

Daniela Maria Rocha Martins

*Helicobacter pylori* e o Cancro Gástrico

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016



Daniela Maria Rocha Martins

*Helicobacter pylori* e o Cancro Gástrico

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Daniela Maria Rocha Martins

*Helicobacter pylori* e o Cancro Gástrico

A aluna

---

(Daniela Maria Rocha Martins)

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas

## SUMÁRIO

Metade da população mundial encontra-se infectada por *Helicobacter pylori*. Apesar da sua elevada prevalência, apenas 3% dos casos de infecção desenvolvem carcinoma gástrico. Devido à sua gravidade, torna-se imperativo o estudo aprofundado dos mecanismos bacterianos que desencadeiam esta patologia. Tanto as suas características morfológicas como bacteriológicas dotam este microorganismo de uma capacidade ímpar de se evadir aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro, ao mesmo tempo que apresenta uma forte virulência e uma capacidade de ataque às células do hospedeiro, induzindo as lesões epiteliares e a inflamação constante dos tecidos que originam o processo de carcinogénese. Os principais factores de virulência da *H. pylori* incluem as citotoxinas CagA e VacA, responsáveis pelas alterações celulares mais severas e, sem as quais, esta bactéria não possuiria potencial carcinogénico. O processo de carcinogénese inicia-se com a gastrite superficial, passando pela inflamação crónica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e, por fim, carcinoma. Aquando da suspeita de carcinoma gástrico, deve ser efectuado o diagnóstico da infecção por *H. pylori* e, uma vez confirmada a presença da bactéria, esta deve ser erradicada antes de se proceder a qualquer tratamento para o carcinoma. Visto tratar-se de uma bactéria altamente prevalente, a terapia de erradicação varia consoante a resistência bacteriana a determinados antibióticos, sendo a terapia tripla a terapia de primeira linha.

## ABSTRACT

Half the world's population is infected with *Helicobacter pylori*. In spite of its high prevalence, only 3% of all infected subjects develop gastric adenocarcinoma. Because of its severity, an in-depth study of the bacterial mechanisms that trigger carcinogenesis is imperative. Both its morphological and bacterial characteristics give this microorganism a unique ability to evade the host's immunologic system components, as well as presenting a strong virulence and aptitude to attack host's epithelial cells, inducing the epithelial lesions and constant inflammation that generates the carcinogenesis process. *H. pylori*'s main virulence factors include the cytotoxins CagA and VacA, both responsible for the most severe cellular alterations and, without which this bacterium would not present carcinogenic potential. The carcinogenesis process begins with superficial gastritis, through chronic inflammation, atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and lastly, carcinoma. Whenever there is a suspicion of gastric carcinoma, the diagnosis of the infection by *H. pylori* must be made and, once the presence of the bacteria is confirmed, it must be eradicated before any cancer treatment is started. Since this is a highly prevalent bacterium, the eradication therapy varies with the bacterial resistance to certain antibiotics, with the triple therapy being the first line of treatment for the eradication of *H. pylori*.

## AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer às minhas orientadoras Prof. Doutora Céu Costa e Prof. Doutora Sandra Soares por toda a disponibilidade, orientação, dedicação e conselhos ao longo do período de evolução desta monografia.

Gostaria de agradecer à minha família e amigos, em especial à minha mãe e irmã, pelo apoio e carinho que me prestaram ao longo do percurso académico e sem os quais não teria sido possível atingir esta etapa.

## ÍNDICE

I. Introdução .....	1
II. <i>Helicobacter pylori</i> : Caracterização .....	2
1. Epidemiologia.....	2
i. Evolução histórica e geográfica .....	2
ii. Prevalência e incidência .....	5
iii. Factores de risco.....	7
2. Morfologia .....	8
i. Estrutura .....	9
ii. Genoma .....	12
3. Bacteriologia.....	22
i. Factores de virulência.....	22
ii. Colonização da mucosa gástrica.....	27
4. A resposta imunológica .....	31
i. Resposta imune inata.....	32
ii. Resposta imune adaptativa .....	35
5. Transmissão .....	36
i. Transmissão oral-oral.....	37
ii. Transmissão gastro-oral .....	37
iii. Transmissão fecal-oral .....	38
iv. Transmissão iatrogénica (ocupacional).....	38
v. Transmissão ambiental: ingestão de água contaminada.....	38
vi. Transmissão ambiental: ingestão de alimentos contaminados.....	39
vii. Zoonoses .....	40
6. Doenças associadas.....	40
III. Carcinoma gástrico.....	42

1. Epidemiologia.....	42
2. Etiologia e factores de risco.....	44
i. Factores de risco ambientais.....	44
ii. Factores de risco inerentes ao doente.....	47
3. Infecção por <i>H. pylori</i> e carcinoma gástrico.....	49
4. Carcinogénese.....	50
i. Inflamação gástrica.....	50
ii. Lesões pré-cancerígenas.....	51
iii. Carcinoma gástrico.....	52
IV. Diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i> no carcinoma gástrico.....	53
1. Importância do diagnóstico da infecção.....	53
2. Técnicas de diagnóstico invasivas.....	54
i. Endoscopia.....	54
3. Técnicas de diagnóstico decorrentes da endoscopia.....	54
i. Histologia.....	54
ii. Cultura celular.....	55
iii. RUT (Teste rápido à urease).....	55
4. Técnicas de diagnóstico não invasivas.....	56
i. UBT (Teste à ureia presente no ar expirado).....	56
ii. Serologia.....	56
iii. SAT (Detecção fecal de antígenos).....	57
5. Técnicas baseadas no DNA bacteriano.....	58
i. Objectivos: determinação de resistências aos antibióticos, quantificação, caracterização genómica.....	58
ii. PCR.....	59
iii. PCR em tempo real.....	59
iv. PCR-RFLP.....	60

V. Tratamento: Erradicação da <i>H. pylori</i> .....	60
1. Terapias de primeira, segunda e terceira linha .....	60
VI. Conclusão .....	62
VII. Bibliografia.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa do mundo ilustrativo do percurso tomado pelas migrações humanas (setas) e o tempo, em anos, que levaram essas migrações a acontecer. Os círculos correspondem à Europa, Ásia e Nova Zelândia (adaptado de Correa e Piazzuelo, 2012). 2
- Figura 2** – Prevalência da infecção por *H. pylori* a nível mundial (adaptado de The Helicobacter Foundation, 2006). ..... 6
- Figura 3** – Morfologia da *H. pylori* (adaptado de O’Rourke e Bode, 2001). ..... 9
- Figura 4** – Formas cocóides de *H. pylori*. A - Fase inicial denotando-se a forma em U da célula. B - Conversão para forma cocóide (adaptado de O’Rourke e Bode, 2001)... 10
- Figura 5** – Alguns mecanismos responsáveis pela diversidade genética na *H. pylori*. (adaptado de Cooke *et al.*, 2005). ..... 12
- Figura 6** – Sistemas reguladores de um e dois componentes expressos pela *H. pylori* (adaptado de Keilberg e Otterman, 2016). ..... 14
- Figura 7** – Representação esquemática da *cagPAI*. Os genes sombreados representam genes discutidos neste capítulo (adaptado de da Costa *et al.*, 2015). ..... 17
- Figura 8** – Interação entre a *H. pylori* e a mucosa gástrica. A – Sobrevivência no ambiente ácido. B – Deslocamento até às células epiteliares por meio de flagelos. C – Aderência aos receptores celulares do hospedeiro por meio de adesinas. D – Formação de pedestal. E – Libertação de toxinas e consequentes danos nos tecidos (adaptado de Kao *et al.*, 2016). ..... 28
- Figura 9** – Representação esquemática da resposta inflamatória à infecção por *H. pylori* (adaptado de Wilson e Crabtree, 2007). ..... 34
- Figura 10** – Incidência mundial de cancro gástrico nos homens ao longo dos anos (adaptado de Globocan, 2012). ..... 42

<b>Figura 11</b> – Incidência mundial de cancro gástrico nas mulheres ao longo dos anos (adaptado de Globocan ,2012).....	42
<b>Figura 12</b> – Mortalidade mundial estimada para cancro gástrico em 2012 nos homens (adaptado de Globocan, 2012).....	43
<b>Figura 13</b> – Mortalidade mundial estimada para cancro gástrico em 2012 nas mulheres (adaptado de Globocan, 2012).....	43
<b>Figura 14</b> – Evolução das lesões pré cancerígenas. 1 - Normal; 2- Gastrite superficial; 3 - Gastrite atrófica; 4 - Metaplasia intestinal (adaptado de Park e Kim, 2015). .....	51
<b>Figura 15</b> – Cascata histológica de Correa (adaptado de Fox e Wang, 2007).....	52
<b>Figura 16</b> – Resumo esquemático das terapias de erradicação da <i>H. pylori</i> (adaptado de Malfertheiner <i>et al.</i> , 2012).....	61

ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1** – Populações genéticas ancestrais de *H. pylori* identificadas (adaptado de Correa e Piazzuelo, 2012). ..... 3

**Tabela 2** – Prevalência da infecção por *H. pylori* em adultos (adaptado de Bastos *et al.*, 2013, Calvet *et al.*, 2013, Krashias *et al.*, 2013, Ozaydin *et al.*, 2013 e Sodhi *et al.*, 2013). ..... 6

**Tabela 3** – Prevalência da infecção por *H. pylori* em crianças (adaptado de Bastos *et al.*, 2013, Calvet *et al.*, 2013, Pacheco *et al.*, 2013, Yu *et al.*, 2014 e Ghasemi-Kebria *et al.*, 2013). ..... 7

**Tabela 4** – Doenças associadas à infecção por *H. pylori* (adaptado de Kuipers, 1997; Alakkari *et al.*, 2011, den Hollander *et al.*, 2013, Shmueli *et al.*, 2012; Blaser, 1998; Furuta e Delchier, 2009; Shirin *et al.*, 2008; Bulajic *et al.*, 2014; Alvarez-Arellano e Maldonado-Bernal, 2014; Shiotani *et al.*, 2001, Magen e Delgado, 2014; Franceschi *et al.*, 2014, Faria *et al.*, 2013). ..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides

APC – Células apresentadoras de antígenos (do inglês, Antigen Presenting Cells)

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BabA – Adesina de ligação ao antígeno de grupo sanguíneo (do inglês, Blood group Antigen-Binding Adhesin)

CagA – Gene A associado a citotoxina (do inglês, Cytotoxin-Associated Gene A)

*cagPAI* – Zona de patogenicidade *cag* (do inglês, *cag* Pathogenicity Island)

COX-2 – Ciclo-oxigenase-2

CTLA-4 – Proteína 4 citotóxica associada a linfócitos T (do inglês, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

IBP – Inibidor da Bomba de Protões

IFN – Interferão

IL – Interleucina

IMC – Índice de Massa Corporal

JAM-A – Molécula A de adesão nas junções (do inglês, junctional adhesion molecule-A)

LPS – Lipopolissacarídeos

MALT – Tecido linfóide associado à mucosa (do inglês, Mucosa-associated lymphoid tissue)

MAP – Proteína activada pelo mitogénio (do inglês, Mitogen Activated Protein)

MIP – Proteína inflamatória dos macrófagos (do inglês, Macrophage Inflammatory Protein)

NAP – Proteína Activadora dos Neutrófilos (do inglês, Neutrophil-Activating Protein)

NF- $\kappa$ B – Factor nuclear  $\kappa$ B (do inglês, Nuclear Factor  $\kappa$ B)

OipA – Proteína inflamatória externa (do inglês, outer inflammatory protein)

OMP – Proteína de membrana externa (do inglês, Outer Membrane Protein)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)

PCR-RFLP – PCR com Restrição no Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos (do inglês, Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism)

RT-PCR – PCR em Tempo Real (do inglês, Real Time PCR)

RUT – Teste Rápido à Urease (do inglês, Rapid Urease Test)

SabA – Adesina de ligação ao ácido siálico (do inglês, sialic acid-binding adhesin)

SAT – Teste Fecal de Antígenos (do inglês, Stool Antigen Test)

SPEM – Metaplasia espasmolítica com expressão de polipéptidos (do inglês, Spasmolytic Polypeptide-Expressing Metaplasia)

SSH – Hibridização de Supressão Subtractiva (do inglês, Suppression Subtractive Hybridization)

T4SS – Sistema de Secreção Tipo 4 (do inglês, Type 4 Secretion System)

TLR – Receptor do tipo *Toll* (do inglês, Toll-like Receptor)

TNF – Factor de necrose tumoral (do inglês Tumor Necrosis Factor)

UBT – Teste à urease expirada (do inglês, Urease Breath Test)

VacA – Citotoxina Vacuolizante A (do inglês, Vacuolating cytotoxin A)

## **I. Introdução**

Em 2012, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou definitivamente a *Helicobacter pylori* como agente carcinogénico do Grupo 1 (carcinogénico para humanos) (IARC, 2016), com base no facto de esta bactéria estar associada ao desenvolvimento de adenocarcinomas gástricos (da Costa *et al.*, 2015).

Apesar de o estômago de cerca de 50% da população mundial estar colonizado com *H. pylori*, nem todos os indivíduos infectados desenvolvem doenças relacionadas com esta bactéria. Para tal, é necessário haver uma conjugação entre os factores de virulência inerentes à bactéria e os factores relacionados com o hospedeiro (da Costa *et al.*, 2015).

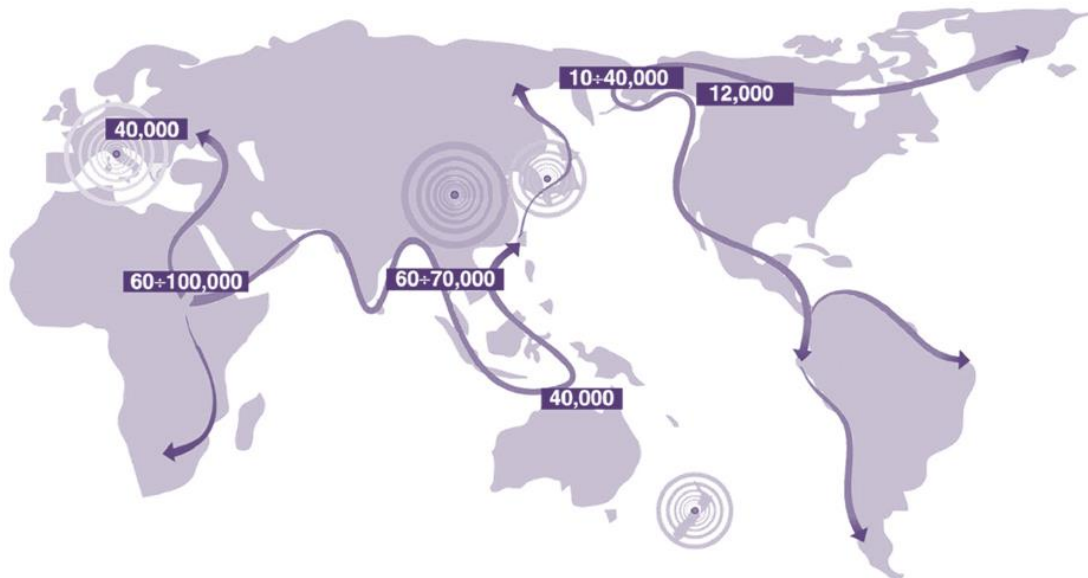
Esta dissertação tem como objectivo não só caracterizar a infecção por *H. pylori*, mas também a sua relação com o desenvolvimento de carcinomas gástricos, recorrendo-se à revisão bibliográfica. Para tal, foi realizada uma pesquisa utilizando as bases de dados MEDLINE, PubMed, Web of Science e Google Scholar, através das palavras-chave: “*H. pylori*”, “*gastric cancer*”, “*bacteriology*”, “*infection*”, “*eradication*”, “*virulence factors*”, “*diagnosis*”, “*treatment*”, associadas ou não, e, muitas vezes complementadas com termos específicos ao assunto em questão. A pesquisa foi limitada a artigos publicados entre Abril de 1997 e Março de 2016, pela riqueza e relevância da informação, em língua inglesa, apesar de também terem sido consultados manuais em suporte físico.

## II. *Helicobacter pylori*: Caracterização

### 1. Epidemiologia

#### i. Evolução histórica e geográfica

Antes de ocorrerem as migrações para fora do continente africano há sessenta mil anos atrás, a *H. pylori* já teria colonizado e já se teria estabelecido no estômago da população humana de há pelo menos cem mil anos atrás. Após a migração de África, o Homem terá viajado até à Ásia pela costa sul, atravessando a Índia e chegando à Austrália. Os baixos níveis do mar permitiram que a população se tenha difundido pela Indonésia e Nova Zelândia. Os Humanos modernos fixaram-se na Europa há cerca de trinta mil a quarenta mil anos, vindos tanto do território da actual Turquia para a Europa de leste e até à costa do Mar Mediterrâneo. Finalmente, o *Homo sapiens*, colonizado por *H. pylori*, atravessou o estreito de Bering há aproximadamente doze mil anos, colonizando o continente americano, conforme se pode verificar na Figura 1 (Correa e Piazuolo, 2012).



**Figura 1** – Mapa do mundo ilustrativo do percurso tomado pelas migrações humanas (setas) e o tempo, em anos, que levaram essas migrações a acontecer. Os círculos correspondem à Europa, Ásia e Nova Zelândia (adaptado de Correa e Piazuolo, 2012).

Durante a última década, ao isolarem-se diferentes genótipos de estirpes de *H. pylori* obtidas de variadas populações no mundo, ficou demonstrado que a diversidade genética desta bactéria reflecte as migrações humanas e, conseqüentemente, a separação étnica e geográfica entre grupos de humanos. Esta análise permitiu identificar quatro grupos principais de populações de *H. pylori* com distribuição geográfica distinta: hpEurope, hpAfrica1, hpAfrica2 e hpEastAsia. Análises posteriores dividiram os grupos hpEastAsia e hpAfrica1 em subpopulações. Estudos recentes identificaram, ainda, outros grupos principais: hpNEAfrica, hpÁsia2 e hpSahul (Correa e Piazzuelo, 2012).

