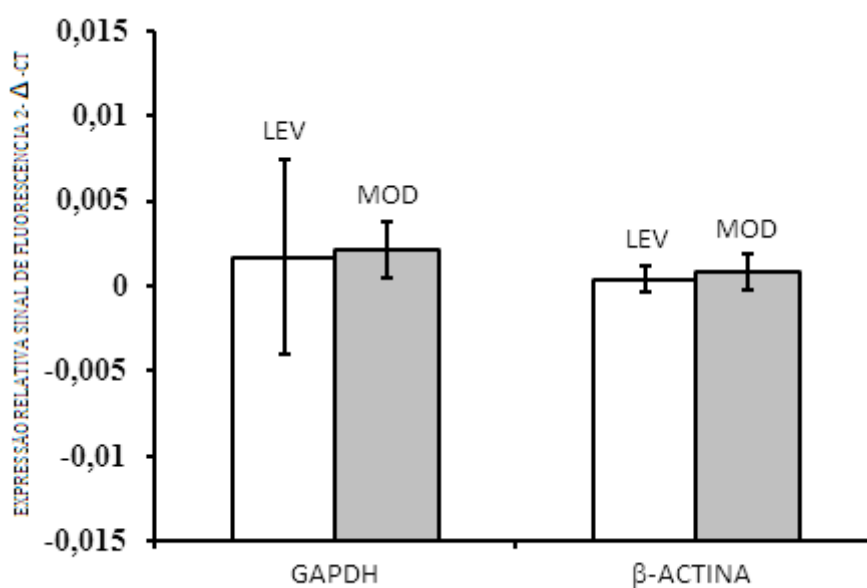


Gráfico 29 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto ao processo inflamatório da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

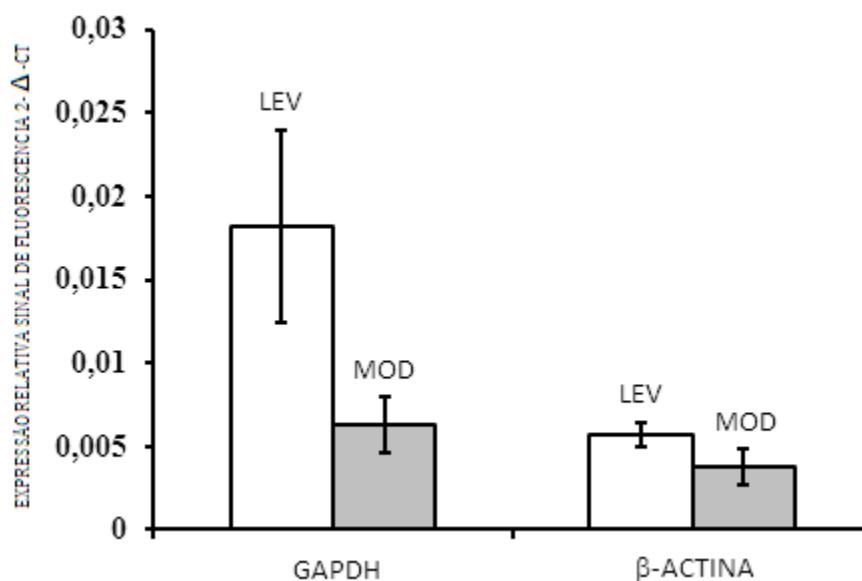


Gráfico 30- Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança a 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina quanto ao processo inflamatório da gastrite segundo a classificação do sistema Sydney.

6.12 Expressão gênica quantitativa dos fatores de transcrição ROR- γ , FOXP3 e GATA3, nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia e a positividade ou não do *H. pylori* nas amostras submetidas ao estudo histológico.

Utilizou-se **primers** específicos para a quantificação relativa dos genes ROR- γ FOX P3 e GATA3, utilizando reações de PCR em tempo real (RT-PCR), com biópsias de antro e corpo gástrico realizadas por endoscopia digestiva alta. Analisamos a expressão dos genes em estudo nas amostras com gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia e positividade ou não para o *H. pylori* avaliadas pelo estudo histológico. Os resultados foram obtidos utilizando a quantificação relativa da expressão dos genes constitutivos da β -actina e GAPDH. A avaliação da expressão gênica realizada foi organizada de acordo com os achados endoscópicos e os resultados histológicos, utilizando os seguintes grupos: Pangastrite e *H. pylori* positivo (PAN HP+), pangastrite e *H. pylori* negativo (PAN HP-), gastrite de antro e *H. pylori* positivo (ANT HP+), Gastrite de antro *H. pylori*

negativo (ANT HP -) e gastrite de corpo *H. pylori* negativo (COR HP-) . Quando utilizamos o GAPDH como gene constitutivo, observamos maior expressão de ROR- γ no grupo ANT HP -, não sendo encontrada diferença de expressão desse gene nos outros grupos. Quando utilizamos a b-actina como gene constitutivo, algumas diferenças significativas foram encontradas: A expressão de ROR- γ nos grupos ANT HP+, PAN HP- e COR HP- foi significativamente maior que no grupo PAN HP+ .

Em relação ao gene GATA3, sua expressão foi significativamente maior nos grupos ANT HP+, ANT HP- e COR HP-, que nos grupos PAN HP+ e PAN HP -, ao ser utilizado o gene constitutivo GAPDH. Quando utilizamos a b-actina, a expressão de GATA3 foi significativamente maior em ANT HP+, PAN HP- e COR HP-, que em PAN HP + e ANT HP- . (Gráficos 31-33).

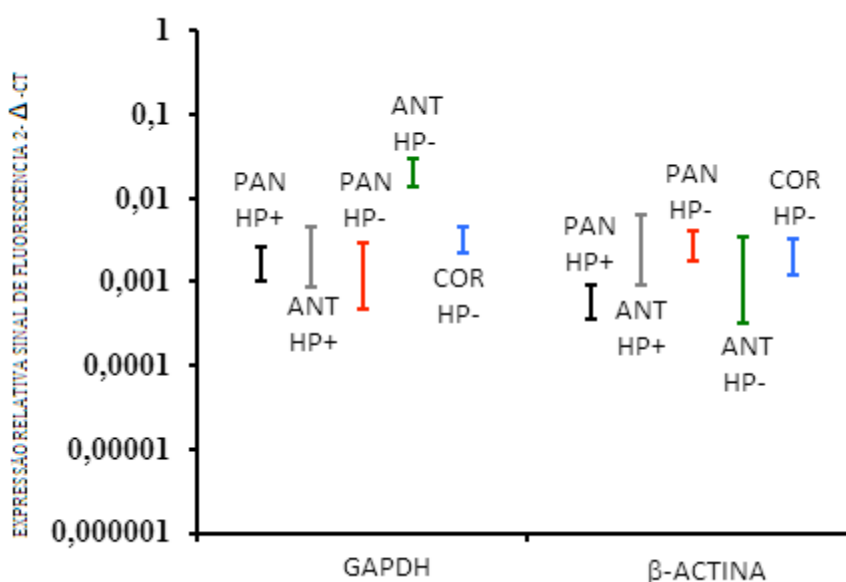


Gráfico 31 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição ROR- γ normalizado com os genes GAPDH e β -actina nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia e positividade ou não do *H. pylori* nas amostras submetidas ao estudo histológico.

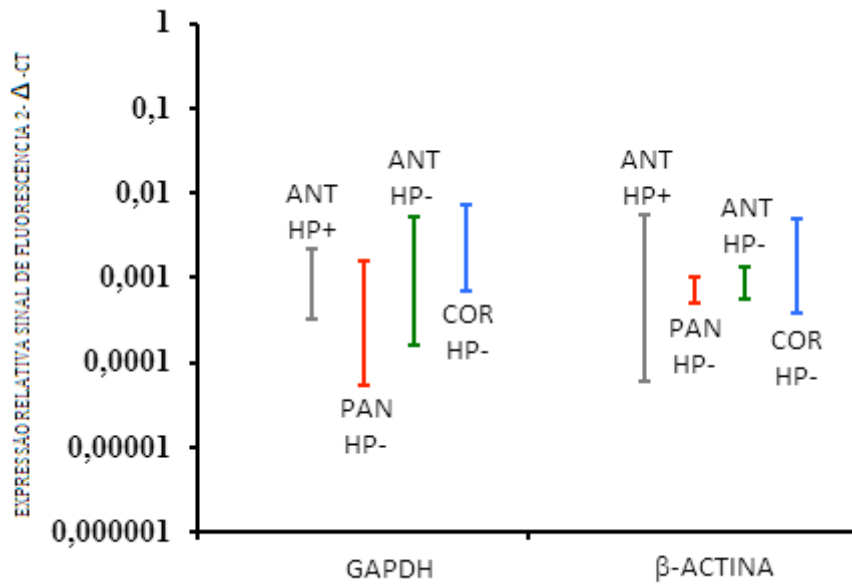


Gráfico 32 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição FOXP3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina nas gastrites classificadas pelo sistema Sidney quanto à topografia e positividade ou não do *H. pylori* das amostras submetidas ao estudo histológico

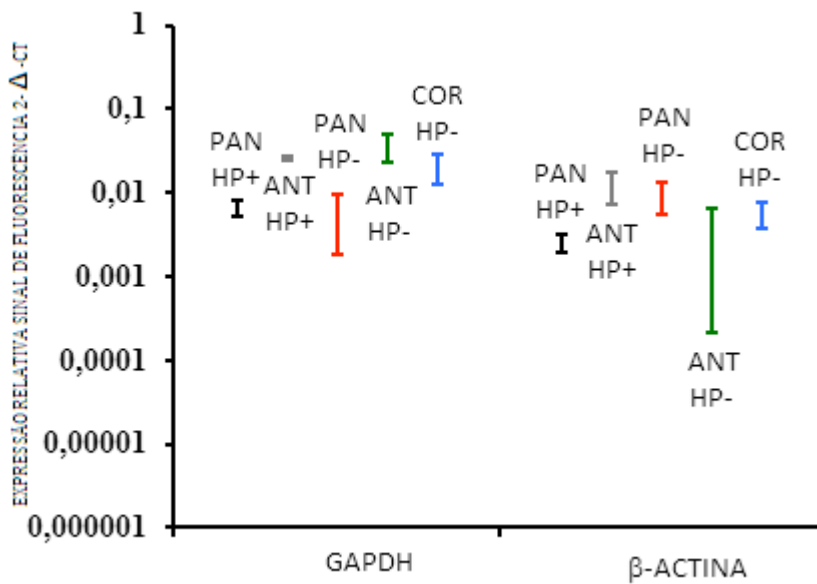


Gráfico 43 - Expressão quantitativa (médias e intervalos de confiança de 95%) do fator de transcrição GATA3 normalizado com os genes GAPDH e β -actina nas gastrites classificadas pelo sistema sidney quanto à topografia e positividade ou não do *H. pylori* nas amostras submetidas ao estudo histológico

7 DISCUSSÃO

A prevalência mundial da infecção pelo *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*), tem se mostrado cada vez maior, persistindo os mesmos fatores que dificultam seu controle, os quais vem se agravando com situações socioeconômicas mais delicadas. Trata-se de bactéria gran-negativa microaerófila, com transmissão por contato direto inter-humanos, principalmente oral-oral, fecal-oral e iatrogênicas, apresentando índices de infecção acima de 50% no mundo, podendo chegar à 80% em países considerados em desenvolvimento. Apesar desses valores, somente uma pequena parcela da população infectada (10% a 20%), apresenta sintomas (DZIERZANOWSKA-FANGRAT; DZIERZANOWSKA, 2006; MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009).

A prevalência tem sido abordada em diversos trabalhos disponíveis na literatura mundial, em nosso país algumas amostras podem ser consultadas a respeito, como exemplo podemos citar dados retirados de uma população rural da região sudeste com 87% de positividade em adultos e 62,0% em crianças do total de sua amostra, com referência ao aumento desta prevalência com a idade, tendo utilizado sorologia como método diagnóstico (GAETANO; ALDO, 2009).