**Tabela 1** – Populações genéticas ancestrais de *H. pylori* identificadas (adaptado de Correa e Piazzuelo, 2012).

População de <i>H. pylori</i>	Distribuição geográfica
hpEurope	Europa, Médio-orientes, Índia e Irão
hpAfrica1	
hspWAfrica	Oeste de África
hspSAfrica	Sul de África
hpAfrica2	Sul de África
hpNEAfrica	Etiópia, Somália, Sudão e Norte da Nigéria
hpEastAsia	
hspEAsia	Este da Ásia
hspMaori	Taiwan, Polinésia e Melanésia
hspAmerínd	Continente Americano
hpAsia2	Norte da Índia, Bangladesh, Tailândia e Malásia
hspIndia	Índia
hpSahul	Austrália e Papua Nova Guiné

Conforme se pode verificar na Tabela 1, um estudo observou que a maioria das estirpes de *H. pylori* isoladas na Índia era homóloga da estirpe hpEurope. Num estudo recente a estirpes de *H. pylori* no Camboja verificou-se que as estirpes isoladas pertenciam tanto ao grupo hpEurope como ao subgrupo hspEAsia, o que está concordante com três migrações humanas ancestrais: da Índia, introduzindo a estirpe hpEurope no Sudeste da Ásia, da China, transportando a estirpe do subgrupo hspEAsia e do Sul da China até à Tailândia, transportando a estirpe hpAsia2. Este estudo também sustenta duas migrações humanas mais recentes, que se deram nos últimos 200 anos: da China para a Tailândia e Malásia transportando a estirpe hspEAsia e da Índia para a Malásia, levando consigo as estirpes hpAsia2 e hpEurope. Um estudo a estirpes isoladas de *H. pylori* na

Malásia classificou-as como pertencendo aos grupos hpEastAsia, hpAsia2 e hpEurope e revelou um novo subgrupo originário no grupo hpAsia2, o hspIndia (Correa e Piazzuelo, 2012).

Na Oceânia deram-se duas migrações ancestrais: uma para a Papúa Nova Guiné e Austrália e outra, mais recente, estendeu-se pela Melanésia e daí para as ilhas da Polinésia. Estas migrações foram acompanhadas por duas estirpes de *H. pylori* distintas, a hpSahul e a hspMaori, respectivamente. Após a colonização pela Europa, a estirpe hpEurope é predominante (Correa e Piazzuelo, 2012).

Aquando da travessia do estreito de Bering desde a Ásia até a América do Norte, o Homem era portador de *H. pylori*, sendo, portanto, possível encontrar actualmente nos seus descendentes estirpes de *H. pylori* com genótipos asiáticos. Vários estudos foram conduzidos encontrando-se dados que suportam esta teoria. No entanto, também foram encontrados outros genótipos de *H. pylori*, devido à colonização do continente Americano na Era dos Descobrimentos por populações tão distintas (Correa e Piazzuelo, 2012).

Com a travessia do Oceano Atlântico levada a cabo por Cristóvão Colombo, deu-se a colonização da América Central por Espanha, com a conseqüente mistura de heranças genéticas (europeia e ameríndia). Regra geral, a população da América Latina com ascendência espanhola é predominantemente colonizada por estirpes hpEurope, ao passo que a estirpe hpAmerind original está reservada para uma minoria de nativos Ameríndios isolados. A descoberta do Brasil por Pedro Álvares Cabral conduziu a uma exportação de escravos africanos para a América do Sul, atingindo um pico com as colonizações por parte de Inglaterra, Holanda, França e Espanha. Embora a estirpe original predominante fosse a hspAmerind (derivada da estirpe hpEastAsia), actualmente nota-se uma predominância das estirpes hpEurope nos residentes da América Latina e hspWAfrica em indivíduos americanos de raça negra ou mista. É, então, possível, co-relacionar a evolução demográfica humana com as variantes genómicas da *H. pylori* (Correa e Piazzuelo, 2012).

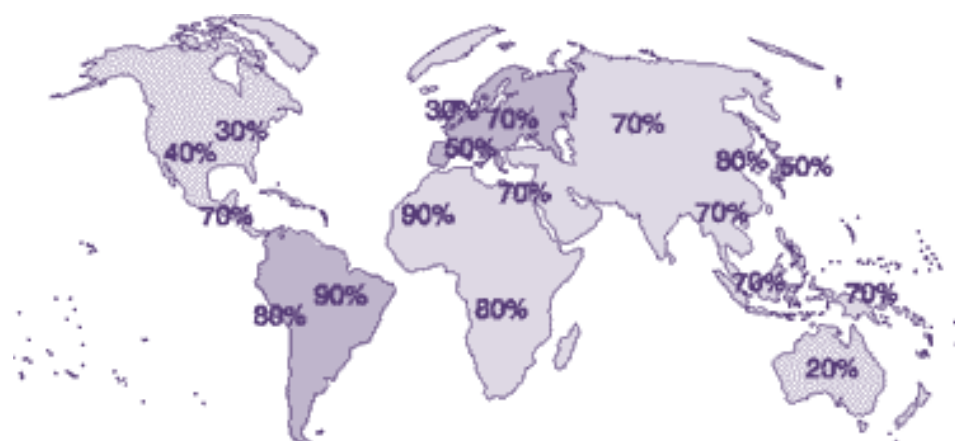
Apesar de a associação entre gastrite e úlcera péptica ser conhecida desde a década de 40 do século XX, a cultura das bactérias responsáveis não havia sido possível até então. Em 1982, o histopatologista australiano Robin Warren observou uma semelhança entre estas bactérias e as bactérias do género *Campylobacter* (Hellstrom, 2006) e baptizou-as provisoriamente de *C. pyloridis*, corrigindo pouco tempo depois para *C. pylori* (Andersen e Wadström, 2001). Barry Marshall, um estagiário de medicina interna do laboratório Stewart Goodwin em Perth, na Austrália, conseguiu, finalmente, cultivar esta bactéria. Inadvertidamente, durante as férias da Páscoa, as placas de petri com as culturas bacterianas foram esquecidas na incubadora durante cinco dias, ao invés dos dois dias recomendados para bactérias do género *Campylobacter*. Quando as culturas foram observadas após as férias, detectaram-se colónias pequenas com aspecto brilhante. Marshall isolara e cultivara pela primeira vez bactérias provenientes do estômago de um paciente com gastrite (Hellstrom, 2006). A descoberta atribuída a ambos os investigadores foi reportada em 1984 (Whalen e Massidda, 2015).

No entanto, após repetidas observações, rapidamente se tornou claro que, apesar de a *C. pylori* se assemelhar a bactérias do género *Campylobacter* em variados aspectos, apresentava características morfológicas e fisiológicas importantes que diferiam das bactérias deste género. Assim, em 1989 a *C. pylori* foi transferida para um novo género e rebaptizada de *H. pylori* (Andersen e Wadström, 2001).

## **ii. Prevalência e incidência**

A infecção por *H. pylori* afecta aproximadamente 50% da população mundial, sendo responsável por 75% dos casos de cancro gástrico (Peleteiro *et al.*, 2014). Os dados relativos à prevalência e incidência da infecção por *H. pylori*, bem como o conhecimento dos seus factores de risco em diferentes idades contribuem para uma melhor compreensão da relação entre esta infecção e a frequência do cancro gástrico. (Bastos *et al.*, 2013b)

A Figura 2 permite confirmar a distribuição mundial da infecção por esta bactéria, notando-se uma maior prevalência em países em desenvolvimento, como países Africanos e da América Latina, ao passo que em países desenvolvidos verifica-se uma menor prevalência, como é o caso do Canadá ou Austrália (The Helicobacter Foundation, 2006).



**Figura 2** – Prevalência da infecção por *H. pylori* a nível mundial (adaptado de The Helicobacter Foundation, 2006).

Na Tabela 2 é possível comparar com maior pormenor a prevalência da infecção por *H. pylori* em adultos de várias nacionalidades.

**Tabela 2** – Prevalência da infecção por *H. pylori* em adultos (adaptado de Bastos *et al.*, 2013, Calvet *et al.*, 2013, Krashias *et al.*, 2013, Ozaydin *et al.*, 2013 e Sodhi *et al.*, 2013).

País	Prevalência (%)	Autores
Portugal	84.2	(Bastos <i>et al.</i> , 2013a)
República Checa	23.5	(Bures <i>et al.</i> , 2012)
Letónia	79.2	(Leja <i>et al.</i> , 2012)
Chipre	39.8	(Krashias <i>et al.</i> , 2013)
Turquia	82.5	(Ozaydin <i>et al.</i> , 2013)
Canadá	37.9	(Sethi <i>et al.</i> , 2013)
Arábia Saudita	28.3	(Hanafi e Mohamed, 2013)
Marrocos	75.5	(Benajah <i>et al.</i> , 2013)
Índia	58	(Sodhi <i>et al.</i> , 2013)
América Latina <sup>a</sup>	79.4	(Porrás <i>et al.</i> , 2013)

<sup>a</sup> América Latina inclui: Colômbia, Costa Rica, Honduras, Nicarágua, México e Chile.

Em Portugal, um estudo demonstrou uma elevada prevalência da infecção por *H. pylori*, o que pode ser explicado devido às alterações relativamente recentes das condições socioeconómicas dos portugueses, que têm vindo a melhorar desde o final da ditadura, embora hoje em dia se denote uma grande variabilidade nestas condições (Bastos *et al.*, 2013a). Um outro estudo demonstra que a prevalência da infecção por *H. pylori* é também bastante elevada nas crianças portuguesas, conforme explicado na Tabela 3. Portugal apresenta uma elevada prevalência da infecção na adolescência, similar à observada em países em desenvolvimento, o que demonstra que a aquisição da infecção durante este período não deve ser negligenciada, contribuindo para a elevada prevalência que se verifica na idade adulta. (Bastos *et al.*, 2013b)

**Tabela 3** – Prevalência da infecção por *H. pylori* em crianças (adaptado de Bastos *et al.*, 2013, Calvet *et al.*, 2013, Pacheco *et al.*, 2013, Yu *et al.*, 2014 e Ghasemi-Kebria *et al.*, 2013).

País	Prevalência (%)	Autores
Portugal	66.2	(Bastos <i>et al.</i> , 2013b)
República Checa	4.9	(Bures <i>et al.</i> , 2012)
Itália	13.3	(Dore <i>et al.</i> , 2012)
México	38	(Duque <i>et al.</i> , 2012)
Brasil	41.1	(Pacheco <i>et al.</i> , 2013)
China	32.1	(Yu <i>et al.</i> , 2014)
Irão	50.5	(Ghasemi-Kebria <i>et al.</i> , 2013)

O estudo levado a cabo por Bastos e colaboradores permitiu concluir que a incidência da infecção por *H. pylori* é elevada a longo da adolescência, independentemente da elevada prevalência em crianças (Tabela 3). O estatuto social representado pela educação dos pais foi um factor relevante na prevalência em crianças, sendo o tabaco o principal responsável pela incidência da infecção durante a adolescência (Bastos *et al.*, 2013b).

### iii. Factores de risco

Os potenciais factores de risco de uma infecção por *H. pylori* foram reportados em vários estudos, sem se conseguir determinar uma causa definitiva para que ocorra a

infecção. Estudos realizados em populações europeias demonstraram que a baixa estatura, o consumo de tabaco e um estatuto socioeconómico reduzido estão associados a indivíduos com resultados positivos nos exames serológicos. O facto de existirem duas ou mais crianças no agregado familiar, a baixa capacidade económica dos pais ou a institucionalização da criança são factores determinantes para a aquisição da infecção na infância (Ford e Axon, 2010).

O sexo e a idade não estão associados a um aumento do risco de infecção, já que variados estudos demonstram que não existe diferença significativa na taxa de infecção entre indivíduos do sexo feminino e masculino, tanto em adultos como em crianças. Vários factores relacionados com a residência dos indivíduos infectados foram documentados, tais como viver em áreas rurais, agregados familiares elevados e ingestão de águas contaminadas (Eusebi *et al.*, 2014).

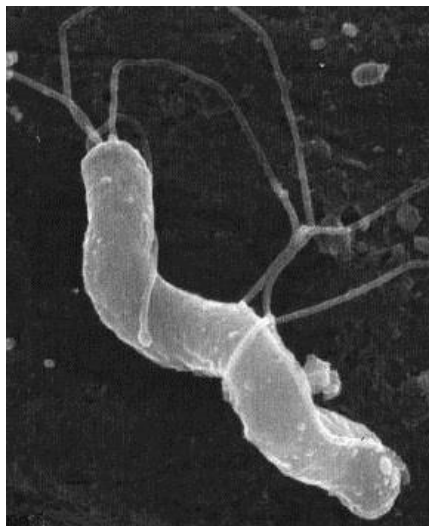
Como é possível verificar, a maioria destes factores são consequência do desenvolvimento socioeconómico. A melhoria das condições de higiene diminui a prevalência da infecção. No entanto, em áreas altamente populosas a transmissão é mais elevada em comparação com áreas com menor densidade populacional, devido a um menor contacto entre indivíduos. Factores genéticos inerentes ao hospedeiro também foram associados com a infecção e são especialmente importantes na progressão da doença (Vale e Vitor, 2010).

## **2. Morfologia**

A *H. pylori* é um bacilo espiralado (Figura 3), com 2,5 a 3,5µm de comprimento e 0,5 a 1µm de diâmetro, com um a seis flagelos polares (Tavira, 2000). Esta morfologia está relacionada com uma mobilidade extrema (O'Rourke e Bode, 2001). A sua forma helicoidal permite uma movimentação rotacional do tipo “parafuso”, facilitando a entrada e a deslocação através da camada mucosa do estômago (Keilberg e Ottemann, 2016).

### **i. Estrutura**

Sendo uma bactéria que cora por Gram negativo, a sua membrana celular é constituída por duas camadas, a membrana externa e parede celular, separadas entre si pelo periplasma. O citoplasma contém o material nucleóide e ribossomas. Análises ao peptidoglicano demonstraram que este é estruturalmente menos complexo do que o observado noutras bactérias que coram por Gram negativo. Na região polar, junto à inserção dos flagelos existe a membrana polar que é constituída por um conjunto de enzimas ATPases provavelmente aqui localizadas com o fim de gerar energia para a motilidade da bactéria ou para a síntese da parede celular (O'Rourke e Bode, 2001).



**Figura 3** – Morfologia da *H. pylori* (adaptado de O'Rourke e Bode, 2001).

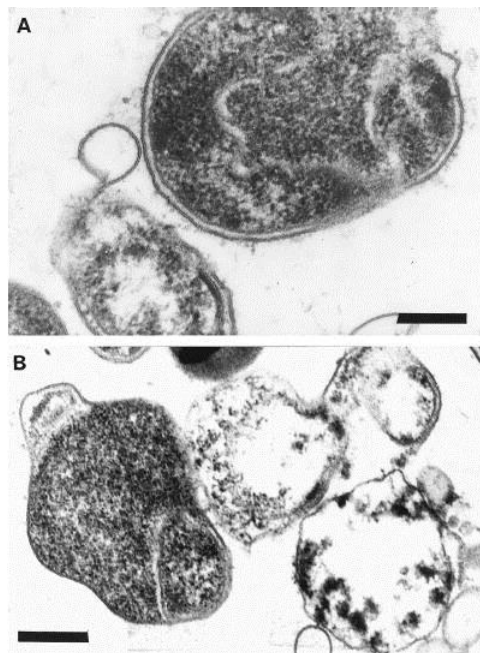
Foram identificados grânulos intracelulares de polifosfato em três localizações principais: no citoplasma, no polo flagelar e associados à membrana celular. Os grânulos localizados no citoplasma são os de maiores dimensões, amorfos e com aparência de vacúolos, sendo considerados fontes de energia e reservatórios de fósforo. Os grânulos localizados no polo flagelar são mais pequenos, mais compactos e mais heterogêneos, possivelmente fornecendo energia necessária para a motilidade celular. Os grânulos associados à membrana celular são os de menores dimensões e intervêm directamente na manutenção da membrana citoplasmática (O'Rourke e Bode, 2001).

Além dos grânulos de polifosfato, foram detectados agregados citoplasmáticos. Os agregados de maiores dimensões eram amorfos em forma de vacúolos e continham

ferro, fósforo, oxigénio e carbono. Os agregados de menores dimensões continham os mesmos elementos à excepção do fósforo. Após estas observações pressupõe-se que a ferritina é um importante componente do citoplasma destas bactérias e permite que a bactéria utilize reservas de nutrientes para sobreviver em condições desfavoráveis, tais como o ambiente gástrico humano (O'Rourke e Bode, 2001).

O perfil proteico da membrana externa da *H. pylori* é bastante diferente do de outras bactérias que coram por Gram negativo, já que não se encontram proteínas de elevado peso molecular em grande quantidade, mas sim várias proteínas de baixo peso molecular, entre as quais porinas e/ou adesinas para as células epiteliais gástricas. (Alm e Noonan, 2001).

Estão identificados oito antigénios de membrana na *H. pylori*: ureases de superfície que se libertam da superfície celular quando necessário, outra proteína plasmática foi observada com um tamanho similar ao da urease, a GroEL, dois lipopolissacarídeos (LPS) cuja especificidade dependa da estirpe de *H. pylori* onde se inserem e porinas sem função determinada (O'Rourke e Bode, 2001).



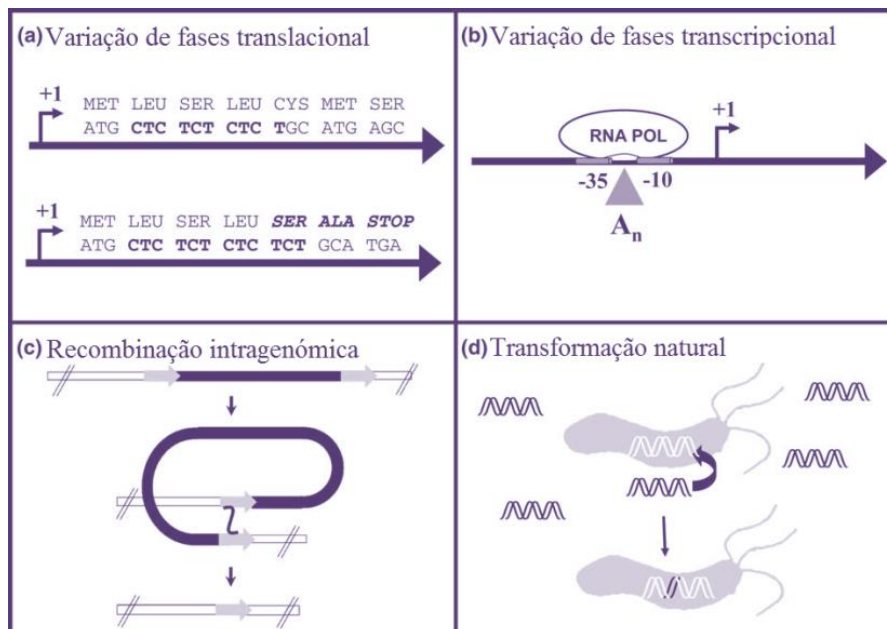
**Figura 4** – Formas cocóides de *H. pylori*. A - Fase inicial denotando-se a forma em U da célula.  
B - Conversão para forma cocóide (adaptado de O'Rourke e Bode, 2001).