Em nosso estudo, trabalhamos com amostra de clínica privada na cidade de Belém do Pará (região norte do país), onde fatores culturais, sociais e políticas públicas deficientes, vem contribuindo de forma negativa para o controle da infecção, facilitando os processos crônicos os quais contribuem para o aumento da incidência do câncer gástrico em nossa região. Utilizamos pacientes do próprio serviço encaminhados para realização de endoscopia, somente adultos na faixa etária de 18 a 68 anos, na maioria mulheres.

Não observamos correlação direta entre a positividade do *H. pylori* e o gênero de nossos pacientes, mesmo tendo utilizado a expressão gênica como método. Em relação à idade, existe uma maior prevalência já conhecida na infância nos primeiros 5 anos de vida com decréscimo progressivo, e evolução à cronicidade (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002).

Nossa amostra foi composta somente por adultos, não sendo possível fazer inferência à outras faixas etárias, todavia, ao analisarmos a idade de nossos

indivíduos adultos participantes da amostra, também não foram encontrados resultados significativos quanto à expressão gênica dos fatores estudados.

Em relação ao diagnóstico do *H. pylori*, vários são os métodos disponíveis, invasivos ou não invasivos, com baixa ou alta sensibilidade, que na dependência de múltiplos fatores todos apresentam vantagens e desvantagens e devem ser escolhidos de acordo sua disponibilidade, custo e benefício, por esses motivos na maioria das vezes são utilizados em associação (PATEL, 2014). Ratificando essas afirmações, citamos Silva (2014), que utilizou como métodos diagnósticos para identificação do *H. pylori*, o teste da urease, histopatológico e biologia molecular para pesquisa do gen 16S rRNA, justificando os três métodos utilizados em conjunto, como forma de minimizar os falso-negativos.

Nosso objetivo principal foi avaliar a expressão gênica dos fatores de transcrição, contudo tivemos perda de material durante o processo de extração do c-DNA complementar nas amostras relacionadas para estudo que envolveram os dois testes diagnósticos na identificação da bactéria. Optamos então em utilizar 35 amostras comuns aos dois testes (urease e histológico), analisando a expressão gênica dos fatores de transcrição de forma independente na identificação do *H. pylori*, onde obtivemos positividade de 48,5% para o *H. pylori* no teste da urease contra 25,7% no estudo histológico, fato que, em nossa interpretação, não interferiu nos resultados, pois depois da análise dos fatores de transcrição específicos para aos perfis das respostas imunes (TH2, TH17 e TREG) em cada teste, realizamos o cruzamento desses resultados através de análise comparativa. Nos demais aspectos analisados (achados endoscópicos e características clínicas da amostra), forma utilizados os 50 indivíduos do estudo.

A Classificação Modificada de Sydney foi realizada nesse estudo para identificação das lesões inflamatórias durante o procedimento endoscópico, com coleta de material para o teste da urease e avaliação histológica posterior. Silva (2014) em sua tese utilizou 126 pacientes em sua amostra dos quais 62 (49,2%) pacientes não apresentaram gastrite crônica no corpo gástrico e dentre eles nenhum apresentou a infecção pelo *H. pylori*, enquanto que os pacientes que tiveram gastrite crônica presente foram 64 (50,7%) e o tipo de atividade mais encontrada foi a discreta com 48 (38,09%) pacientes, e a densidade de infecção pelo *H. pylori*

predominante foi a moderada com 24 (19,0%) pacientes infectados. Mostrando assim uma íntima relação da bactéria com a gastrite crônica do corpo gástrico.

Nossos achados endoscópicos mostraram processo inflamatório traduzido por pangastrite em 40% das biópsias, seguida de gastrite antral em 38% e gastrite de corpo em 22% do total. A categoria enantematosa esteve mais presente em 88% dos pacientes contra 12% da erosiva plana, assim como o grau leve de atividade presente em 82% contra 18% de atividade moderada. Esses achados comparados à análise pela expressão gênica dos fatores de transcrição demonstraram predomínio de gastrite erosiva leve de corpo. Portanto havendo concordância somente na intensidade do processo inflamatório, reforçando a necessidade da correlação entre a classificação endoscópica realizada no momento da coleta de material com estudos teciduais específicos laboratoriais, para real identificação do problema a ser tratado.

Em uma visão geral sobre a relação parasita / hospedeiro, quais pontos podemos considerar relevantes relacionados à infecção do *Helicobacter pylori* em humanos?

A infecção pelo *H. pylori* ocorre na infância com transmissão entre membros da própria família, principalmente parentes de primeiro grau. Cepas idênticas e ou múltiplas infecções distintas nas famílias estão correlacionadas às condições socioeconômicas e culturais dos países considerados desenvolvidos ou em desenvolvimento. A via de transmissão fecal-oral, a qual ocorre no período agudo de infecção pós ingestão e proliferação maciça da bactéria, é fator de facilitação de contaminação para novos indivíduos.

Dentre os mecanismos de evasão e adaptação do *H. pylori* a modificação do meio com diminuição do pH na fase inicial (hipocloridria) sintomática é comum. Posteriormente ocorre normalização dessas alterações com evolução para quadro clínico assintomático ou oligossintomático, podendo haver perpetuação desse estado por anos ou décadas. Há influência nessa evolução descrita de fatores de virulência do agente, hábitos do hospedeiro e fatores ambientais, sobretudo da resposta imunológica do indivíduo. As complicações decorrentes possíveis já são bastante conhecidas: gastrite, úlcera péptica, câncer gástrico e tecido linfóide associado à mucosa (MALT). (SILVA, 2014; BLASER; PARSONNET, 1994; FORD

et al, 2004; FARINHA; GASCOYNE, 2005). Entretanto, independente do desfecho clínico em questão, a resposta inflamatória local tem papel crucial na expressão e gênese dessas doenças, o que torna a investigação de novos fatores imunes e por técnicas modernas de grande importância clínica. Neste aspecto em particular algumas questões são importantes.

Qual a relação dos linfócitos T auxiliares (Th) com o *H.pylori* ?

O *Helicobacter pylori* induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, as quais influenciam na resposta celular local das células T auxiliares (TH), através de seus subconjuntos Th1 e Th2. A caracterização dessas respostas pode ser feita pela identificação de seus produtos, como interleucina-2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ) todos relacionados à resposta TH1 que regula a imunidade celular enquanto e que IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 estão relacionadas à resposta TH2 a qual regula a imunidade humoral.

O *H. pylori* induz a polarização dos linfócitos T auxiliares para resposta TH1, assim como também já é fato, a resposta TH 17 evidenciada pela associação positiva com a expressão de interleucinas 17 (IL-17 A-F) responsáveis pela quimioatração de diferentes tipos celulares (neutrófilos, macrófagos), caracterizando resposta concomitante da mucosa gástrica para TH1/TH17, relação essa que exerce papel importante no processo da patogênese (D'ELIOS et al, 1997, SHI et al, 2010; LORENZI; BARBOSA-LORENZI; ZANETTE, 2012).

A resposta imunológica adaptativa ao agente pode trazer alguma desvantagem ao hospedeiro?

Sim, a infecção crônica do *H. pylori* no estômago e duodeno, tendo como consequência a úlcera péptica e cancer gástrico em uma parcela de 10% a 20% dos indivíduos, fato que pode estar diretamente relacionada à inabilidade de eliminação do agente infeccioso por uma resposta ativa de supressão conduzida principalmente pelos linfócitos Tregs, limitando o processo agudo, porém favorecendo a persistência bacteriana e suas consequências de processo crônico (LUNDGREN et al, 2005). Há relatos da identificação de menor processo inflamatório gástrico em crianças com presença maior das de células Treg em relação às respostas TH1 e TH17 nos adultos, reforçando o papel específico dos linfócitos T reguladores (Treg) na persistência bacteriana (VENEGAS et al, 2013).

Por que buscar mais conhecimento a respeito da resposta imunológica adaptativa relacionada ao *Helicobacter pylori* ?

O completo entendimento dos mecanismos presentes na resposta imunológica celular mediada pelos linfócitos efetores T CD4+ induzida pelo *Helicobacter pylori*, poderá criar alternativas terapêuticas mais eficazes no controle e prevenção das patologias relacionadas à essa bactéria principalmente no âmbito da imunoterapia. Sabe-se atualmente que a resposta celular relacionada ao *H. pylori* é do tipo mista Th17 / Th1, a qual é responsável pelo processo inflamatório e colonização do estômago, contudo necessita-se de maior esclarecimento quanto ao papel de todos os fenótipos Ths possíveis envolvidos neste processo.

Contribuindo com essa linha de raciocínio, pudemos constatar em nossos resultados de uma forma geral que o fator de transcrição GATA3 (perfil Th2), foi o que apresentou maior significância em sua expressão gênica quando comparado aos demais fatores (ROR- γ e FOXP3), com predomínio nas amostras com positividade confirmada para o *H. pylori*, nos indivíduos com histórico de infecções prévias, nas amostras com gastrite de corpo, grau leve e categoria erosiva. Em menor escala a expressão de ROR- γ (perfil TH17), apresentou significância nos aspectos analisados, com amostras *H. pylori* positivas ou não em todas as regiões gástricas estudadas.

Contudo qual o real significado desses achados nesta especificamente nesta amostra? Quais hipóteses justificariam nossos resultados ?

O perfil TH2 (representada pelo seu fator GATA3), responde pela resposta humoral local e sistêmica principalmente com predomínio de imunoglobulina do tipo IgG e IgA, a qual pode aparecer na fase crônica da infecção. Como propositalmente não trabalhamos com o fator T-bet (perfil TH1) nesta fase do estudo, essa maior expressão de GATA 3, pode estar diretamente relacionada a concomitância da resposta adaptativa humoral à bactéria, contudo há necessidade para de se estudar na presente amostra o fator T-bet para solidificar ou não essa hipótese. Em relação à expressão do perfil TH 17 (ROR- γ) o qual apresentou-se com expressão significativa em uma das análises que envolveram topografia da infecção e positividade para a bactéria, acreditamos que o aprofundamento de nossa busca com a utilização do fator de transcrição e interleucinas específicas para esse perfil

(IL17 A-F), poderá trazer resultados mais substanciais, raciocínio *que pode ser* explicado pela conhecida plasticidade gênica na expressão desse perfil (TH17) em relação à resposta TH1, ou seja, a pouca expressão desse fator não exclui sua participação de forma mista e alternante nos processos inflamatórios, principalmente dependendo da fase que se encontram. O gene FOXP3, conhecido pelo seu papel de mediador da resposta imunológica, exercendo significativo papel na persistência bacteriana por longos períodos, não obteve expressão importante em nosso material, talvez pela característica específica da faixa etária estudada, havendo necessidade de outras etapas de investigação para confirmação dessa possibilidade.

Os genes constitutivos utilizados como padrão (β -actina e GAPDH) forneceram resultados na maioria das vezes diferentes, sendo que as maiores diferenças nas expressões dos fatores em estudo ocorreram com o uso da β -actina. Preferimos confrontar os resultados utilizando as duas possibilidades, pois os níveis de expressão dos genes de referência podem variar entre os tecidos, tipos celulares e condições experimentais. Portanto, a validação adequada desses genes em cada pesquisa é fundamental para a correta avaliação dos dados fornecidos pelo método (RT-PCR). Em nossa amostra o gene da β -actina, mostrou-se mais adequado para uso no tecido gástrico, talvez por ter se mantido mais estável em suas expressões nas fases da quantificação relativa.

Outros questionamentos e hipóteses puderam ser feitas após análise de nossos dados, a saber:

- a) Em relação à faixa etária analisada seguindo os mesmos parâmetros de nosso estudo, há possibilidades de níveis de expressões diferentes em outras faixas etárias ?
- b) A expressão gênica foi significativa tanto nos pacientes *H. pylori* positivos (análise histológica), como nos pacientes que relataram infecção prévia em nosso estudo, esses achados podem ter sido decorrentes de variações nas respostas imunológicas individuais (inabilidade de eliminar o agente), ou devido à

susceptibilidade para reinfecção desses indivíduos, havendo necessidade de mais investigação para esclarecimento dessa hipótese.

c) Resultados não concordantes encontrados em relação aos achados endoscópicos e a resposta inflamatória gástrica avaliadas por métodos de análise gênica, podem contribuir positivamente, pois acreditamos que esse fato possa diminuir a subjetividade da interpretação endoscópica observador-dependente.

d) As expressões significantes dos genes GATA3 predominante em nossos resultados, seguida da expressão do gene ROR- γ em uma das análises relacionadas à topografia do processo inflamatório, define o real papel dos fatores de transcrição na resposta imunológica induzida pelo *H. pylori* ?

e) Podemos considerar baseado em nossos resultados, que o gene constitutivo da β -actina utilizado deva ser considerado como padrão para estudos que envolvam tecido gástrico, em detrimento ao gene GAPDH ? Podemos justificar essa decisão pelo seu provável comportamento de maior estabilidade durante as reações ?