Tal como ocorre com outras bactérias espiraladas, a *H. pylori* tem a capacidade de se enrolar sobre si própria, formando células cocóides (que possuem antígenos específicos) à medida que envelhece (Figura 4). Este processo inicia-se com a regressão do periplasma num dos lados da bactéria, acumulando-se o material mais denso, o que resulta em células com forma de U. Com o aumento do cilindro protoplasmático a bactéria converte-se, então, na forma cocóide, mantendo o sistema de dupla membrana. Análises ao peptidoglicano durante esta fase demonstraram modificações dramáticas tais como as observadas em bactérias do género *Bacillus* durante a fase de esporulação. Vários parâmetros sustentam o conceito de que as formas cocóides são inactivas e não têm capacidade de crescimento, nomeadamente a diminuição dos níveis da expressão de DNA, RNA e mRNA. À medida que os ácidos nucleicos se degradam, a fragmentação do RNA deixa de ocorrer ao acaso e não há estudos que comprovem que existe potencial de membrana suficiente para processos tais como a fosforilação oxidativa. Por outro lado, foi observada a manutenção da integridade celular e da síntese de DNA em culturas celulares de formas cocóides após três meses. Os polifosfatos detectados nas células cocóides sugerem que o metabolismo celular pode ser mantido. A concentração de certas proteínas diminui, apesar de não se denotar diminuição de outras proteínas num período de 21 dias. A respiração celular também fica diminuída, embora seja possível detectá-la em 40% das células após 45 dias em cultura *in vitro*. Também foi detectada uma redução em algumas proteínas de ligação à penicilina na forma cocóide. Existe controvérsia quanto à viabilidade das células nesta forma, que podem ser: viáveis, não viáveis mas num estado dormente ou simplesmente mortas. Existe a possibilidade de serem reservatórios quando a bactéria se encontra em condições ambientais desfavoráveis, de estarem envolvidas na transmissão da infecção ou de serem responsáveis pelo fracasso dos tratamentos. Deve ser comprovado que células não viáveis sejam responsáveis pela re-infecção do hospedeiro e é necessário que seja possível cultivar células provenientes desse hospedeiro re-infectado para se poder considerar que as células cocóides são uma forma dormente capaz de re-infecção (O'Rourke e Bode, 2001).

## ii. Genoma

A *H. pylori* é caracterizada por uma extensa diversidade de alelos e pela sua variabilidade genética, resultantes da combinação de uma taxa de mutação elevada e da troca frequente de material genético em infecções por estirpes diferentes desta bactéria no mesmo estômago humano (Kennemann *et al.*, 2011).

A variabilidade genética é conseguida por mecanismos de mutação pontual, recombinação e trocas genéticas laterais, todos estes comuns na *H. pylori*. Devido às frequentes trocas genéticas, a descendência genética só é distinguível entre estirpes de *H. pylori* isoladas de indivíduos da mesma família. A *H. pylori* é uma bactéria altamente competente na transformação de DNA e a sua diversificação é facilitada pela aquisição de material genético proveniente de outras estirpes de *H. pylori* ou mesmo de outras espécies bacterianas que co-colonizam o ambiente gástrico (Figura 5). A recombinação intragenómica é frequente na *H. pylori* e resulta na deleção ou duplicação dos segmentos de DNA envolvidos (Cooke *et al.*, 2005).



**Figura 5** – Alguns mecanismos responsáveis pela diversidade genética na *H. pylori*. (adaptado de Cooke *et al.*, 2005).

Tanto a variação antigénica como a variação de fases são capazes de originar uma extensa diversidade fenotípica. O comprimento de repetições de sequências de DNA em vários genes varia de estirpe para estirpe, no entanto nem todos estes genes estão

presentes em todas as estirpes e nem sempre estão presentes repetições ou genes candidatos a fase variável. As repetições podem também ser encontradas na região promotor de vários genes e podem mediar a variação fenotípica ao nível da transcrição. Cerca de metade destes genes codifica estruturas transmembranares que, se expressas diferencialmente, podem alterar a aparência da bactéria para as células do sistema imunitário do hospedeiro (Cooke *et al.*, 2005).

Na Fig. 5 é possível observar-se a representação esquemática de alguns mecanismos que originam diversidade genética na *H. pylori*. A variação de fases translacional consiste na inserção ou deleção de repetições de sequências de DNA na região de codificação do gene, capaz de suprimir ou activar a expressão genética resultando na formação de um codão *stop* prematuro. A variação de fases transcripcional consiste na modulação reversível do nível da expressão genética através da inserção ou deleção de uma repetição de sequência de DNA na região promotor de um gene, o que impede as interacções entre o promotor do DNA e a RNA polimerase. A recombinação intragenómica entre repetições de sequências de DNA resulta na deleção ou duplicação de sequências de DNA ou na formação de sequências quiméricas de DNA. A transformação natural da *H. pylori* com DNA extracelular e a sua recombinação pode introduzir novas sequências de DNA na bactéria e diversificar o seu fundo genético (Cooke *et al.*, 2005).

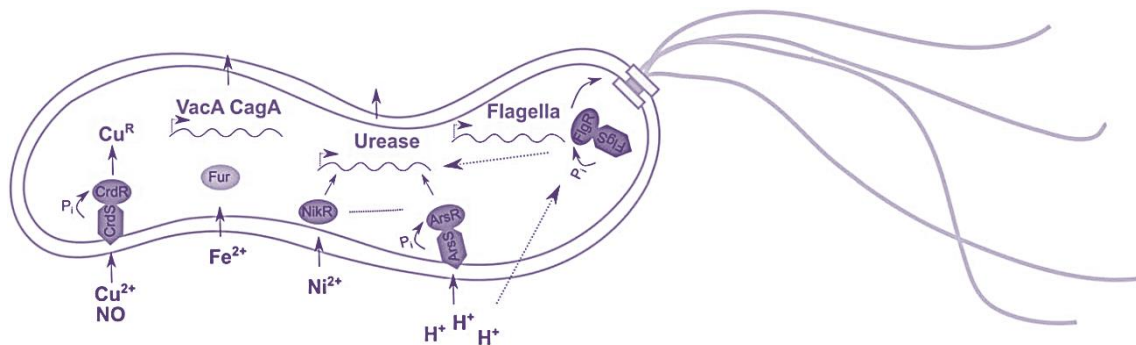
Em 1980 foi sequenciado o genoma *H. pylori* 26695 no Reino Unido, pelo Institute for Genomic Research, a partir de bactérias provenientes do estômago de um paciente com gastrite. Em 1994 foi sequenciado o genoma *H. pylori* J99 nos Estados Unidos da América, numa colaboração entre a Astra AB (agora AstraZeneca PLC) e a Genome Therapeutics Corporation, a partir de bactérias provenientes de um paciente com úlcera duodenal e duodenite. Entre 6 e 7% do genoma de ambas as estirpes contém genes que não são encontrados na outra estirpe. Mais de 70% destes genes não têm função conhecida e são específicos da *H. pylori* (Alm e Noonan, 2001). Actualmente estão sequenciados 160 genomas de estirpes de *H. pylori* (BioCYC, 2016).

Esta bactéria possui um número pequeno de proteínas reguladoras, incluindo sistemas reguladores de um e dois componentes que captam sinais ambientais e permitem à

bactéria responder às alterações. Os sistemas de dois componentes consistem em duas partes:

- Uma histidina cinase com um domínio sensível N-terminal e uma cinase de domínio C-terminal, que sofre autofosforilação da histidina após o reconhecimento do sinal;
- Um regulador de resposta com um receptor N-terminal com aspartato e um C-terminal de saída (Keilberg e Ottemann, 2016).

Após a interação entre a cinase e o regulador de resposta, o fosfato pode ser transferido da histidina para o aspartato, o que leva a uma resposta envolvida em processos tais como a divisão celular, expressão genética, motilidade ou virulência. No genoma da estirpe *H. pylori* 26695 identificaram-se quatro cinases sensíveis e sete proteínas reguladoras de resposta, além de proteínas quimiotáticas (Keilberg e Ottemann, 2016).



**Figura 6** – Sistemas reguladores de um e dois componentes expressos pela *H. pylori* (adaptado de Keilberg e Otterman, 2016).

Na *H. pylori* estão identificados três sistemas reguladores de dois componentes, o ArsR/S para a resposta ao ácido, o CrdR/S para a determinante da resistência ao cobre e o FlgR/S para regulação dos flagelos. Tanto o sistema ArsR/S como o FlgR/S são ativados por pH ácido. O sistema ArsR/S regula a expressão genética de diversos genes, incluindo a activação da transcrição da urease. Este sistema tem um papel duplo no controlo da urease: activa a transcrição do *cluster* genético da urease e regula o seu transporte, através de mecanismos dependentes e não dependentes da fosforilação. O sistema CdrR/S responde ao cobre e à presença óxido nítrico, sendo necessário para a resistência a este metal e, nalgumas estirpes, para o *stress* ácido. O sistema FlgR/S

controla a motilidade da *H. pylori* através da regulação da expressão genética flagelar. Além da regulação dos genes flagelares que é independente do pH, este sistema também regula genes de aclimatização ao ambiente ácido, tais como o *cluster* genético da urease, de uma forma dependente do pH. Os sistemas reguladores de um componente são activadores da transcrição que captam directamente os sinais ambientais. Os dois sistemas de um componente mais estudados respondem à concentração de metais, o sistema NikR e o sistema Fur. O sistema NikR é um regulador transcripcional que responde ao níquel. É necessária uma interacção entre o sistema NikR e o ArsR/S para uma transcrição máxima da urease. O regulador geral Fur é sensível à presença de ferro e outros metais e é utilizado pela *H. pylori* como um regulador global da transcrição, importante para múltiplas respostas ao *stress* e virulência. Este sistema é capaz de actuar como um activador ou repressor na sua forma ligada ao ferro ou na sua conformação apo (não ligada ao ferro). Além de intervir em diversos processos celulares dependentes de ferro, o sistema Fur regula factores de virulência activando a expressão da citotoxina Vacuolizante A (VacA) e da citotoxina associada ao gene A (CagA) (Keilberg e Ottemann, 2016).

Para a persistência a longo-prazo enquanto patógeno extracelular no ambiente gástrico é necessário que a *H. pylori* responda e se adapte de forma contínua à resposta imune e inflamatória do hospedeiro, além de outras alterações fisiológicas que o hospedeiro possa sofrer. Para tal, foram desenvolvidas pela bactéria múltiplas estratégias que permitem responder às mudanças das condições ambientais. Na ausência de múltiplos elementos reguladores, a *H. pylori* pode adoptar uma estratégia adaptativa alternativa através da qual a persistência é conseguida pela contínua diversificação e selecção dos indivíduos mais aptos, originando diversas variantes fenotípicas que promovem a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, modulam a adesão e modificam a interacção bactéria-hospedeiro (Cooke *et al.*, 2005).

A *H. pylori* tem um genoma relativamente pequeno, com aproximadamente metade do tamanho do genoma da *Escherichia coli* (Cooke *et al.*, 2005), constituído por vários genes que codificam importantes factores de virulência e que estão associados a patologias gástricas, tais como o *cagA* e o *vacA*, genes associados a citotoxinas. Outros genes presentes na zona de patogenicidade *cag* (*cagPAI*) menos estudados são também

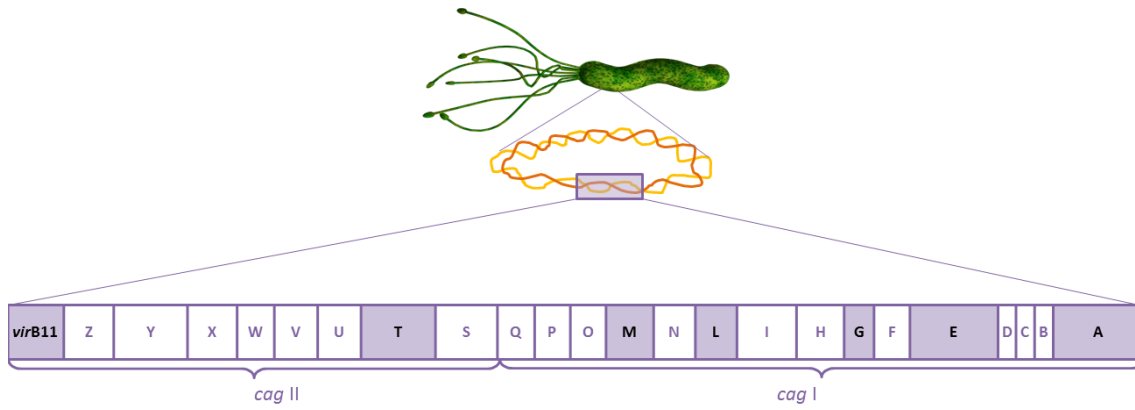
reconhecidos como potenciais indutores de lesões, tais como genes que codificam proteínas membranares (*babA*, *oipA*, *sabA* e *hopQ*) e genes de motilidade (*flaA* e *flaB*) (da Costa *et al.*, 2015), podendo ser classificados em três categorias:

- Genes específicos de uma estirpe, presentes em algumas estirpes de *H. pylori*, entre os quais a *cagPAI* que codifica o sistema de secreção bacteriana tipo 4 (T4SS);
- Genes de fase variável, cujo estado muda durante o crescimento ou de modo a adaptar a fisiologia da bactéria ao ambiente, assegurando a sua sobrevivência (p.e. genes que codificam proteínas de membrana externa (OMPs));
- Genes que codificam diferentes estruturas e genótipos dependendo da estirpe, como é o caso do gene *vacA* (Roesler *et al.*, 2014).

A estrutura de vários genes varia entre estirpes ocidentais e orientais, sendo que estas diferenças podem influenciar a virulência (Roesler *et al.*, 2014).

### *cagPAI*

A *cagPAI* (Figura 7) é um segmento de DNA de 40kb que contém, aproximadamente, 31 genes, a maioria dos quais codifica o T4SS, e que pode ser dividido em duas secções: *cag I* e *cag II* (Roesler *et al.*, 2014). A *cagPAI* pode ser encontrada em cerca de 60% das estirpes ocidentais de *H. pylori*, ao passo que quase a totalidade das estirpes orientais (Este da Ásia) são *cagPAI* positivas. O rearranjo da *cagPAI* é um fenómeno bastante prevalente, com menor rearranjo nos genes *cagE* e *cagT* do que no gene *cagA*. Várias proteínas Cag fazem parte do aparelho T4SS com importante papel na injeção da citotoxina CagA para o interior das células epiteliais do hospedeiro, de entre as quais a CagE, CagG, CagM, CagT e *virB11*. Juntamente com o gene *cagA*, o gene *cagE* pode ser usado como marcador da *cagPAI* (da Costa *et al.*, 2015).



**Figura 7** – Representação esquemática da *cagPAI*. Os genes sombreados representam genes discutidos neste capítulo (adaptado de da Costa *et al.*, 2015).

O gene *virB11* codifica uma proteína com estrutura em forma de anel composta por seis unidades monoméricas (Terradot e Waksman, 2011). Tanto o gene *cagE* (Kutter *et al.*, 2008) como o *virB11* codificam proteínas transmembranares com actividade ATPase que fornece energia para a formação do T4SS e/ou o transporte do substrato e ambos podem ter um papel na carcinogénese gástrica (Terradot e Waksman, 2011)

O gene *cagG* é um marcador da região *cag I* e tem um papel importante na indução de IL-8, além de estar relacionado com a adesão às células epiteliais gástricas do hospedeiro, já que estirpes sem este gene têm a sua aderência diminuída e, conseqüentemente, uma redução na indução de IL-8 secretada pelas células do hospedeiro. Várias doenças gastrointestinais estão relacionadas com a existência deste gene, sem existir uma patologia específica associada (da Costa *et al.*, 2015).

A proteína CagL codificada pelo gene *cagL* interage com uma integrina do hospedeiro,  $\alpha 5\beta 1$ , que actua como receptor de superfície celular. Esta interacção estimula a libertação da citotoxina CagA para o interior das células e activa cinases de adesão focal (FAKs) e cinases SRC, apesar de este não ser um processo indispensável à fosforilação da CagA pelas cinases das células do hospedeiro (Wen e Moss, 2009).

O gene *cagM* é também um marcador da região *cag I* e a proteína por ele codificada forma uma estrutura de superfície com acção semelhante ao agente indutor do factor nuclear (NF)- $\kappa B$  mediando a secreção de IL-8. Também está envolvido na repressão da transcrição de H/K-ATPase, o que impede a expressão desta enzima gástrica humana inibindo significativamente a secreção ácida gástrica, o que pode representar a primeira

linha de defesa contra o ácido do estômago. O gene *cagM* está associado ao desenvolvimento de gastrites, úlceras pépticas e carcinoma gástrico (da Costa *et al.*, 2015).

O gene *cagT* é um marcador da região *cag* II. Quando localizada na membrana interna, a proteína CagT tem um papel importante no transporte da CagA para as células do hospedeiro, funcionando como uma proteína *chaperone*. Quando localizado na membrana externa, induz a secreção de IL-8. Este gene está associado a patologias gástricas graves, já que a deleção de frequência do gene *cagT* é superior em casos benignos relativamente a úlceras graves e carcinomas gástricos (da Costa *et al.*, 2015).