8 CONCLUSÕES

Considerando os padrões da amostra, as características do presente estudo e as análises apresentadas em gráfico, apresentamos as seguintes conclusões:

- 1 A faixa etária adulta analisada em nossa amostra, não influenciou na expressão gênica dos fatores de transcrição estudados.
- 2 Não houve diferenças encontradas nas expressões dos genes em estudo com relação ao gênero dos indivíduos participantes da amostra.
- 3 Houve expressão gênica significativa tanto nos pacientes *H. pylori* positivos (análise histológica), como nos pacientes que relataram infecção prévia em nosso estudo.
- 4 Ao compararmos os achados endoscópicos da amostra, utilizando o Sistema Sydney, com a expressão gênica dos fatores de transcrição em estudo, obtivemos maior concordância somente em relação ao grau de atividade das gastrites.
- 5 O fator de transcrição GATA3 (perfil de resposta TH2) foi o gene de maior expressão nas amostras com gastrites endoscópicas e com positividade para o *H. pylori*.
- 6 O fator de transcrição ROR- γ (perfil de resposta TH17) apresentou-se com expressão aumentada ao compararmos as amostras com a topografia do processo inflamatório evidenciado pela endoscopia, independente da positividade pelo *H. pylori* (estudo histológico).
- 7 O gene da β -actina como gene-padrão constitutivo utilizado em nosso estudo foi o que mais apresentou resultados significativos nas expressões quantificadas, quando comparado com o gene GAPDH.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, P. D. **Caracterização de diferentes expressões fenotípicas de células TCD4 na asma atópica e não-atópica de uma população de escolares de Porto Alegre/RS**. 2013. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grandedo Sul. Porto Alegre, 2013.
- ATHERTON, J. C. et al. Mosaicism vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vac A types with cytotoxin production and peptic ulceration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17771-17777, jul. 1995.
- BLASER, M. J; PARSONNET, J. Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. **J Clin Invest**, v. 94, n. 1, p. 4-8, 1994.
- BORLACE, G. N. et al. A role for altered phagosome maturation in the long-term persistence of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 303, n. 2, G169-79, 2012
- BRITO, CAA. **Prevalência de *Helicobacter pylori* e dos genes *cagA* e *vacA* em doenças gastroduodenais em Recife**. PE. 1999. Tese (doutorado). UFPE. Recife, 1999.
- BROWN, L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 283-297, 2000.
- CARPENTER, H.A; TALLEY, N.J. Gastroscopy is incomplete without biopsy: clinical relevance of distinguishing gastropathy from gastritis. **Gastroenterology**, v. 108, n. 3, p. 917-924, 1995.
- CENSINI, S et al. *cag A* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14648-53, 1996.
- COELHO, L. G. V. et al. Consenso Nacional sobre *H. pylori* e afecções associadas. **GED Gastroenterol Endosc Dig**, v. 15, n. 2, p. 53 – 8, 1996.
- COELHO, L. G. V.; COELHO, M. C. F. de. Infecção por *Helicobacter pylori*. **Rev Bras. Med**, v. 62, n. 12, p. 80-87, 2005.
- COELHO, L. G. V.; ZATERKA, S. (Org.). II Consenso brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 128-132, 2005
- CORREA, P; PIAZUELO, M. B; CAMARGO, MC. The future of gastric cancer prevention. **Gastric Cancer**, v. 7, n. 1, p. 9-16, 2004.

D'ELIOS, M. M. et al. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in Helicobacter pylori-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. **Eur J Immunol.** v.27, n.7, p. 1751-5, 1997.

D'ELIOS, M. M; CZINN, S. J. Inflammation, Immunology and Vaccines for Helicobacter pylori. **Infection**, v. 19, Suppl 1, p.19-26, 2014.

DIXON, M. F et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System. **Am J Surg pathol**, v. 20, n. 10, p. 1161-1181, 1996.

DUNN, B. E; COHEN, H; BLASER, M. J. Helicobacter pylori. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 720-734, Oct. 1997.

DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K; DZIERZANOWSKA, D. Helicobacter pylori: microbiology and interactions with gastrointestinal microflora. **J Physiol Pharmacol**, v 57, Suppl 3, p. 5-14, 2006.

EATON, K. A; MEFFORD, M; THEVENOT, T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of Helicobacter pylori gastritis in mice. **J Immunol.**, v.166, n. 12, p.7456-61, 2001.

EVANS, D. G. et al. Helicobacter pylori cagA status and s and m alleles of vacA in isolates from individuals with a variety of H. pylori-associated gastric diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.11, p. 3435-3437, nov.1998.

FARINHA, P; GASCOYNE, R. D. Helicobacter pylori and MALT lymphoma. **Gastroenterology**, v. 128, p. 1579-1605, 2005.

FORD, A et al. Eradication therapy for peptic ulcer disease in Helicobacter pylori positive patients. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, n. 4, 2004.

GAETANO, C; ALDO, B (Ed.). **Infezione gastrica da Helicobacterpylori**. Trattato di Medicina Interna: Piccin Edizioni, 2009

GENTA, R. M; HAMNER, W; GRAHAM, D. Y. Gastric lymphoid follicles in Helicobacter pylori infection. **Human Pathol.**,v. 24, n. 6, p. 577-583,1993.

GOODWIN, C. E. et al. Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter pylori comb. Nov. And Helicobacter mustelae comb. Nov. Respectively. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v. 39, n. 4, p. 397-405, 1989.