A presença do gene *cagA* está associada a graus de inflamação mais elevados, que podem conduzir ao desenvolvimento de patologias gastrointestinais mais graves, como úlcera péptica e cancro gástrico. Em países ocidentais, indivíduos infectados por estirpes *cagA* positivas têm um risco superior de úlcera péptica e cancro gástrico, ao passo que em países orientais (Este da Ásia) a maioria das estirpes é *cagA* positiva sem haver relação com patologias graves. O *cagA* é um gene polimórfico que expressa diferentes números de sequências repetidas localizadas na sua região 3'. Cada região repetida da proteína CagA contém motivos Glutamato-Prolina-Isoleucina-Tirosina-Alanina (EPIYA) incluindo um local de fosforilação da tirosina (Roesler *et al.*, 2014). Estirpes ocidentais *cagA* positivas de *H. pylori* contém no terminal C da EPIYA as sequências EPIYA-A, EPYIA-B e EPYIA-C (*cagA* tipo ABC), ao passo que estirpes Este da Ásia *cagA* positivas contém EPYIA-A e EPYIA-B, mas no lugar da sequência EPYIA-C contém a sequência EPYIA-D (*cagA* tipo ABD) (Vianna *et al.*, 2015, Roesler *et al.*, 2014). Cada proteína CagA proveniente de estirpes de *H. pylori* ocidentais tem uma sequência de motivos EPYIA que pode conter até três repetições EPYIA-C (*cagA* tipo ABC, ABCC ou ABCCC) sendo que quanto maior o número de repetições EPYIA-C, maior o risco de desenvolver carcinoma gástrico (Yamaoka, 2010). Estirpes que expressem a sequência EPYIA-D produzem níveis significativamente mais elevados de IL-8 (da Costa *et al.*, 2015).

### *vacA*

O gene que codifica a citotoxina VacA está presente em todas as estirpes de *H. pylori* e exibe diversidade de alelos em três regiões principais: a região s (sinal), a região i (intermédia) e a região m (média). Podem ocorrer diferentes combinações de dois alelos principais de cada região (s1, s2, i1, i2, m1 ou m2), o que resulta em toxinas VacA com diferentes capacidades de induzir vacuolização, sendo que a sua actividade citotóxica pode variar entre estirpes. Enquanto estirpes *vacA* s1/m1 são vacuolizantes, estirpes *vacA* s2/m2 são não vacuolizantes e só algumas estirpes *vacA* s1/m2 são capazes de induzir vacuolização, já que neste caso a capacidade de induzir vacuolização está dependente da zona i. Estirpes com o alelo s1 secretam activamente uma toxina e estão altamente relacionadas com úlceras e carcinoma gástrico, apesar de também se encontrar estirpes com a combinação s1/m2 ou genótipos s2 em pacientes com carcinoma gástrico. O subtipo m1 demonstra uma maior capacidade vacuolizante que o m2 e está associado a um risco mais elevado de desenvolver lesões do epitélio gástrico e cancro gástrico. O alelo determinante de citotoxicidade (i1) também está associado ao carcinoma gástrico (Roesler *et al.*, 2014).

Em países ocidentais indivíduos infectados por estirpes de *H. pylori* s1 ou m1 apresentam um maior risco de desenvolver úlcera péptica ou cancro gástrico, quando comparados com indivíduos infectados por estirpes s2 ou m2. Além disso, quase a totalidade das estirpes *cagA* positivas estão classificadas como s1, ao passo que quase todas as estirpes *cagA* negativas estão classificadas como s2/m2 (Roesler *et al.*, 2014).

### *OMPs*

Aproximadamente 4% do genoma *H. pylori* codifica uma diversidade de OMPs, classificadas em cinco famílias, sendo que a maior é a família Hop que inclui adesinas como a BabA (HopS), a SabA (HopP) e a OipA (HopH) (da Costa *et al.*, 2015).

A adesina de ligação ao antigénio de grupo sanguíneo (BabA) é uma OMP codificada pelo gene *babA2*. Apesar de estarem identificados três alelos *bab* (*babA1*, *babA2* e *babA3*), apenas o produto de gene *babA2* é funcionalmente activo (Pride *et al.*, 2001).

A BabA evoluiu em resposta aos padrões de glicosilação do muco do hospedeiro, o que permitiu a adaptação da *H. pylori* ao seu hospedeiro e a manutenção de uma colonização persistente (Wroblewski *et al.*, 2010). Este gene está associado a um risco mais elevado de úlcera duodenal e quando presente juntamente com os genes *cagA* e *vacA* s1 na mesma estirpe o risco de desenvolvimento de patologias severas é ainda mais elevado (Torres *et al.*, 2009).

A expressão do gene *sabA*, que codifica a adesina de ligação ao ácido siálico, é regulada ao nível da transcrição por variação de fases e por modulação da actividade transcripcional (da Costa *et al.*, 2015). A expressão desta proteína pode ser induzida ou impedida rapidamente por alterações exercidas pelo ambiente gástrico do hospedeiro (Wen e Moss, 2009). A activação do *sabA* é inversamente proporcional à secreção ácida pelas células do estômago. O estado activado da expressão da adesina de ligação ao ácido siálico (SabA) está associado ao desenvolvimento de metaplasia intestinal, gastrite atrófica e cancro gástrico (da Costa *et al.*, 2015) e garante a manutenção da colonização bacteriana no estômago (Wen e Moss, 2009).

Tal como ocorre com a SabA, a expressão da proteína inflamatória externa (OipA) pode ser activada ou desactivada. A OipA funcional relaciona-se com outros factores de virulência como a *cagPAI*, *vacA*, *iceA* e *babA* (da Costa *et al.*, 2015) e está associado a patologias gástricas mais graves, como úlcera duodenal e carcinoma gástrico (Keilberg e Ottemann, 2016), elevada densidade bacteriana, infiltração de neutrófilos (da Costa *et al.*, 2015), ao mesmo tempo que induz a expressão de IL-8 por um mecanismo independente da presença do gene *cagA* (Keilberg e Ottemann, 2016).

#### *dupA*

O gene *dupA* está localizado na região de plasticidade do genoma da *H. pylori*, onde se pode encontrar vários genes associados à patogenicidade (Yamaoka, 2010) e foi inicialmente descrito como um marcador de risco de úlcera duodenal e factor protector contra o cancro gástrico, apesar de alguns estudos demonstrarem que pode estar associado ao desenvolvimento de carcinoma gástrico. A sua função não é totalmente conhecida, mas possivelmente actua com outros genes da região de plasticidade para

formar um T4SS semelhante ao da *cagPAI* e está associado ao aumento da produção de IL-8 pelas células do hospedeiro. Pensa-se que a presença do gene *dupA* esteja envolvida na captação e transferência de DNA e transferência de proteínas. Experiências *in vitro* sugerem que a ausência deste gene está associada a uma maior susceptibilidade da bactéria ao pH ácido (Roesler *et al.*, 2014).

### *iceA*

O gene *iceA* foi relatado recentemente e possui duas variantes alélicas principais, a *iceA1* e a *iceA2*, embora a sua função não seja conhecida. A sequência do gene *iceA1* demonstra homologia com o gene *nlaIIIIR* da *Neisseria lactamica*, que codifica uma endonuclease de restrição CTAG-específica. Por outro lado, o gene *iceA2* não apresenta homologia com genes conhecidos e a função do seu produto é desconhecida. A expressão de *iceA1* é regulada por contacto entre a *H. pylori* e as células epiteliais humanas e este genótipo está associado ao aumento da expressão de IL-8 e inflamação aguda do antro do estômago. As variantes alélicas do gene *iceA* foram relacionadas com patologias, estando a variante *iceA1* associada a úlcera péptica e a variante *iceA2* associada a gastrite, apesar de estas associações variarem entre populações (da Costa *et al.*, 2015). No entanto, a presença do gene *iceA* não foi associada a cancro gástrico (Roesler *et al.*, 2014).

### *Lipopolisacarídeos*

Os LPS da *H. pylori* exibem variação de fases, definida como a elevada frequência das alterações fenotípicas dos LPS, um fenómeno associado à virulência noutras espécies bacterianas. Este processo resulta no ganho e perda reversível de certos epítopes LPS, havendo uma população bacteriana heterógena quanto à expressão de LPS. Assim, a variação de fases contribui para a virulência gerando heterogenicidade. Teoricamente, todas as estirpes de *H. pylori* podem expressar qualquer fenótipo LPS. Certas influências ambientais ou do hospedeiro seleccionam as bactérias que expressam o fenótipo mais adaptado, apesar de não estar identificado nenhum factor ambiental ou inerente ao hospedeiro que provoque alterações no fenótipo dos LPS por variações de fase. O antigénio-O dos LPS de mais de 80% das estirpes de *H. pylori* expressa

antigénios de grupo sanguíneo de Lewis, apesar de também se encontrarem outros antigénios de grupo sanguíneo. A elevada expressão de antigénios de Lewis está associada a um aumento no influxo de leucócitos polimorfonucleares (Appelmelk e Vandenbroucke-Grauls, 2001).

### **3. Bacteriologia**

#### **i. Factores de virulência**

De modo a ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro, garantir a sua persistência e ter sucesso como patógeno, a *H. pylori* necessita de certas características especiais, designadas de factores de virulência. Os principais factores de virulência da *H. pylori* incluem citotoxinas, factores de adaptação ao ambiente ácido gástrico, proteínas externas de membrana, e adjuvantes da motilidade (Kao *et al.*, 2016).

#### *CagA*

Esta é uma proteína imunodominante codificada por um dos genes presentes na zona de patogenicidade *cag* (*cagA*). Após ser libertada no interior das células epiteliais do hospedeiro, a tirosina sofre fosforilação por cinases Src e Abl nas sequências EPIYA. A CagA fosforilada interage com várias proteínas da célula do hospedeiro incluindo uma fosfatase celular (SHP-2) activando-as, o que provoca alterações morfológicas na célula, tais como alongamento e dispersão celular. Por sua vez, a CagA não fosforilada também exerce a sua acção nas células do hospedeiro: promovendo a perda da polaridade celular por inibição de certas cinases próprias das células do hospedeiro; associando-se à proteína esqueleto das junções de oclusão ZO-1 e à proteína transmembranar JAM-A (Molécula A de adesão nas junções) provocando uma malformação das junções de oclusão; e ainda activando uma  $\beta$ -catenina, o que leva à regulação por *feedback* positivo da transcrição de certos genes implicados na carcinogénese. A proteína CagA de certas estirpes de *H. pylori* é ainda capaz de induzir a expressão de IL-8 por activação do NF- $\kappa$ B (factor nuclear  $\kappa$ B) contribuindo para a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica. Deste modo, o contacto entre estirpes de *H.pylori* CagA positivas e as células do hospedeiro desencadeia múltiplas vias de transdução de sinal que aumentam o risco

de transformação celular maligna durante a colonização prolongada típica desta bactéria. Por este motivo, a proteína CagA é classificada como uma oncoproteína bacteriana (Cover e Peek, 2013).

### *VacA*

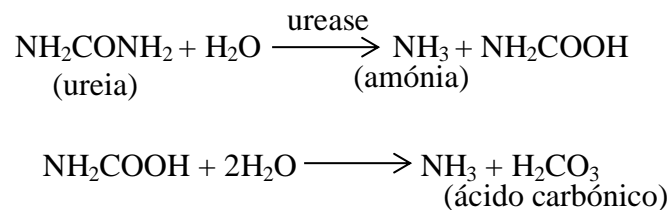
A citotoxina vacuolizante é um polipeptídeo secretado pela *H. pylori* e libertado na sua forma hidrossolúvel no espaço extracelular, podendo ficar retida na superfície da bactéria (Wen e Moss, 2009). Após exposição ao ambiente ácido gástrico, a citotoxina VacA sofre alterações na sua conformação transformando-se na sua forma activa (Suerbaum e Josenhans, 1999). A citotoxina VacA é capaz de induzir variados processos celulares, incluindo alterações na maturação dos endossomas, o que leva à vacuolização das células epiteliares. Esta citotoxina induz ainda a formação de canais intermembranares e a libertação do citocromo C das mitocôndrias, além de se ligar aos receptores da membrana das células do hospedeiro activando a resposta pró-inflamatória (Roesler *et al.*, 2014). A libertação do citocromo C conduz a apoptose celular (Shiota *et al.*, 2013). A citotoxina VacA tem também a capacidade de inibir especificamente a activação e proliferação dos linfócitos T. A proteína CagA e a citotoxina VacA podem inibir certos processos entre si, como por exemplo a estimulação da expressão de um supressor da apoptose (Mcl1) pela proteína CagA, inibindo a apoptose provocada pela citotoxina VacA (Yamaoka, 2010).

### *Motilidade*

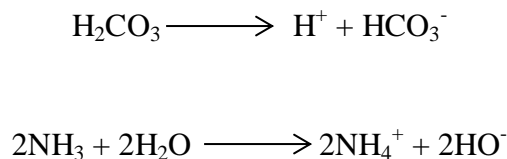
A *H. pylori* é uma bactéria com uma motilidade bastante elevada devido aos seus flagelos unipolares. Os filamentos flagelares da *H. pylori* compreendem dois componentes subunitários diferentes, as flagelinas FlaA e FlaB, ambas essenciais à motilidade necessária para a colonização. Bactérias com um défice na síntese de qualquer destas flagelinas têm uma colonização menos eficiente e bactérias que não expressem ambas as flagelinas são completamente avirulentas e não móveis. (Suerbaum e Josenhans, 1999).

### *Urease*

Antes da descoberta da *H. pylori*, pensava-se que o organismo humano era capaz de produzir uma urease gástrica. Hoje em dia, sabe-se que a fonte desta enzima é a *H. pylori*, que coloniza a mucosa gástrica humana. A urease é uma enzima fundamental para o metabolismo e virulência da *H. pylori*, para a colonização da mucosa gástrica e é um potente agente imunogénico que desenvolve a resposta inflamatória. De modo a contrariar a acidez do ambiente gástrico, a *H. pylori* produz urease, que catalisa a hidrólise da ureia em amónia e ácido carbónico, segundo as reacções:



No ambiente gástrico a libertação de duas moléculas de amónia e uma de ácido carbónico encontra-se em equilíbrio relativamente às suas formas desprotonada e protonada, respectivamente, originando um aumento do pH do estômago:



Contrariamente às ureases de outras espécies bacterianas, na *H. pylori* a urease não é estritamente citoplasmática, sendo também possível encontrar urease aderente à superfície celular ou libertada no meio (Mobley, 2001). A urease permite à bactéria a manutenção dos níveis de pH internos e periplasmáticos constantes, mesmo quando o pH do exterior é fortemente ácido, como é o caso do pH gástrico. Esta manutenção do pH previne um colapso da diferença de potencial transmembranar e a consequente morte da bactéria (Suerbaum e Josenhans, 1999). Esta enzima tem um papel importante na colonização bacteriana, estando demonstrado que bactérias que não produzem urease não são capazes de colonizar a mucosa gástrica. A amónia produzida, em conjunto com certos metabolitos dos neutrófilos, tem a capacidade de provocar danos no epitélio gástrico do hospedeiro através da formação de agentes carcinogénicos, sendo também

capaz de induzir alterações nas células epiteliais gástricas do hospedeiro, tais como aumento dos compartimentos intracelulares acídicos, alterações no transporte membranar vesicular, repressão da síntese de proteínas e ATP e bloqueio dos ciclos celulares. A urease pode estar envolvida na quimiotaxia de neutrófilos e monócitos para a mucosa gástrica e na produção de citocinas pró-inflamatórias (Roesler *et al.*, 2014). Além de ser um importante factor de virulência, a urease é usada na identificação taxonómica da *H. pylori*, no diagnóstico e avaliação após o tratamento e é uma importante candidata à produção de vacinas (Mobley, 2001).

### *Aderência*

A aderência bacteriana à superfície das células do hospedeiro é mediada por adesinas bacterianas, que podem ser proteínas, glucoconjugados ou lípidos envolvidos nas fases iniciais da colonização, que tornam a bactéria até mil vezes mais resistente a antibióticos do que bactérias não aderentes. Devido ao epitélio gástrico se encontrar em constante renovação, à produção de muco e aos movimentos peristálticos do estômago, a *H. pylori* desenvolveu o mecanismo de aderência, impedindo o seu percurso pelo tubo digestivo até ao exterior e assegurando a sua persistência no estômago do hospedeiro. A aderência da bactéria aos receptores celulares do hospedeiro induz alterações celulares que incluem cascatas de transdução de sinal, o que leva à infiltração de células inflamatórias (neutrófilos e monócitos) (Testerman *et al.*, 2001). A adesão da *H. pylori* ao epitélio facilita a libertação de outros factores de virulência para o interior das células do hospedeiro, tais como a CagA e a VacA (Wen e Moss, 2009).

A adesina BabA é responsável pela ligação aos antígenos Lewis-b (Testerman *et al.*, 2001) importante para a indução de quebras na dupla-hélice do DNA das células do hospedeiro (da Costa *et al.*, 2015). É uma OMP (proteína de membrana externa), que também se liga aos antígenos ABO (Roesler *et al.*, 2014). A aderência da *H. pylori* ao epitélio gástrico mediada pela BabA facilita a colonização, induz a inflamação da mucosa e promove a expressão de antígenos sialyl-Lewis x/a (Wen e Moss, 2009) através da indução de uma glicosiltransferase envolvida na biossíntese de antígenos de Lewis (da Costa *et al.*, 2015) fortalecendo a adesão pela adesina SabA (adesina de ligação ao ácido siálico) (Wen e Moss, 2009, Testerman *et al.*, 2001), ao mesmo tempo

que melhora a capacidade do T4SS de se ligar às células do hospedeiro, levando a uma resposta inflamatória mais forte (da Costa *et al.*, 2015). A adesina SabA é responsável pela capacidade de adesão da bactéria aos eritrócitos e é essencial na indução da fagocitose, além de estimular os neutrófilos do hospedeiro por mecanismos de mimetização (Roesler *et al.*, 2014).

Os LPS da *H. pylori* podem expressar antigénios que mimetizam ao nível molecular os antigénios de Lewis (a, b, X e Y) encontrados na superfície dos glucoconjugados das células epiteliais gástricas. Como o conteúdo em LPS varia consoante a estirpe de *H. pylori* e sofre variação antigénica e de fase dentro da mesma estirpe, a expressão de antigénios de Lewis nos seus LPS é bastante variada. Devido a esta variação, os LPS têm um papel importante na aderência às células epiteliares do hospedeiro (Testerman *et al.*, 2001).

A HopQ, além de exibir propriedades adesivas, é essencial para a deslocação da CagA e para as respostas mediadas por CagA das células do hospedeiro, tais como a formação de um tipo de fenótipo denominado *hummingbird* e o alongamento da forma celular, podendo ser útil no contacto entre o T4SS da *H. pylori* e a superfície das células do hospedeiro (da Costa *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a aderência da *H. pylori* às células epiteliais gástricas do hospedeiro pode ser independente de antigénios Lewis-b, sendo neste caso mediada por proteínas de membrana externa (OMPs) AlpA (HopC), AlpB (HopB) e HopZ (Testerman *et al.*, 2001) (Roesler *et al.*, 2014).

#### *Proteína Inflamatória Exterior (OipA)*

A OipA é uma OMP pró-inflamatória e está associada a uma alta densidade de *H. pylori*, infiltração severa de neutrófilos e níveis elevados de IL-8 na mucosa gástrica (Roesler *et al.*, 2014). Tem a capacidade de induzir a inflamação através da fosforilação de diversas vias de sinalização que normalmente interagem com a *cagPAI*. É responsável pela reacção inflamatória da *H. pylori* relacionada com a carcinogénese gástrica. A presença desta proteína é um marcador para patologias mais severas da

mucosa gástrica, incluindo carcinoma. Também intervém no processo de adesão da bactéria às células epiteliais gástricas (Shiota *et al.*, 2013).

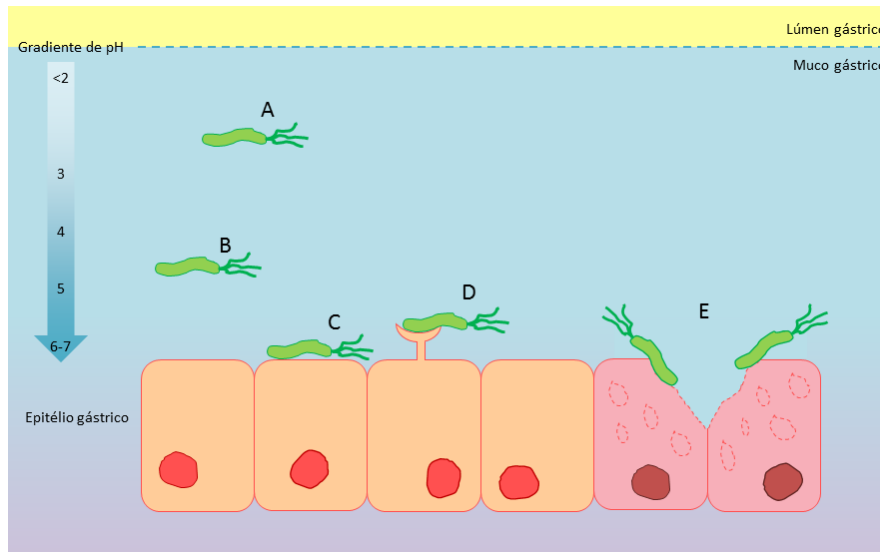
## **ii. Colonização da mucosa gástrica**

Devido ao seu baixo pH e à frequência do seu esvaziamento, o estômago não é um órgão favorável à colonização bacteriana. O epitélio do estômago é revestido por uma camada espessa de muco cujo objectivo é proteger as células do ácido. Tratando-se de um tecido glandular, o estômago é composto por inúmeras invaginações. Os valores de pH são mais baixos no lúmen e mais elevados na camada mucosa e nas invaginações. A *H. pylori* coloniza o muco que reveste o epitélio, sendo que a maioria da população se localiza próxima da superfície celular e muito poucas bactérias se localizam no muco distal, podendo ser encontrada tanto no interior como no exterior das glândulas. Ambas as localizações têm um pH mais neutro, o que é concordante com a observação de que a bactéria sobrevive por, aproximadamente, trinta minutos no pH 2 do lúmen. Por este motivo, é necessário que a *H. pylori* encontre rapidamente a sua localização alvo devendo mover-se do lúmen para a camada mucosa que reveste o epitélio gástrico para uma colonização eficaz, limitando a exposição ao ácido do lúmen e evitando a sua remoção, juntamente com os alimentos, para o intestino (Keilberg e Ottemann, 2016).

O estômago humano possui três regiões glandulares: o fundo, o corpo e o antro. A *H. pylori* entra no organismo pela cavidade oral, atravessando o esófago até ao estômago, onde coloniza o corpo e o antro, constituídos por diferentes tipos celulares. Esta diferença pode conduzir a diferentes concentrações de nutrientes e/ou compostos tóxicos. Inesperadamente, a *H. pylori* não coloniza o duodeno nem o intestino delgado, apesar do seu pH mais alcalino, ao contrário de outros géneros como *Salmonella* ou *Vibrio* (Keilberg e Ottemann, 2016).

O gradiente de pH é determinante no posicionamento da *H. pylori* relativamente à superfície celular (Figura 8). A bactéria reduz a concentração de HCl na sua proximidade, neutralizando-o devido à enzima urease, estabelecendo-se um ambiente de pH neutro ao redor da bactéria, por um processo descrito anteriormente. A subida do pH altera a viscosidade do muco, tornando-o mais fluído, o que facilita a motilidade da *H.*

*pylori*, que se desloca mais facilmente em soluções de viscosidade moderada (Kao *et al.*, 2016).



**Figura 8** – Interação entre a *H. pylori* e a mucosa gástrica. A – Sobrevivência no ambiente ácido. B – Deslocamento até às células epiteliares por meio de flagelos. C – Aderência aos receptores celulares do hospedeiro por meio de adesinas. D – Formação de pedestal. E – Libertação de toxinas e consequentes danos nos tecidos (adaptado de Kao *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a *H. pylori* tem a capacidade de se deslocar activamente afastando-se do pH ácido através do uso dos seus flagelos, combinado com um processo de quimiotaxia. A quimiotaxia facilita o afastamento da bactéria de condições desfavoráveis dirigindo-se a condições mais favoráveis, através da identificação por parte da bactéria das concentrações de substâncias benéficas e repelentes no ambiente circundante e permite uma entrada rápida e eficaz na camada mucosa pela bactéria, escapando ao lúmen gástrico. Uma vez na camada mucosa, a taxa de difusão de químicos é baixa, o que permite que o HCl seja neutralizado mais facilmente e o pH neutro estabelecido seja mantido por períodos de tempo mais longos. A motilidade e a quimiotaxia são processos importantes para a bactéria colonizar eficazmente o estômago. Além do pH, o sistema de quimiotaxia da *H. pylori* detecta múltiplos sinais, tais como a presença de ureia, aminoácidos e metais (substâncias benéficas), a maioria das quais é difundida do sangue do hospedeiro para as células epiteliares (razão pela qual a *H. pylori* se localiza junto ao epitélio). A quimiotaxia também é utilizada na colonização do epitélio lesionado, que pode possuir quantidades particularmente elevadas de nutrientes. Por outro lado, a *H. pylori* utiliza a quimiotaxia em resposta à substância repelente AI-2. O AI-2 é uma pequena molécula sinalizadora envolvida num

processo designado *quorum sensing*, através do qual a bactéria monitoriza a densidade populacional, determinando quando é que demasiados indivíduos ocupam uma mesma localização, o que poderá levar a uma escassez de nutrientes e, portanto, poderá ser mais favorável uma dispersão das bactérias (Keilberg e Ottemann, 2016).

Após estabelecer-se no estômago, a *H. pylori* induz uma série de respostas nas células epiteliais do hospedeiro. Para tal, a bactéria deve aderir por meio de factores de adesão, libertando toxinas e moléculas por contacto directo com as células epiteliais do hospedeiro ou secretando toxinas no meio adjacente. A interacção entre a *H. pylori* e as células epiteliais do hospedeiro é feita por meio de OMPs. A adesão via BabA é importante na libertação de substâncias pelo T4SS, nomeadamente a toxina CagA, tendo um papel na resposta pró-inflamatória do hospedeiro. Após estabelecer-se a aderência, dá-se a formação de pedestais acompanhada pela polimerização da actina e por rearranjos do citoesqueleto (Testerman *et al.*, 2001). Com o aumento da inflamação (Keilberg e Ottemann, 2016) e uma aderência intensificada (Testerman *et al.*, 2001) dá-se o aumento no número de receptores sialyl-Lewis x nas células do hospedeiro, o que aumenta a aderência via SabA. A adesão pode ser intensificada por meio de outras OMPs, tais como a HopZ. A OipA actua como adesina em linhagens celulares de cancro gástrico. Tanto a AlpA como a AlpB ligam-se à proteína da matriz extracelular laminina, modulando a resposta inflamatória do hospedeiro (Keilberg e Ottemann, 2016).

Assim que é libertada, a VacA é absorvida para a membrana plasmática das células do hospedeiro e forma canais selectivos ao anião, que iniciam um influxo de Cl<sup>-</sup> para a célula. O aumento de volume dos endossomas resultante dá origem a vacúolos nas células epiteliais do hospedeiro. Esta citotoxina também ataca as mitocôndrias, formando poros na sua membrana interna, com conseqüente diminuição dos níveis de ATP celulares o que conduz à indução da apoptose das células, com libertação de proteínas que levam à inflamação da mucosa gástrica (Rassow e Meinecke, 2012). A apoptose das células do hospedeiro pode, por um lado, aumentar os nutrientes disponíveis no meio circundante à bactéria e, por outro lado, a apoptose de células do sistema imunitário ajuda a regular e diminuir a resposta inflamatória, estabilizando a infecção crónica (Keilberg e Ottemann, 2016). A concentração de VacA poderá ter um

papel importante no desenrolar da doença, já que a cortactina (proteína de ligação da actina cortical) expressa em elevadas quantidades em células epiteliais cancerosas, foi indicada como sendo crucial para os efeitos indutores da apoptose da VacA (Chang *et al.*, 2016).

A toxina CagA é injectada para o interior das células epiteliais do hospedeiro através do T4SS, que se liga a uma integrina nas células do hospedeiro, que serve de receptor a outras proteínas da *cagPAI*, incluindo a CagA, CagI, CagL e CagY. Uma vez no citoplasma, a CagA é parcialmente fosforilada (Keilberg e Ottemann, 2016) na sequência EPIYA (Wen e Moss, 2009) e dependendo do estado da fosforilação, interage com diferentes componentes celulares do hospedeiro (Keilberg e Ottemann, 2016). A fosforilação CagA é inicialmente mediada por tirosinacinasas da família SRC (SFKs) sendo este processo continuado pela cinase c-ABL. A CagA fosforilada interage com proteínas com homologia SRC (SH2), incluindo a tirosinafosfatase SHP-2, a tirosinacinaase SRC C-terminal (CSK) e a proteína adaptora CRK. Esta interacção resulta no rearranjo do citoesqueleto e alongamento celular, um fenómeno que origina o chamado fenótipo *hummingbird* (conforme referido anteriormente). Esta alteração morfológica é resultado da desfosforilação da FAK pela SHP-2 activada pela CagA, havendo diminuição actividade da FAK e activação das cinases ERK e MAP. A activação das cinases MAP induz a progressão do ciclo celular que, juntamente com as alterações fenotípicas induzidas, denota o papel importante da SHP-2 CagA activada na transformação celular e progressão para cancro gástrico (Wen e Moss, 2009). Por este motivo, o gene SHP2 pode ser classificado como um oncogene. A activação deste oncogene leva a alterações nas junções de oclusão e junções aderentes, danificando a integridade celular (Keilberg e Ottemann, 2016). Por outro lado, a CagA não fosforilada interage com variadas proteínas celulares do hospedeiro, tais como a zonulina (proteína de suporte das junções de oclusão epiteliais), a E-caderina (proteína de adesão celular), a c-Met (receptor para os factores de crescimento dos hepatócitos), a b-catenina (proteína associada à caderina), a GRB.2 (proteína adaptora) e a cinase PAR1. Estas interacções provocam a quebra das junções de oclusão e aderentes, levando à perda da polaridade da célula e induzindo respostas pró-inflamatórias e mitogénicas que podem ser importantes no desenvolvimento do carcinoma gástrico (Keilberg e Ottemann, 2016, Wen e Moss, 2009).

#### **4. A resposta imunológica**

A imunidade inata refere-se à resposta imune que não necessita de uma exposição prévia ao estímulo antigénico e representa a primeira linha de defesa do organismo em resposta ao patogénio. A activação não específica das células do sistema imune inato por estímulos microbianos pode, não só, levar a importantes efeitos antimicrobianos, mas também a inflamação e lesões devido à libertação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, espécies reactivas de oxigénio e óxido nítrico (Wilson e Crabtree, 2007).

A resposta imune adaptativa é a resposta predeterminada a um estímulo imunológico previamente identificado, sendo específica para um determinado patogénio, e envolve memória imunológica (Wilson e Crabtree, 2007).

No caso da infecção da mucosa gástrica por *H. pylori*, a gastrite resultante é provocada por diversos factores bacterianos que estimulam as células epiteliais, os macrófagos e activam as células dendríticas, além da resposta linfocitária predominantemente Th1. A colonização da *H. pylori* pode ser anulada por imunização com componentes bacterianos como a urease, o que permite a activação da resposta adaptativa, sendo a urease também um forte indutor da respostas inata dos macrófagos e monócitos, estimulando a libertação de citocinas e óxido nítrico. A *H. pylori* induz tanto a resposta imune humoral como a celular promovendo a libertação de anticorpos IgA, IgM e IgG, provocando a reacção inflamatória pelas células polimorfonucleares e mononucleares. Assim, a mucosa gástrica de pacientes infectados apresenta níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (Wilson e Crabtree, 2007).

Apesar de se encontrarem proteínas de *H. pylori* na lamina própria do estômago, a bactéria tem sido classificada como um patogénio não-invasivo, estabelecendo-se primariamente na camada mucosa extracelular. No entanto, vários estudos demonstram a capacidade da *H. pylori* de invadir as células epiteliais gástricas e de se ligar aos eritrócitos dos microvasos da lamina própria. Ainda, A microscopia electrónica de transmissão e a técnica de detecção de imuno-gold vieram mostrar que a *H. pylori* tem

contacto directo com as células da lamina própria na maioria dos casos de gastrite e carcinoma gástrico (Wilson e Crabtree, 2007).

### **i. Resposta imune inata**

O reconhecimento de moléculas bacterianas pelo sistema imunitário inato é mediado por receptores do tipo *toll* (TLRs) expressos em células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como monócitos e células dendríticas. O contacto entre a bactéria e os monócitos (e outras APCs) leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8. A infecção por *H. pylori* está associada a níveis elevados destas citocinas que, por sua vez, induzem a infiltração granulocítica (Prinz *et al.*, 2003).

A *H. pylori* estimula uma resposta primária nos monócitos (Wilson e Crabtree, 2007), que podem diferenciar-se em macrófagos e destruir as bactérias por lise intracelular. Esta resposta não é específica, mas é geralmente muito eficaz. No entanto, a *H. pylori* é capaz de sobreviver no interior dos macrófagos interferindo com as proteínas dos lisossomas. Assim, apesar de existir uma resposta inata a esta bactéria, esta não é muito eficaz a eliminar a infecção (Prinz *et al.*, 2003). Outro potencial factor que poderá contribuir para o falhanço da resposta imune é a capacidade da *H. pylori* de evitar a fagocitose pelos macrófagos. Apesar de a *H. pylori* ser rapidamente absorvida pelos macrófagos os fagossomas fundem-se formando megassomas contendo números elevados de bactérias. Está demonstrado que estirpes *cagPAI* negativas e *vacA* negativas não provocam a fusão dos fagossomas e são susceptíveis aos macrófagos. Estirpes *cagPAI* e *vacA* positivas previnem a fusão dos fagossomas com os lisossomas essenciais à morte da bactéria (Wilson e Crabtree, 2007).

Os macrófagos (Figura 9) são essenciais na resposta inata aos produtos derivados da *H. pylori* e aos sinais enviados pelas células epiteliais gástricas em contacto directo com as bactérias na superfície da mucosa. Os monócitos e os macrófagos são importantes coordenadores da resposta imune a patógenos e, no caso da *H. pylori*, juntamente com as células dendríticas são activadores da imunidade adaptativa através da produção de factores tais como IL-12 que estimulam as células Th1, resultando na produção de citocinas, como por exemplo IFN- $\gamma$ . A proteína activadora dos neutrófilos (NAP) da *H.*

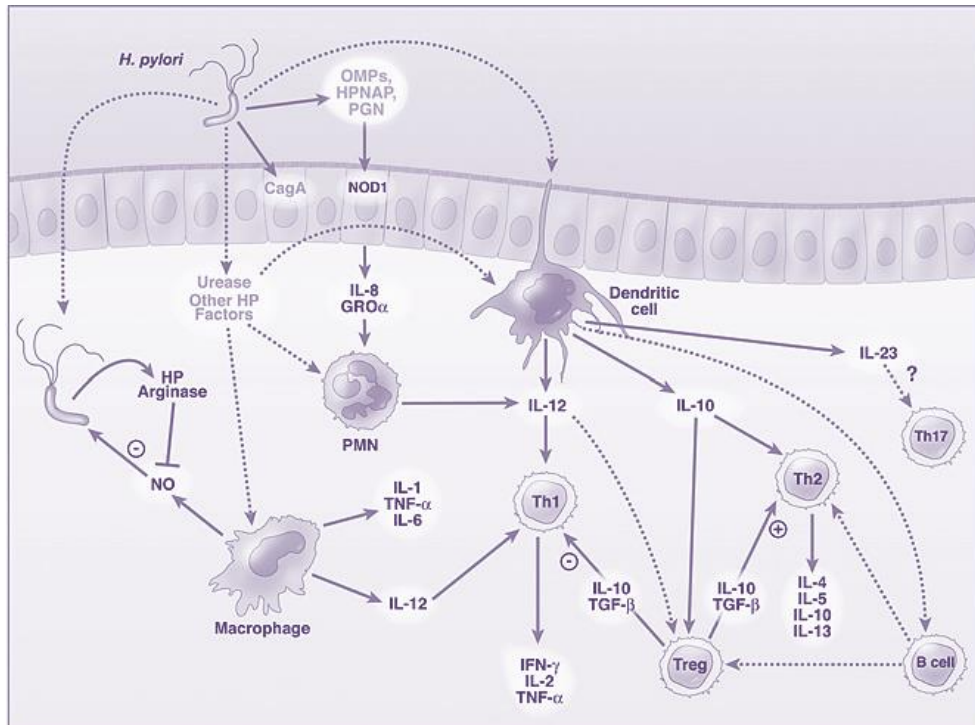
*pylori* contribui para a polarização Th1 pela estimulação da secreção de IL-12 e IL-23 dos neutrófilos e monócitos. A produção de IL-12 pela mucosa gástrica está ligada ao desenvolvimento de úlceras pépticas na infecção por estirpes de *H. pylori cagA* positivas, provavelmente devido à estimulação da resposta Th1. Os macrófagos estão ainda envolvidos na amplificação da resposta inflamatória pela produção de citocinas tais como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . A activação da IL-6 está ligada à activação de vias metabólicas relacionadas com TLR4, MAP cinase e NF- $\kappa$ B (Wilson e Crabtree, 2007).