GUZMÁN, M. El premio nobel de fisiología y medicina 2005. **Biomédica**, v. 26, n. 1, p. 7-8, 2006.

HAFSI, N. et al. Human dendritic cells respond to Helicobacter pylori, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro. **Immunol.**, v. 173, n. 2, p. 1249-57, 2004.

IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p.

1121-33, 2006.

KODAIRA, M. S; ESCOBAR, A. M. U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 356-69, 2002.

LORENZI, J. C. C.; BARBOSA-LORENZI, V. C.; ZANETTE, D. L.. Linfócitos T CD4+ e a resposta imune. **Scire Salutis**, Aquidabã, v.2, n.1, p.5-9, 2012.

LUNDGREN, A et al. Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. **Infect Immun.**, v. 73, n. 1, p. 523-31, 2005.

LUNDGREN, A. et al. *Helicobacter pylori*-Specific CD4⁺ T Cells Home to and Accumulate in the Human *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Mucosa. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. p. 5612–5619, 2005.

MALFERTHEINER, P; CHAN, FK; MCCOLL, KE. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1449-1461, 2009.

MARSHALL, B. J. The *Campylobacter pylori* story. **Scand J Gastroenterol**, v. 23, suppl. 146, p. 58-66, 1988.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.1, n. 8390, p. 1311-1315, 1984.

MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 1, n. 8336, p. 1273-1275, 1983.

MARSHALL, BJ. *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterol**, v. 89, n. 8, S116-128, 1994.

PATEL, S. K. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard?, **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 26, p. 12847-12859, 2014.

PEEK, R. M JR; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 1, p. 28-37, 2002.

PEREZ-PEREZ, G. I. et al. Role of cytokine polymorphisms in the risk of distal gastric cancer development. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.14, p. 1869-73, 2005.

REDDICK, L. E; ALTO, N M. Bacteria Fighting Back: How Pathogens Target and Subvert the Host Innate Immune System. **Mol Cell.**, v. 54, n. 2, p. 321-8, 2014.

RICCI, V; ROMANO, M; BOQUET, P. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. **World J Gastroenterol.**, v. 17, n. 11, p. 1383-1399, 2011.

ROCHA, G. A. et al. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by cobas core

Elisa in adults from Minas Gerais, Brazil. **Brazil Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 10, p. 1263-1268, 1998.

Shi Y, et al. Helicobacter pylori-Induced Th17 Responses Modulate Th1 Cell Responses, Benefit Bacterial Growth, and Contribute to Pathology in Mice. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5121-9, 2010.

SILVA, E. A. W. **Estudo do Helicobacter pylori na mucosa gástrica: história clínica, endoscopia digestiva alta, exame anatomopatológico e resposta imune**. 2014. Dissertação (mestrado). Universidade de Uberaba. Uberaba, 2014.

SOUTO, F.J.D. et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, n.2, p. 171-174, 1998.

SZABO, S. J et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-69, 2000.

VENEGAS, A et al. Downregulated Th17 responses are associated with reduced gastritis in Helicobacter pylori-infected children. **Mucosal Immunol**, v. 6, p. 950-59, 2013.

WALKER, M.M.; LOGAN, R. P. H. ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection. **BMJ**, v. 323, n. 7318, p.920-922, 2001.

WEYDEN, M. B. V. D.; ARMSTRONG, R. M.; GREGORY, A. T. The 2005 nobel prize in physiology or medicine: the Helicobacter story illustrates some of the human hallmarks of revolutionary research. **Med. J. Aust.**, Australia, v. 183, n. 11-12, p.612-614, 2005.

WHITEHEAD, R. The classification of chronic gastritis: current status. **J Clin Gastroenterol**, v. 21, suppl 1, S 131-134, 1995.

YAGI, R; ZHU, J; PAUL, W. E. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. **Int Immunol.**, v. 23, n. 7, p. 415-420, 2011.

ZARRILLI, R; RICCI, V; ROMANO, M. Molecular response of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori-induced cell damage. **Cell Microbiol.** v. 1, n. 2, p. 93-99, 1999.

ZHANG, D. H. et al. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 34, p. 21597-603, 1997.

ZHENG, W; FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Science**, v. 89, n. 4, p. 587-96, 1997.

APÊNDICE A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M () F ()

DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO :

Nº

APTO:

BAIRRO:

CEP:

TELEFONE: DDD ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:****ESTUDO DO PERFIL DE PACIENTES SUBMETIDOS A PESQUISA DE *HELICOBACTER PYLORI*: ANÁLISE ENDOSCÓPICA E DOS FATORES DETERMINANTES DA ATIVIDADE LINFOCITÁRIA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA GÁSTRICA (ROR-Y, FOXP3 E GATA3)****PESQUISADOR:** ARINEY COSTA DE MIRANDA**CARGO/FUNÇÃO:** PROFESSOR DO CURSO DE MEDICINA - UFPA

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA Nº 7112

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	<input type="checkbox"/>	RISCO MÉDIO	<input type="checkbox"/>
RISCO BAIXO	<input checked="" type="checkbox"/>	RISCO MAIOR	<input type="checkbox"/>

4- DESCRIÇÃO DA PESQUISA :

A proposta em estudo consiste no exame de pequenos fragmentos retirados do estômago (biópsias) de pacientes com manifestações clínicas de doença inflamatória do estômago (queimação, azia, empachamento) e que tenha sido pós-consulta médica indicado a realização de Endoscopia Digestiva Alta com pesquisa de *H. pylori*.

O procedimento acima será realizado por um Médico - Endoscopista experiente, sendo que o material recolhido imediatamente será analisado por teste bioquímico (Teste da Urease), para a identificação da presença ou ausência do *H. pylori*, e posteriormente encaminhado para estudo histopatológico por técnica específica. No Laboratório do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (NMT-UFGPA) também será investigado quantitativamente e qualitativamente as células inflamatórias, identificado o tipo de resposta imunológica e a correlação com gastrite e presença ou não da bactéria *H. pylori* no material analisado.