Os macrófagos actuam ainda como células efectoras pela produção de óxido nítrico derivado de uma reacção catalizada pela NO sintetase, um processo estimulado pela *H. pylori*. Este processo permite aos macrófagos destruir as bactérias, mesmo estando fisicamente separados destas, por um sistema dependente do NO. No entanto, a enzima arginase codificada no genoma da *H. pylori* compete com os macrófagos na ligação ao substrato L-arginina da NO sintetase, o que aumenta a taxa de sobrevivência da bactéria. A redução da produção de NO pelos macrófagos é benéfica para a bactéria, aumentando a sua capacidade de evasão ao sistema imune. A *H. pylori* também é capaz de escapar à resposta dos macrófagos pela glicosilação do colesterol (bactérias que não processam o colesterol são mais susceptíveis à fagocitose pelos macrófagos e são incapazes de colonizar a mucosa gástrica). A *H. pylori* induz ainda uma via alternativa ao metabolismo da L-arginina que é patogénica em vários aspectos. A exposição dos macrófagos aos produtos da *H. pylori* resulta na estimulação de produção de arginase II, que produz ureia e L-ornitina. Esta indução da arginase tem pelo menos três papéis patogénicos:

- Amplifica o efeito da arginase bacteriana esvaziando as reservas do substrato para NO;
- Tem um papel central na apoptose dos macrófagos derivada do metabolismo da L-ornitina em poliaminas;
- A produção de poliaminas pela ornitina descarboxilase e induzida pela *H. pylori* resulta na inibição da produção de NO (Wilson e Crabtree, 2007).

A resposta inflamatória do hospedeiro pode também ser aumentada pela activação dos macrófagos, se esta activação originar apoptose. A libertação de citocinas pelas células

antes da apoptose pode ser significativa e as células apoptóticas servem de estímulo à infiltração dos neutrófilos, que eliminam os detritos celulares. Talvez ainda mais importante seja o efeito de perda das defesas do hospedeiro por desaparecimento destas células efectoras (Wilson e Crabtree, 2007).



**Figura 9** – Representação esquemática da resposta inflamatória à infecção por *H. pylori* (adaptado de Wilson e Crabtree, 2007).

A NAP da *H. pylori* pertence à família de proteínas protectoras de DNA sob condições de falta de nutrientes (família Dps) e estimula a produção de radicais de oxigénio pelos neutrófilos, conduzindo à lesão dos tecidos locais e promovendo a adesão dos neutrófilos às células endoteliais durante a infecção. Esta adesão induzida pela NAP depende da aquisição de um estado de elevada afinidade da integrina  $\beta 2$  na superfície da membrana dos neutrófilos. Além da estimulação da produção de espécies reactivas de oxigénio, a NAP induz a expressão e libertação de IL-8, e as proteínas inflamatórias dos macrófagos MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  pelos neutrófilos, sendo responsável pela infiltração dos neutrófilos e células mononucleares para a mucosa gástrica. A NAP facilita ainda a adesão via SabA às células do hospedeiro e pode proteger o DNA da *H. pylori* pela sua capacidade de se ligar ao DNA e impedir o ataque pelos radicais livres, ou pela sua capacidade de se ligar aos iões de ferro reduzindo o stress oxidativo. A NAP também é capaz de estimular os neutrófilos ou os monócitos a aumentar a expressão de IL-12 e induz a diferenciação das células Th em células Th1 (Kao *et al.*, 2016).

As células dendríticas (Figura 9) são o elo de ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. São as células que respondem em primeiro lugar aos estímulos bacterianos e são importantes APCs. Após activação dos seus TLRs, as células dendríticas podem activar as células T por indução da resposta Treg pela secreção de IL-12 ou IL-10, induzindo o processo regulador de Th1 ou Th2, respectivamente. No desenrolar da resposta imune, o potencial antigénico das OMPs da *H. pylori* induz a maturação e a apresentação antigénica das células dendríticas. A activação e maturação das células dendríticas ocorre independentemente da presença da *cagPAI* e do genótipo *vacA*. Foi demonstrado que as células dendríticas ligam-se à *H. pylori* através do receptor DC-SIGN/CD209, o que pode ser essencial para compreender o balanço Th1/Th2 a favor da persistência da infecção. A expressão dos antígenos de Lewis pelos LPS da *H. pylori* bloqueia a resposta Th1 ligando-se a este receptor das células dendríticas, exercendo uma forma de imunossupressão. A exposição crónica das células dendríticas à *H. pylori* resulta na perda da capacidade para induzir a resposta Th1, o que contribui para a persistência da infecção (Wilson e Crabtree, 2007).

## **ii. Resposta imune adaptativa**

Apesar de a resposta imune adaptativa ser essencial à sobrevivência do hospedeiro, a sua regulação é igualmente importante na prevenção de danos paralelos. A *H. pylori* modula a imunidade adaptativa interferindo directamente na proliferação das células T (Cooke *et al.*, 2005).

Após a infecção por *H. pylori*, as células dendríticas fagocitam proteínas bacterianas e expressam péptidos de superfície juntamente com o Complexo *Major* de Histocompatibilidade e moléculas co-estimulatórias. Esta apresentação de antígenos leva à activação de células TCD4+ que reagem contra estes antígenos estimulando a produção de anticorpos e a lise celular (Prinz *et al.*, 2003).

As células T da mucosa produzem níveis abundantes das citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) e níveis baixos das citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) (Figura 9) (Wilson e Crabtree, 2007). Apesar disso, a expressão destas citocinas não está relacionada com a presença de

epítopes específicos, o que indica que a resposta das populações de células T pode ser afectada pela presença crónica da *H. pylori* (Prinz *et al.*, 2003).

As células Th de pacientes infectados mostram menor proliferação e menor produção de IFN- $\gamma$  em resposta às células dendríticas em contacto com *H. pylori* do que células de pacientes não infectados, um efeito anulado assim que as células Treg são eliminadas. Assim, as células Treg específicas para a *H. pylori* suprimem a resposta das células Th, podendo contribuir para a persistência da infecção. Indivíduos infectados por *H. pylori* apresentam níveis aumentados de células Treg na mucosa gástrica e duodenal. A activação das células T por antígenos específicos envolve a expressão de moléculas co-estimulatórias e a proteína 4 citotóxica associada a linfócitos T (CTLA-4) actua para inibir este processo. Na infecção por *H. pylori*, a inactivação funcional das células Th recrutadas para a mucosa gástrica pode estar relacionada com a expressão de CTLA-4 na superfície celular e com a prevenção da co-estimulação quando as APCs se ligam aos receptores. O bloqueio da CTLA-4 resulta no aumento da activação das células Th e na diminuição da colonização da *H. pylori*. A *H. pylori* é capaz de inibir a proliferação linfocitária, um processo atribuído aos efeitos da VacA nas populações de células T (Wilson e Crabtree, 2007).

Além das células T, as células B (Figura 9) também contribuem para a imunopatogenicidade da *H. pylori*. Apesar de as respostas IgA e IgG à *H. pylori* estarem envolvidas na protecção do hospedeiro, as respostas dos anticorpos à bactéria podem ser contraproducentes. Quando expostas à *H. pylori*, as células B são protegidas contra a apoptose espontânea e sofrem proliferação em resposta à multiplicação do agente bacteriano. Além da produção de anticorpos específicos, as células B também produzem espécies auto-reactivas que podem ter actividade patogénica (Wilson e Crabtree, 2007).

## **5. Transmissão**

A via de transmissão da *H. pylori* ainda não é totalmente compreendida. O único reservatório conhecido desta bactéria é o estômago humano e como a *H. pylori* infecta um pequeno grupo de hospedeiros, pensa-se que novas infecções possam ocorrer como

consequência de contacto directo interpessoal ou transmissão ambiental (Vale e Vitor, 2010).

Conforme explicado anteriormente, a sobrelotação doméstica e a infecção de outros membros da família são importantes factores de risco para a transmissão da *H. pylori*, sendo que é possível encontrar uma forte homologia no genoma de estirpes de *H. pylori* que colonizam o estômago de membros da mesma família. Tal sugere que a transmissão ocorre de pessoa para pessoa (oral-oral, gastro-oral, fecal-oral, amamentação e transmissão iatrogénica). No entanto, a exposição da família a uma fonte de transmissão alternativa (água, alimentos) também é uma possibilidade (Azevedo *et al.*, 2007).

### **i. Transmissão oral-oral**

A flora gástrica pode alcançar e colonizar a mucosa oral após o vómito (Vale e Vitor, 2010). A cavidade oral é considerada um reservatório adequado à subsistência da *H. pylori* e a transmissão oral-oral pode ocorrer através do contacto com saliva infectada (por exemplo através do beijo). É frequente amplificar-se por PCR (Azevedo *et al.*, 2007) o DNA de *H. pylori* em amostras de saliva, biofilme sublingual e placa dentária. Foi demonstrada a presença de estirpes em comum em casais infectados por *H. pylori*, o que sugere a transmissão interpessoal ou uma fonte de exposição comum entre casais (Vale e Vitor, 2010). No entanto, a cavidade oral não é o local ideal à colonização por *H. pylori*, mesmo em populações em que a infecção é altamente prevalente, sendo possível concluir que a colonização da mucosa oral é um estado de transição que ocorre após o vómito (Azevedo *et al.*, 2007).

### **ii. Transmissão gastro-oral**

A transmissão gastro-oral está praticamente reservada a crianças, que apresentam episódios frequentes de vómito e refluxo gastro-esofágico (Azevedo *et al.*, 2007). É possível encontrar *H. pylori* nos sucos gástricos de pacientes sintomáticos e o historial de vómito de irmãos ou a exposição a um membro da família com gastroenterite (principalmente com vómitos) pode resultar na transmissão da *H. pylori*. Por outro lado, a exposição a aerossóis contendo suco gástrico não é uma fonte viável de transmissão.

Juntamente com uma fraca higiene, o vómito é a principal fonte de transmissão gastro-oral da *H. pylori* (Vale e Vitor, 2010).

### **iii. Transmissão fecal-oral**

Apesar de o DNA de *H. pylori* ser frequentemente encontrado nas fezes humanas, a sua cultura a partir de fezes é mais difícil (Vale e Vitor, 2010, Azevedo *et al.*, 2007), já que a bactéria existe no intestino predominantemente na sua forma cocóide (não cultivável) (Vale e Vitor, 2010), sendo capaz de colonizar o duodeno nas áreas de metaplasia intestinal. No entanto, a cultura é conseguida em indivíduos com transito intestinal acelerado. Este modo de transmissão é menos comum do que os modos explicados anteriormente, sendo que a exposição a um membro da família com diarreia aumenta, mas não significativamente, o risco de nova infecção (Azevedo *et al.*, 2007). A transmissão por esta via é ainda suportada pela ocorrência de infecções por *H. pylori* entre jovens institucionalizados durante surtos de gastroenterite. Assim, a transmissão fecal-oral de *H. pylori* ocorre principalmente quando as condições de higiene são fracas (Vale e Vitor, 2010).

### **iv. Transmissão iatrogénica (ocupacional)**

Tendo em conta que a *H. pylori* pode ser detectada nas fezes, secreções orais e sucos gástricos, a endoscopia pode ser uma via de transmissão para alguns indivíduos, sejam eles pacientes ou pessoal médico (Vaira *et al.*, 2001). A infecção pode ser adquirida via gastro-oral e não por contacto directo com os endoscópios. Apesar de a *H. pylori* ser constantemente detectada por cultura em endoscópios após o seu uso em pacientes infectados, procedimentos de desinfecção adequados reduzem em grande parte (ou eliminam totalmente) o risco de transmissão por esta via (Azevedo *et al.*, 2007).

### **v. Transmissão ambiental: ingestão de água contaminada**

Existem indícios de que a transmissão da *H. pylori* possa ser feita via aquática, tais como a presença de DNA bacteriano em amostras de água. A observação de formas cocóides em amostras de água, a sobrevivência da *H. pylori* em água contaminada

artificialmente e o crescimento da *H. pylori* a partir de amostras de água suporta este facto. O DNA bacteriano foi identificado por PCR em amostras de água potável, água do mar, água do rio e água de esgotos. Geralmente, água tratada não está contaminada com DNA de *H. pylori*, o que sugere que a bactéria é sensível aos tratamentos convencionais. No entanto, a *H. pylori* parece ser mais resistente ao cloro e ozono do que outras espécies bacterianas como a *E. coli* (o organismo indicador da qualidade da água na maioria dos países) e é igualmente resistente ao monoclóro. Quanto à água de nascente, não foi detectada a presença de DNA bacteriano. Igualmente, amostras de água proveniente de rios perto de nascentes também foi negativa para a presença de DNA bacteriano, sugerindo que a contaminação fecal é responsável pela contaminação dos rios (Vale e Vitor, 2010). Foi encontrada *H. pylori* em biofilmes em poços, rios e redes de distribuição (Azevedo *et al.*, 2007). Os biofilmes são uma matriz dificilmente acessível aos desinfetantes. A separação dos biofilmes é a principal forma de contaminação da água e a sua formação pela *H. pylori* parece ser independente da temperatura (Vale e Vitor, 2010). Foi demonstrado que a forma cocóide da *H. pylori* induzida pela água é capaz de colonizar a mucosa gástrica e provocar gastrite em ratinhos (Azevedo *et al.*, 2007).

#### **vi. Transmissão ambiental: ingestão de alimentos contaminados**

Suspeita-se que a ingestão de vegetais crus seja uma via de transmissão da *H. pylori* quando a água usada para a lavagem ou rega dos mesmos esteja contaminada, assumindo que a *H. pylori* consegue sobreviver no ambiente aquático (Azevedo *et al.*, 2007).

A percentagem de detecção de DNA de *H. pylori* é superior em leite não pasteurizado quando comparado com leite pasteurizado. Sabe-se que a *H. pylori* é capaz de sobreviver por curtos períodos de tempo no leite, que por si só é um alimento de consumo rápido. No entanto, o isolamento de *H. pylori* a partir de leite não pasteurizado é raro, o que implica que a *H. pylori* provavelmente viva no estômago de vacas e ovelhas, sendo eliminadas formas viáveis da bactéria nas fezes, que contaminam então o leite durante o processo de ordenha (Vale e Vitor, 2010).

O isolamento de outras bactérias do género *Helicobacter* de diversos animais que partilham o ambiente humano (porco, ovelha) fez surgir a suspeita de que a *H. pylori* possa ser encontrada no estômago desses animais, participando estes na transmissão deste patogénio (Vale e Vitor, 2010).

### **vii. Zoonoses**

As transmissões zoonóticas representam uma das principais causas de doença e morte por doença infecciosa em todo o mundo. Vários artigos demonstram o papel dos animais na aquisição de *H. pylori*, dependendo do animal em estudo. Os vectores considerados foram vacas, ovelhas, baratas, moscas domésticas e animais domésticos. Nos primeiros dois casos a via de transmissão é por ingestão de leite contaminado (Azevedo *et al.*, 2007), conforme explicado anteriormente. Curiosamente, um estudo indicou que a prevalência de *H. pylori* entre pastores era de 100% e crianças com contacto com ovelhas têm uma prevalência de *H. pylori* duas vezes superior à observada em crianças de áreas urbanas (Vale e Vitor, 2010). As baratas, que normalmente habitam ambientes com baixas condições sanitárias, podem contaminar comida e áreas de armazenamento de comida como despensas e a *H. pylori* pode ser encontrada nas pernas e corpo destes insectos. Quanto a animais de companhia, a *H. pylori* não foi encontrada em cães e raramente é observada em gatos, sugerindo que a sua presença no organismo destes animais seja de origem humana. Estudos recentes identificaram a *H. pylori* por PCR na bÍlis de gatos, aumentando a hipótese deste animal se tratar de um vector. É sabido que cada animal é colonizado pela sua própria espécie endógena de *Helicobacter* (Azevedo *et al.*, 2007).

### **6. Doenças associadas**

Apesar de a *H. pylori* estar associada a uma patologia de elevada malignidade (adenocarcinoma gástrico) o seu papel no organismo não está limitado a esta, encontrando-se relacionada com outras doenças por todo o organismo (Rokkas *et al.*, 2007). A Tabela 4 permite relacionar a infecção por *H. pylori* com as patologias gastrointestinais, pancreáticas, neurológicas, dermatológicas, cardiovasculares, hematológicas, auto-imunes e hépto-biliares.

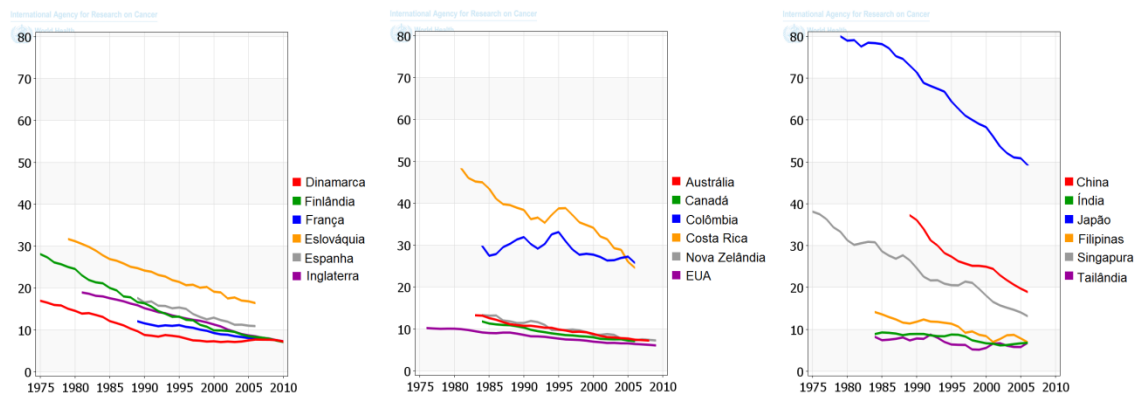
**Tabela 4** – Doenças associadas à infecção por *H. pylori* (adaptado de Kuipers, 1997; Alakkari *et al.*, 2011, den Hollander *et al.*, 2013, Shmueli *et al.*, 2012; Blaser, 1998; Furuta e Delchier, 2009; Shirin *et al.*, 2008; Bulajic *et al.*, 2014; Alvarez-Arellano e Maldonado-Bernal, 2014; Shiotani *et al.*, 2001, Magen e Delgado, 2014; Franceschi *et al.*, 2014, Faria *et al.*, 2013).