O resultado (laudo) da endoscopia será entregue normalmente aos pacientes e ou seus responsáveis no prazo normal, sem que haja qualquer atraso que possa gerar interferência no tratamento dos pacientes. As informações obtidas para o estudo específico acima, serão utilizadas somente para a presente pesquisa e serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada qualquer informação que possa levar a sua identificação.

Os pacientes submetidos à endoscopia correm risco de reação aos sedativos utilizados, sangramento local após biópsias e raramente perfuração dos seguimentos manipulados. Contudo, afim de prevenir tais problemas, os procedimentos serão realizados por profissionais experientes nas técnicas, altamente qualificados para exercer tais atividades, regulamentados pelo Conselho regional de Medicina.

O benefício principal esperado para os pacientes que participarão do grupo de estudo é que o material que será recolhido pelas biópsias e enviado para o Laboratório do NMT-UFGPA, será analisado por métodos modernos de Biologia Molecular e equipe

de pesquisadores conceituados e experientes na área, os quais fornecerão resultados fidedignos para os pacientes e ou seus responsáveis, ajudando no diagnóstico correto e preciso da patologia gástrica presente ou não, assim como especificidades da positividade para o *H. pylori* ou não, informações essas que quando necessárias poderão ser utilizadas para o tratamento desses pacientes por seus respectivos médicos responsáveis. Além do que, todos estarão contribuindo de forma significativa para a ampliação do conhecimento na área.

Este estudo trará benefícios tanto aos pacientes quanto aos profissionais de saúde ao esclarecer pontos importantes da resposta inflamatória (gastrites) estimulada pela bactéria *H. pylori*, mediada pelos linfócitos T, seus subgrupos e transcritores, trazendo conhecimentos modernos e abrangentes para serem aplicados em prevenção e tratamento dessa condição de doença. No entanto, deixamos claro que somente ao final do trabalho é que poderemos tirar conclusões definitivas a respeito dos benefícios conseguidos por esse estudo.

É garantida aos pacientes, a liberdade de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu diagnóstico e tratamento.

Em caso de dano pessoal, diretamente provocado pelo procedimento realizado pelo pesquisador e sua equipe de pesquisa (Endoscopia Digestiva Alta com Biópsia Gástrica), os pacientes terão assistência médica adequada, bem como indenizações legalmente estabelecidas por leis.

O paciente tem direito a se manter informado a respeito dos resultados parciais da pesquisa para isto, a qualquer momento do estudo o paciente, seus responsáveis e ou familiares quando autorizados pelo mesmo, terão acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de dúvidas.

O principal investigador é o Prof. MSC . Ariney Costa de Miranda CRM 7112 PA, que poderá ser encontrado no endereço profissional Rua Dom Romualdo de Seixas Nº 1476, ED. Evolution 22º andar, sala 2202, Umarizal – CEP 66055200, Belém-PA, Fone : 32301644.

Este trabalho será realizado com recursos próprio do autor, não tendo financiamento ou coparticipação de nenhuma instituição de pesquisa.

Não haverá despesas aos participantes geradas por sua inclusão no estudo em nenhuma fase da pesquisa, assim como não haverá nenhum pagamento pela sua participação.

DECLARAÇÃO

Declaro que compreendi as informações que li ou que me foram explicadas sobre o trabalho em questão. Discuti com o Dr. Ariney Costa de Miranda sobre minha decisão em participar desse estudo, ficando claro para mim, quais são os propósitos da pesquisa, o procedimento que será realizado, os possíveis desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação não será paga, nem terei despesas geradas pela participação da pesquisa. Concordo voluntariamente de participar desse estudo, podendo retirar meu consentimento a qualquer momento sem necessidade de justificar o motivo da desistência, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido durante o mesmo.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

#Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

APÊNDICE B**PROTOCOLO DE PESQUISA**

Paciente nº: _____

CARACTERÍSTICAS GERAIS:

1. Sexo:
 - a. Feminino
 - b. Masculino

2. Idade: _____

DIAGNÓSTICO**CLÍNICO:** _____**CLASSIFICAÇÃO ENDOSCÓPICA:**

1. Topografia:
 - a. Pangastrite
 - b. Gastrite de Antro
 - c. Gastrite de Corpo

2. Categoria:
 - a. Enantematosa
 - b. Erosiva plana
 - c. Erosiva elevada
 - d. Atrófica
 - e. Hemorrágica
 - f. Refluxo
 - g. Pregas mucosas hiperplásicas

3. Grau de atividade:
 - a. Leve
 - b. Moderada
 - c. Intensa

TESTE DA UREASE:

- a. Positivo
- b. Negativo

ANEXO A

NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do Papel dos Fatores de Transcrição dos Linfócitos T FOXP3, GATA-3, T-BET E ROR-Y positivos, na atividade inflamatória de gastrites e sua relação com a Infecção pelo Helicobacter Pylori.

Pesquisador: ARINEY DA COSTA MIRANDA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 21707413.4.0000.5172

Instituição Proponente: Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 576.418

Data da Relatoria: 01/04/2014

Apresentação do Projeto:

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), é uma bactéria gram-negativa que coloniza a mucosa gástrica e passou a ser conhecida após o advento da endoscopia. Os quadros de infecção pelo *H. pylori* com presença de lesão celular, processo regenerativo e infiltrado inflamatório da mucosa gástrica, acrescida da presença de folículos linfóides, caracterizam as gastrites. A alteração primária que ocorre após a colonização com o *H. pylori* é a gastrite crônica ativa, no tocante a resposta do hospedeiro, o *H. pylori* estimula indiretamente a ativação de uma cascata de citocinas, responsáveis pelo desenvolvimento do processo inflamatório. A infecção pelo *H. pylori*, induz as células epiteliais gástricas a secretarem interleucinas, com propriedades quimiotáticas para neutrófilos e células mononucleares, tais como IL-8, IL-6 e a IL-1, levando a uma resposta proliferativa, com denso infiltrado de neutrófilos e células plasmáticas na mucosa gástrica, induzindo uma resposta inflamatória aumentada, com intensa reação dos neutrófilos, levando a uma gastrite crônica ativa, com subsequente aumento nos danos à mucosa gástrica. Vários estudos recentes têm demonstrado que além do importante papel das citocinas, os fatores de transcrição dos linfócitos T ativados e expressos durante o processo inflamatório, podem ser bons marcadores para a identificação dos subtipos dessas células, caracterizando e entendendo melhor seu comportamento em diversas situações. Objetivamos com esse estudo, determinar a linhagem