	<b>Patologia</b>	<b>Autores</b>
<b>Patologias gastro-intestinais</b>	Gastrite crónica activa	(Kuipers, 1997)
	Gastrite não atrofica	(Kuipers, 1997)
	Gastrite atrofica	(Kuipers, 1997)
	Metaplasia intestinal	(Kuipers, 1997)
	Úlcera péptica	(Alakkari <i>et al.</i> , 2011, den Hollander <i>et al.</i> , 2013, Shmueli <i>et al.</i> , 2012)
	Úlcera duodenal	(Kuipers, 1997)
	Linfoma MALT	(Blaser, 1998)
	Dispepsia funcional	(den Hollander <i>et al.</i> , 2013, Furuta e Delchier, 2009)
	Refluxo gastro-esofágico	(den Hollander <i>et al.</i> , 2013, Furuta e Delchier, 2009)
	Gastrite	(Furuta e Delchier, 2009, Kuipers, 1997)
	Pólipos gástricos	(Furuta e Delchier, 2009)
	Lesão gástrica induzida por AINEs	(Shirin <i>et al.</i> , 2008)
<b>Patologias pancreáticas</b>	Carcinoma pancreático	(Bulajic <i>et al.</i> , 2014)
	Pancreatite auto-imune	(Bulajic <i>et al.</i> , 2014)
<b>Patologias neurológicas</b>	Doença de Parkinson	(Alvarez-Arellano e Maldonado-Bernal, 2014)
	Doença de Alzheimer	(Alvarez-Arellano e Maldonado-Bernal, 2014)
	Síndrome de Guillain-Barré	(Alvarez-Arellano e Maldonado-Bernal, 2014)
	AVC isquémico não cardio-embólico	(Alvarez-Arellano e Maldonado-Bernal, 2014)
	AVC aterosclerótico	(Alvarez-Arellano e Maldonado-Bernal, 2014)
<b>Patologias dermatológicas</b>	Urticária crónica	(Shiotani <i>et al.</i> , 2001, Magen e Delgado, 2014)
	Psoríase	(Magen e Delgado, 2014)
	<i>Alopecia areata</i>	(Magen e Delgado, 2014)
	Vasculite	(Magen e Delgado, 2014)
	Dermatose bolhosa	(Magen e Delgado, 2014)
<b>Patologias cardiovasculares</b>	Doença coronária isquémica	(Franceschi <i>et al.</i> , 2014)
	Purpura trombocitopénica idiopática	(Franceschi <i>et al.</i> , 2014, Faria <i>et al.</i> , 2013)
<b>Patologias hematológicas</b>	Anemia ferropriva	(Franceschi <i>et al.</i> , 2014, Faria <i>et al.</i> , 2013)
	Purpura trombocitopénica idiopática	(Franceschi <i>et al.</i> , 2014, Faria <i>et al.</i> , 2013)
<b>Patologias auto-imunes</b>	Doenças auto-imunes da tiróide	(Franceschi <i>et al.</i> , 2014, Faria <i>et al.</i> , 2013)
<b>Patologias hepato-biliares</b>	Gastropatia hipertensiva portal	(Franceschi <i>et al.</i> , 2014)
	Carcinoma dos ductos biliares	(Franceschi <i>et al.</i> , 2014)

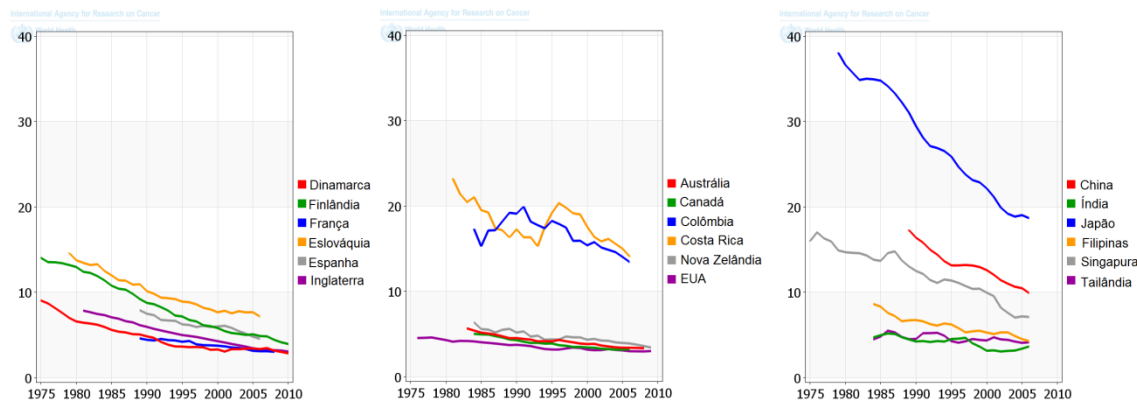
### III. Carcinoma gástrico

#### 1. Epidemiologia

Em 1975 o cancro gástrico era o tipo de neoplasia mais comum no mundo (Globocan, 2012). A tendência de desenvolvimento do cancro gástrico tem vindo a diminuir, tornando-o o quinto tipo de cancro mais comum em todo o mundo, depois do cancro do pulmão, da mama, colo-rectal e da próstata. Mais de 70% dos casos ocorre em países em desenvolvimento, sendo que 50% dos casos em todo o mundo ocorre no Este da Ásia, principalmente na China (Globocan, 2012). Em 2010, a taxa de incidência de cancro gástrico em Portugal foi de 27,8%, um valor elevado quando comparado com a média europeia (18,9%) (Miranda *et al.*, 2016). Em 2012, surgiram aproximadamente 952000 novos casos de cancro gástrico em todo o mundo, num total de 6,8% de todos os novos casos de cancro (Fock, 2014).

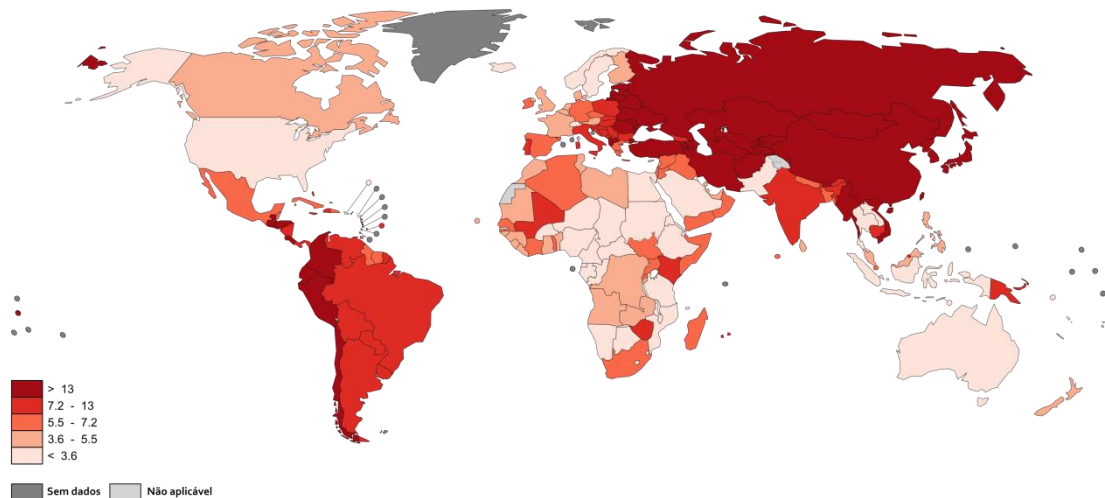


**Figura 10** – Incidência mundial de cancro gástrico nos homens ao longo dos anos (adaptado de Globocan, 2012).

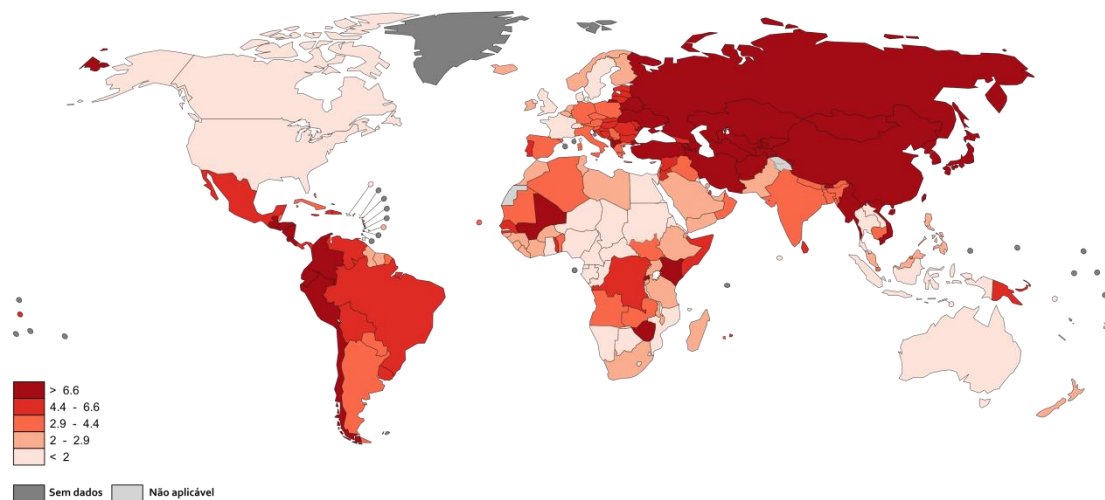


**Figura 11** – Incidência mundial de cancro gástrico nas mulheres ao longo dos anos (adaptado de Globocan, 2012).

Como se pode observar pela Figura 10 e 11, a incidência de carcinoma gástrico tem vindo a diminuir ao longo dos anos, tanto nos homens como nas mulheres, respectivamente, apesar de existirem variações na magnitude desse declínio entre os países, que podem ser explicadas pelos factores de risco associados a este tipo de carcinoma. Apesar de ser o quinto tipo de neoplasia mais comum no mundo, o cancro gástrico é a terceira causa de morte, representando 8,8% do total de mortes provocadas por cancro (Fock, 2014) em ambos os sexos em todo o mundo, estando as taxas de mortalidade mais elevadas localizadas no Este da Ásia e as mais baixas na América do Norte. Na Europa Central e Oriental também se observam taxas de mortalidade elevadas, assim como na América Central e do Sul, como se pode verificar pela Figura 12 e 13, que representam a taxa de mortalidade mundial por cancro gástrico em homens e mulheres, respectivamente (Globocan, 2012).



**Figura 12** – Mortalidade mundial estimada para cancro gástrico em 2012 nos homens (adaptado de Globocan, 2012).



**Figura 13** – Mortalidade mundial estimada para cancro gástrico em 2012 nas mulheres (adaptado de Globocan, 2012).

## **2. Etiologia e factores de risco**

O carcinoma gástrico é uma patologia heterogénea, classificada quanto à sua histopatogenicidade em três tipos: difuso, intestinal e misto. Sendo uma patologia multifactorial, resulta de uma combinação de factores ambientais e alterações genéticas (Vogelaar *et al.*, 2012).

### **i. Factores de risco ambientais**

#### *H. pylori*

A *H. pylori* é uma causa incontornável do cancro gástrico. Certas estirpes da bactéria, nomeadamente *cagPAI* positivas têm maior probabilidade de conduzir a lesões neoplásicas. Estima-se que 65 a 80% de todos os casos de cancro gástrico sejam provocados por esta bactéria (Karimi *et al.*, 2014). A infecção por esta bactéria está associada com um risco elevado de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal na porção distal do estômago, mas não com carcinoma da cárdia. O risco de desenvolver carcinoma gástrico devido à infecção por *H. pylori* é semelhante ao risco de desenvolver carcinoma pulmonar por um fumador (Cover e Peek, 2013).

A colonização do estômago por *H. pylori* aumenta o risco de ocorrência das anomalias histopatológicas consideradas precursoras do adenocarcinoma gástrico (gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia). A infecção por *H. pylori* pode contribuir para o desenvolvimento do carcinoma gástrico por vários mecanismos, tais como alterações no DNA induzidas pela inflamação crónica, alterações na proliferação celular ou apoptose, efeitos directos dos produtos bacterianos nas células do hospedeiro e alterações no pH gástrico que levam à colonização do estômago por bactérias produtoras de nitratos normalmente não encontradas no ambiente ácido do estômago. Vários factores genéticos relacionados com o hospedeiro influenciam a probabilidade de se desenvolver cancro gástrico a partir de uma infecção por *H. pylori*. Polimorfismos no gene associado à IL-1 $\beta$  aumentam a produção desta citocina pró-inflamatória que inibe a secreção ácida gástrica, promovendo a hipocloridria, a atrofia gástrica e o adenocarcinoma gástrico. A secreção desta citocina encontra-se elevada em pacientes infectados por *H.*

*pylori*. Polimorfismos também no gene associado ao TNF- $\alpha$  levam à produção exagerada desta citocina pró-inflamatória, o que aumenta os seus efeitos supressores do ácido e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico. Polimorfismos associados à diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias, nomeadamente IL-1, estão também associados ao desenvolvimento de cancro gástrico distal. Assim, o risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico aumenta com o número de polimorfismos pró-inflamatórios inerentes ao hospedeiro (Cover e Peek, 2013).

A *H. pylori* é responsável pelo desenvolvimento de carcinoma gástrico em virtualmente todos os indivíduos infectados. A adesão da bactéria às células epiteliais induz a resposta inflamatória resultando na deslocação de neutrófilos, seguidos de linfócitos B e T, macrófagos e células do plasma, a maioria dos quais secreta elevadas quantidades de espécies reactivas de oxigénio ou azoto implicadas na lesão celular e na carcinogénese. A lesão na mucosa gástrica induzida pela infecção por *H. pylori* ocorre devido à presença dos factores de virulência codificados na *cagPAI*, nomeadamente as citotoxinas VacA e CagA (Fuccio *et al.*, 2010).

### *Tabaco*

O consumo de tabaco tem sido associado a um risco mais elevado de desenvolvimento de carcinoma gástrico (Cover e Peek, 2013). O risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico é aumentado em 60% nos fumadores do sexo masculino e 20% nos fumadores do sexo feminino, quando comparados com indivíduos que nunca fumaram. Esta associação é inferior em ex-fumadores (Karimi *et al.*, 2014). O risco de desenvolvimento de cancro gástrico aumenta de forma linear com a exposição ao tabaco, quando medido em cigarros por dia, maços de tabaco por dia ou duração do acto de fumar. Quando analisado em conjunto com a *H. pylori* e o seu estatuto CagA, o risco de desenvolvimento do carcinoma gástrico conferido pelo tabaco aumenta sinergicamente (Cover e Peek, 2013).

### *Dieta*

As dietas mais associadas ao risco de desenvolver cancro gástrico são as ricas em alimentos salgados, fumados, conservados em salmouras, com um elevado consumo de carnes e baixo consumo de frutas e vegetais (Cover e Peek, 2013). O consumo elevado de sal aumenta o risco de desenvolver cancro gástrico em 22%, quer por danos directos na mucosa gástrica ou por outros factores indirectos. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes em elevadas quantidades nos alimentos fumados são responsáveis pelo papel destes alimentos na carcinogénese gástrica. Além destes compostos, os compostos N-nitroso formados aquando da confecção de carnes na brasa, em assados ou em frituras a altas temperaturas, por secura, cura ou em salmoura também são responsáveis pelo aumento do risco de desenvolver carcinoma gástrico (Karimi *et al.*, 2014). Dietas com baixa ingestão de ferro estão associadas ao risco de desenvolver cancro, não só do estômago mas também em outras zonas do tracto gastrointestinal. A deficiência em ferro também pode ser provocada por perda sanguínea, que pode ser causada pela infecção por *H. pylori*, já que esta bactéria induz gastrite hemorrágica com a resultante perda de ferro. A colonização por *H. pylori* provoca o aumento do pH do estômago, a diminuição dos níveis de vitamina C e, conseqüentemente, a diminuição da absorção de ferro proveniente da alimentação. A ingestão de bebidas alcoólicas influencia ligeiramente o risco de desenvolver cancro do estômago distal, mas não proximal. Por outro lado, uma dieta rica em frutas e vegetais com baixo teor de amido confere uma certa resistência ao desenvolvimento de carcinoma gástrico. A ingestão de alimentos ricos em flavonóides está associada a uma redução de 20% do risco de desenvolver cancro do estômago nas mulheres. Com a descoberta de técnicas de refrigeração dos alimentos, deu-se um aumento do consumo de frutas e vegetais frescos e os métodos de conservação de alimentos descritos acima tornaram-se obsoletos. A refrigeração dos alimentos durante as últimas décadas tem sido em parte responsável pela descida das taxas de incidência de cancro gástrico em várias populações mundiais (Cover e Peek, 2013).

### *Obesidade*

A obesidade é um problema crescente na sociedade moderna e está associada a um largo espectro de doenças, incluindo o carcinoma gástrico. Quando comparados com indivíduos com um índice de massa corporal (IMC) inferior a 25, indivíduos com IMC

entre 30 e 35 têm duas vezes mais probabilidade e indivíduos com IMC superior a 40 têm três vezes mais probabilidade de desenvolver cancro esófago-gástrico juncional, incluindo carcinoma gástrico. Por outro lado, a obesidade não é, por si só, um factor de risco para o cancro gástrico. Vários mecanismos são responsáveis pelo aumento do risco de desenvolver carcinomas gástricos em pacientes obesos. A gordura abdominal pode provocar directamente refluxo gastro-esofágico, um factor de risco para o cancro gástrico cárdia e cancro do esófago. Ainda, a gordura é metabolicamente activa e produz numerosos compostos que circulam pelo organismo, tais como o factor de crescimento semelhante à insulina e a leptina, compostos associados a patologias, possivelmente pela indução de alterações pró-crescimento no ciclo celular, diminuição da taxa de morte celular e alterações celulares pró-neoplásicas (Karimi *et al.*, 2014).

#### *Estatuto socio-económico*

Um estatuto socio-económico reduzido está associado a um risco elevado de mortalidade total e relacionada com causas específicas, incluindo a mortalidade devido à maioria dos tipos de cancro. O cancro gástrico e as suas lesões precursoras têm sido associados a marcadores do estatuto socio-económico baixo, tais como baixa escolaridade e rendimento. Taxas elevadas da infecção por *H. pylori*, um maior consumo de alimentos com amido ou pouco acesso a alimentos e vegetais frescos podem ser factores responsáveis pela associação entre o estatuto socio-económico e o risco elevado de desenvolver carcinoma gástrico (Karimi *et al.*, 2014).