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (01)3201-6857 E-mail: cepbel@ufpa.br

NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 576.410

desses linfócitos, identificando-os através de seus fatores de transcrição positivos para FOX P3, GATA-3, T-BET e ROR-Y, quantificando-os e correlacionando-os com a infecção presente, compreendendo melhor o papel destes na identificação dos subgrupos de linfócitos presentes na resposta inflamatória causada pelo H.Pylori. O estudo a ser realizado será do tipo Prospectivo Transversal com consentimento permitido via TCLE, para tal utilizaremos amostras retiradas de biópsias gástricas via Endoscopia Digestiva Alta de cem pacientes com indicação clínica adequada para realização do exame, onde será confirmado positividade ou não para o H. Pylori, presença ou ausência e classificação das gastrites, assim como identificação via biologia molecular dos transcritores dos linfócitos T (FOXP3, GATA-3, T-BET E ROR-Y positivos) e suas respectivas respostas imunes. Os achados serão correlacionados e interpretados para chegarmos ao melhor entendimento do papel desses transcritores de linfócitos na atividade inflamatória de gastrites e sua relação com a infecção pelo H. Pylori.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Quantificar a presença de linfócitos T, identificando-os através dos fatores de transcrição positivos para FOX P3, GATA-3, T- BET e ROR-Y , correlacionando-os com a intensidade, tipo e grau de atividade das gastrites, bem como com a presença e intensidade de infecção pelo H. pylori.

Objetivos secundários:

- Descrever os principais achados clínicos e endoscópicos dos pacientes estudados;
- Identificar nas amostras coletadas os indivíduos H. Pylori positivos;

-Identificar a presença de linfócitos T e de seus fatores de transcrição positivos por Biologia Molecular específica para FOXP3, GATA-3,T-BET e ROR-Y de fragmentos da mucosa gástrica dos indivíduos participantes do estudo, biopsiados no ato da realização de endoscopia digestiva alta;

- Quantificar os linfócitos efetores Th1 através de seu fator de transcrição T-BET correlacionando com o tipo, intensidade de gastrite e infecção pelo H. Pylori;

- Quantificar os linfócitos efetores Th2 através de seu fator de transcrição GATA-3 correlacionando com o tipo, intensidade de gastrite e infecção pelo H. Pylori;

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal
UF: PA Município: BELEM

CEP: 66.055-240

Telefone: (91)3201-6957

E-mail: cepbel@ufpa.br

NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 575.418

- Quantificar os linfócitos efetores Th17 através de seu fator de transcrição ROR- γ correlacionando com o tipo, intensidade de gastrite e infecção pelo H. Pylori;

- Quantificar os linfócitos reguladores TReg através de seu fator de transcrição FOXP3 correlacionando com o tipo, intensidade de gastrite e infecção pelo H. Pylori.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios bem delineados no projeto, como apresentado abaixo:

Riscos:

Os pacientes submetidos à endoscopia correm risco de reação aos sedativos utilizados, sangramento local após biópsias e raramente perfuração dos segmentos manipulados. Contudo, afim de prevenir tais problemas, os procedimentos serão realizados por profissionais experientes nas técnicas, altamente qualificados para exercer tais atividades, regulamentados pelo Conselho regional de Medicina.

Benefícios:

O benefício principal esperado para os pacientes que participarão do grupo de estudo é que o material que será recolhido pelas biópsias e enviado para o Laboratório do NMT-UFPA, será analisado por métodos modernos de Biologia Molecular e equipe de pesquisadores conceituados e experientes na área, os quais fornecerão resultados fidedignos para os pacientes e ou seus responsáveis, ajudando no diagnóstico correto e preciso da patologia gástrica presente ou não, assim como especificidades da positividade para o H. Pylori, informações que, quando necessárias, poderão ser utilizadas para o tratamento desses pacientes por seus respectivos médicos responsáveis. De modo indireto, haverá, indiretamente, contribuição de forma significativa para a ampliação do conhecimento na área em estudo. Logo, trará benefícios tanto aos pacientes quanto aos profissionais de saúde ao esclarecer pontos importantes da resposta inflamatória (gastrites) estimulada pela bactéria H. Pylori, mediada pelos linfócitos T, seus subgrupos e transcritores, trazendo conhecimentos modernos e abrangentes para serem aplicados em prevenção e tratamento dessa condição de doença. No entanto, deixamos claro que somente ao final do trabalho é que poderemos tirar conclusões definitivas a respeito dos benefícios conseguidos por esse estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa factível de ser realizada no período proposto.

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal
UF: PA Município: BELEM

CEP: 66.055-240

Telefone: (91)3201-6857

E-mail: ceptel@ufpa.br

NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 576.418

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cartas de colaboração anexadas e com as assinaturas correspondentes, folha de rosto de acordo.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi identificado na relatoria passada:

- 1) Na página onde o sujeito da pesquisa irá assinar deve constar o título da pesquisa, o participante não pode assinar uma folha onde não consta o título da pesquisa;
- 2) Observar data de coleta de amostras na nova submissão ao CEP e colocar no cronograma o item COLETA DAS AMOSTRAS;
- 3) Visto que o projeto não propõe a criação de um banco de amostras, as mesmas não podem ser armazenadas para estudos posteriores. Retirar que haverá retenção de amostras para participação em banco na plataforma.

Uma vez que as pendências supracitadas foram resolvidas, o projeto é dado como aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Eram poucas as pendências identificadas na relatoria passada e todas foram resolvidas. Desta forma, o protocolo de pesquisa será dado como aprovado Ad-Referendum.

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-6857

CEP: 68.055-240

E-mail: cepbel@ufpa.br

NÚCLEO DE MEDICINA
TROPICAL-NMT/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 576.410

BELEM, 01 de Abril de 2014

Assinador por:
ANDERSON RAJOL RODRIGUES
(Coordenador)

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-6857 E-mail: cepbel@ufpa.br