## **ii. Factores de risco inerentes ao doente**

#### *Idade*

A taxa de incidência de cancro gástrico aumenta progressivamente com a idade. Num estudo efectuado entre 2005 e 2009 nos Estados Unidos da América, aproximadamente 1% dos casos ocorreu em indivíduos entre os 20 e os 34 anos de idade, enquanto 29% dos casos ocorreu em indivíduos entre os 75 e os 84 anos de idade, sendo o diagnóstico de cancro gástrico feito, em média, aos 70 anos de idade (Karimi *et al.*, 2014).

### *Sexo*

Comparado com o sexo feminino, indivíduos do sexo masculino têm um maior risco de desenvolver carcinomas gástricos, apesar de as razões para esta diferença não estar esclarecida. As diferenças sexuais podem reflectir diferenças fisiológicas, nomeadamente os estrogénios podem ser protectores contra o desenvolvimento do cancro gástrico. Em mulheres, um atraso na menopausa e uma maior fertilidade podem diminuir o risco de cancro gástrico, ao passo que fármacos anti-estrogénio podem aumentar a taxa de desenvolver este tipo de cancro. Estas hormonas podem fornecer protecção contra o cancro gástrico na idade fértil, mas após a menopausa o seu efeito fica diminuído, já que o desenvolvimento de cancro gástrico ocorre de forma similar nos homens e nas mulheres (Karimi *et al.*, 2014).

### *Raça*

A associação entre a raça e a incidência de cancro gástrico parece ser mediada principalmente por efeitos ambientais, e não genéticos. O Japão tem uma das taxas de incidência de cancro gástrico mais elevada e após a migração de japoneses para os Estados Unidos da América, a incidência mantém-se muito elevada na primeira geração. No entanto, após duas gerações, a taxa de incidência diminui e torna-se semelhante à dos indivíduos de linhagens americanas e europeias (Karimi *et al.*, 2014).

### *Genética*

Apenas 1% e 3% de todos os casos de cancro gástrico são devidos a síndromes hereditários, sendo que os restantes casos não estão relacionados com genes descobertos até à data. Estes síndromes hereditários incluem o cancro gástrico difuso hereditário (HDGC), a polipose adenomatosa familiar (FAP) e o síndrome de Peutz-Jeghers, todos autossómicos dominantes. O HDGC é uma forma de cancro gástrico rara, com um tipo de tumor invasivo do tipo difuso, uma apresentação tardia e prognóstico reservado, onde existe uma anomalia molecular que impede as adesões intercelulares por diminuição da expressão de E-caderina. Cerca de 25% das famílias com HDGC apresentam uma mutação genética, sendo a idade média de diagnóstico 38 anos e o risco

de desenvolver tumores superior a 80%, tanto para homens como para mulheres, a partir dos 80 anos. A FAP também é um síndrome colo-rectal provocado por uma mutação genética. Pacientes que expressem esta mutação apresentam uma probabilidade de desenvolver cancro colo-rectal até aos 35-40 anos de 100%, havendo um risco elevado de desenvolver outro tipo de patologias, nomeadamente cancro gástrico. O PJS é um síndrome raro provocado por uma mutação num gene responsável pela expressão de uma serina-treonina cinase que tem função supressora de tumores. Os seus sintomas incluem polipose gastrointestinal hamartomatosa e manchas de hiperpigmentação nos lábios e mucosa bucal (Karimi *et al.*, 2014).

### **3. Infecção por *H. pylori* e carcinoma gástrico**

Além dos factores de risco mencionados acima, o genótipo da estirpe de *H. pylori* que coloniza o estômago do hospedeiro é um parâmetro decisivo (Correa e Piazzuelo, 2012), tratando-se do agente etiológico que inicia a cascata inflamatória (Zhang *et al.*, 2005).

A carcinogénese dá-se por duas vias: por acção indirecta da *H. pylori* nas células epiteliais gástricas provocando inflamação ou por acção directa de agentes bacterianos provenientes da *cagPAI*, sendo que ambos os mecanismos ocorrem sinergicamente desenvolvendo-se o carcinoma (Karimi *et al.*, 2014). A resposta inflamatória é desencadeada pela adesão bacteriana às células epiteliais gástricas do hospedeiro, ocorrendo transporte de neutrófilos, células T e B, macrófagos e células plasmáticas, as quais libertam grandes quantidades de espécies reactivas de oxigénio e azoto envolvidas na lesão da mucosa gástrica e consequente carcinogénese. Os agentes bacterianos presentes na *cagPAI*, nomeadamente as proteínas CagA e VacA também são responsáveis por danos provocados pela bactéria na mucosa gástrica. A infecção por estirpes de *H. pylori cagA* positivas regulam a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), aumentando a sua libertação nos tecidos inflamados, o que leva ao aumento da síntese e libertação de prostaglandinas (nomeadamente PGE2). Este mecanismo aumenta a proliferação celular, inibe a apoptose e aumenta a capacidade invasora das células malignas, promovendo a carcinogénese. Após a erradicação da bactéria, a expressão de COX-2 diminui significativamente, o que demonstra a importância da *H. pylori* nesta via metabólica (Fuccio *et al.*, 2010).

A carcinogénese e a formação de lesões precursoras podem ser influenciadas por factores genéticos. Polimorfismos no TLR4, um receptor de superfície para LPS envolvido no reconhecimento da *H. pylori* e na resposta inflamatória, estão associados a um maior grau de inflamação com danos tecidulares graves em pacientes infectados por *H. pylori* (Fuccio *et al.*, 2010).

#### **4. Carcinogénese**

O desenvolvimento do carcinoma gástrico prolonga-se por várias décadas, iniciando-se na aquisição da infecção por *H. pylori* e no desenvolvimento de gastrite crónica activa. Ao longo do tempo, desenvolve-se a atrofia glandular e metaplasia intestinal e, mais tardiamente, surge o carcinoma gástrico (Zhang *et al.*, 2005). A inflamação crónica pode provocar danos nas células inflamadas e desencadear a carcinogénese. Em tecidos pré-malignos é possível encontrar células tumorais, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e monócitos, que contribuem para o desenvolvimento de cancro e metástases, devido à produção de citocinas e espécies reactivas de oxigénio e azoto. Estas destroem o DNA, RNA e proteínas, resultando em diversas mutações e na alteração das funções de determinadas enzimas e proteínas nos tecidos pré-malignos. A inflamação crónica origina gastrite activa crónica, atrofia multifocal, metaplasia intestinal, displasia gástrica e, por fim, adenocarcinoma gástrico invasivo (Park e Kim, 2015).

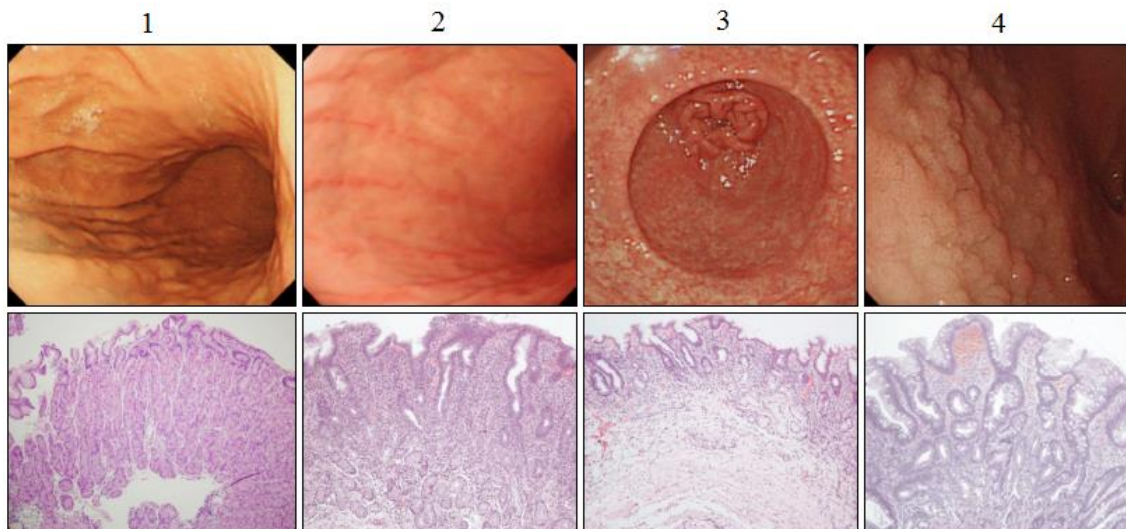
##### **i. Inflamação gástrica**

A inflamação crónica gástrica induz a perda de células parietais e células da mucosa glandular do estômago, estimulando a produção de populações de células precursoras. Estas alojam-se na mucosa gástrica, resultando na produção de diversas citocinas e quimiocinas e na quimiotaxia de células hematopoiéticas para os tecidos inflamados (Fox e Wang, 2007).

## ii. Lesões pré-cancerígenas

Se a *H. pylori* não for erradicada, a infecção e consequente gastrite persistem indefinidamente, normalmente durante toda a vida do paciente. Isto pode levar à perda das glândulas do estômago e ao desenvolvimento de gastrite atrófica multifocal, muitas vezes acompanhada de metaplasia intestinal (Kuipers, 1997).

Conforme se pode verificar na Figura 14, uma gastrite superficial (2) pode evoluir para gastrite atrófica (3) e metaplasia intestinal (4). A gastrite atrófica pode ser definida como a perda de tecido glândular especializado no corpo do estômago. Por outro lado, a

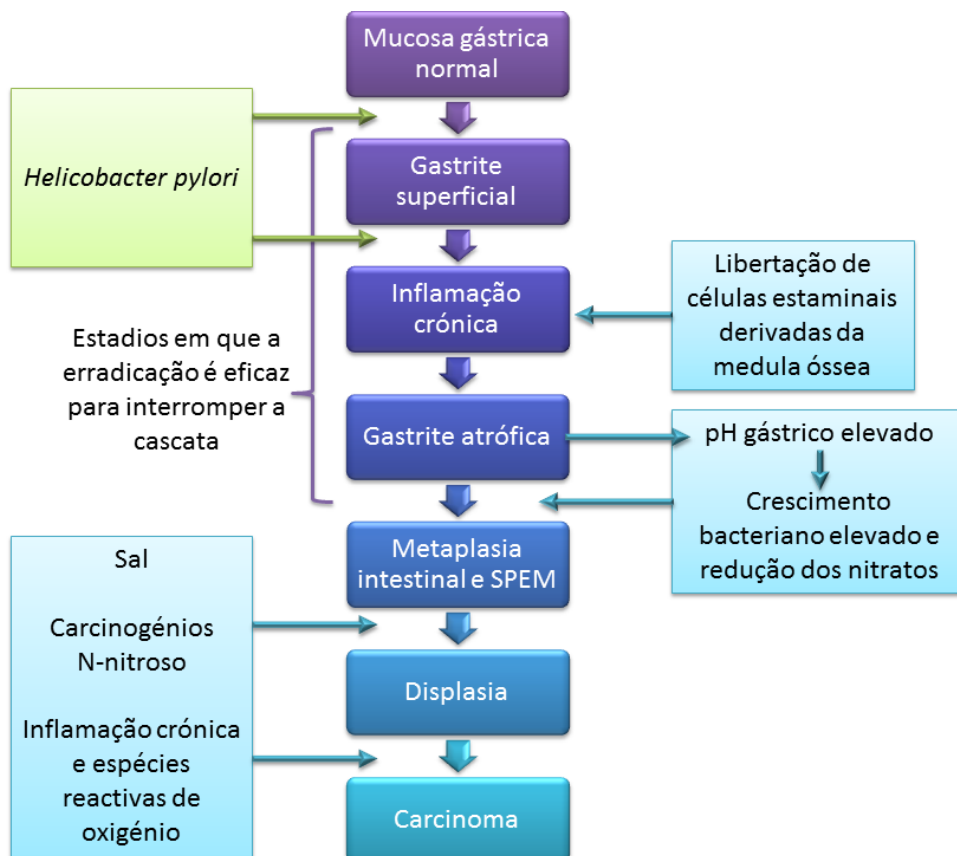


**Figura 14** – Evolução das lesões pré cancerígenas. 1 - Normal; 2- Gastrite superficial; 3 - Gastrite atrófica; 4 - Metaplasia intestinal (adaptado de Park e Kim, 2015).

metaplasia intestinal consiste na substituição das células (produtoras de muco, epiteliais e glandulares) gástricas originais por células epiteliares intestinais acompanhadas de infiltrados inflamatórios na lâmina própria. A atrofia gástrica é o melhor indicador de risco de cancro gástrico, já que no estudo de estômagos de pacientes com cancro gástrico do tipo intestinal observou-se que todos os estômagos analisados sofriam de gastrite atrófica, ao passo que nem todos sofriam de metaplasia intestinal. A gastrite atrófica pode ser encontrada num padrão multifocal ou difuso e está associada à presença de uma forma de metaplasia relacionada com o muco, a SPEM (metaplasia pseudopilórica). Esta, por sua vez, está mais fortemente associada ao cancro gástrico do que a metaplasia intestinal e pode ser um precursor da lesão cancerígena (Fox e Wang, 2007).

### iii. Carcinoma gástrico

Como já foi visto, o cancro gástrico nem sempre se desenvolve a partir da metaplasia intestinal. Este tipo de carcinoma pode ser dividido nos tipos intestinal e difuso, dependendo do grau de formação glândular pelas células tumorais. Ambos os processos iniciam-se com a gastrite provocada pela *H. pylori*, originando um crescimento tumoral de fenótipo variável (Akiyama e Uemura, 2009).



**Figura 15** – Cascata histológica de Correa (adaptado de Fox e Wang, 2007).

No entanto, apenas um dos processos envolve metaplasia intestinal, alteração da proteína p53 e displasia, terminando em cancro gástrico do tipo intestinal, a chamada cascata de Correa (Figura 15). No cancro gástrico do tipo intestinal, tanto o carcinoma como a mucosa adquirem características celulares intestinais separadamente (Akiyama e Uemura, 2009), sendo este o tipo de carcinoma gástrico mais fortemente associado à infecção por *H. pylori*. Entre 60 e 80% dos cancros do estômago desenvolve-se na curvatura inferior do antro, onde, originado pela falta de células G (devido à substituição por metaplasia intestinal) os níveis de gastrina são baixos, o que contribui

para uma hipossecreção pelas glândulas oxínticas. No entanto, a expressão de gastrina e a sua secreção são estimuladas pelas citocinas inflamatórias antes da atrofia propriamente dita. A gastrina actua como factor de crescimento das células parietais, o que sugere que a gastrina possa ter um papel no processo de atrofia deste tipo de glândulas. Quer se deva à hipossecreção pelas glândulas oxínticas ou à sua destruição, a hipocloridria resultante e as consequentes lesões atróficas antecedem a carcinogénese. (Merchant, 2005).

O cancro gástrico do tipo difuso apresenta um fenótipo pouco variável e, neste caso, a arquitectura glândular encontra-se completamente destruída. Este tipo de cancro gástrico está associado a mutações no gene que expressa a proteína E-caderina discutida anteriormente, reduzindo a expressão deste receptor de adesão celular transmembranar, o que provoca alterações na adesão inter e intracelular, na polaridade e no citoesqueleto (Merchant, 2005).

#### **IV. Diagnóstico da infecção por *H. pylori* no carcinoma gástrico**

##### **1. Importância do diagnóstico da infecção**

A *H. pylori* é uma bactéria altamente adaptada ao ambiente gástrico humano, observando-se um elevado polimorfismo genético, como foi mencionado anteriormente. A sua diversidade genética facilita a adaptação da bactéria ao ambiente e permite a sua evolução juntamente com o hospedeiro. Devido à gravidade de resultados clínicos associados à infecção por esta bactéria, foram desenvolvidas técnicas laboratoriais, tanto invasivas como não invasivas, que permitam detectar a infecção por *H. pylori*. As técnicas invasivas envolvem o processo de endoscopia. As técnicas não invasivas são recomendadas em pacientes cujos sintomas não exijam endoscopia. Actualmente, nenhum teste é 100% infalível, sendo necessários dois testes para garantir o correcto diagnóstico da infecção. A escolha dos testes utilizados varia consoante o custo, a sua disponibilidade, as circunstâncias clínicas e a razão de probabilidade entre testes positivos e negativos (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

## **2. Técnicas de diagnóstico invasivas**

### **i. Endoscopia**

A endoscopia convencional é realizada para diagnosticar patologias relacionadas com a *H. pylori*, tais como gastrite atrófica, linfoma de MALT, úlcera péptica ou cancro gástrico. Na maioria dos casos, o local ideal para a detecção da infecção por *H. pylori* por biópsia é o antro, apesar de biópsias da grande curvatura do corpo sejam preferenciais em pacientes com atrofia antral ou metaplasia intestinal, de modo a evitar-se resultados falso-negativos. A distribuição irregular da *H. pylori* no estômago conduz a erros de amostragem inevitáveis e a maioria das características de uma mucosa infectada por *H. pylori* (vermelhidão, inchaço da mucosa ou alteração de nódulos) não são suficientemente específicas para um diagnóstico definitivo. A endoscopia convencional também é utilizada como método de obtenção de biópsias da mucosa gástrica que serão utilizadas como amostra nos testes de diagnóstico descritos abaixo. No entanto, a endoscopia convencional é um processo muito demorado e pode não produzir melhores resultados do que outras técnicas. Na endoscopia de magnificação faz-se a observação directa da micro-estrutura da superfície da mucosa gástrica com elevada resolução, o que permite relacionar as alterações histopatológicas com o grau da infecção por *H. pylori*. Outra técnica de endoscopia de magnificação é a endomicroscopia a laser confocal, que analisa a sub-superfície da mucosa gástrica e permite a observação histológica *in vivo* durante o procedimento (Wang et al., 2015).

## **3. Técnicas de diagnóstico decorrentes da endoscopia**

### **i. Histologia**

O diagnóstico histológico permite obter-se informação acerca do grau da inflamação e da patologia associada (gastrite atrófica, metaplasia intestinal ou carcinoma), além da detecção de *H. pylori*. A bactéria pode ser identificada em colorações de rotina como a hematoxilina e a eosina, mas a especificidade do diagnóstico pode ser aumentada usando-se corantes especiais como o Giemsa, o Genta ou o corante prata Warthin-Starry, usados na detecção da presença da bactéria na forma cocóide. Este processo é

longo, dispendioso e necessita de um processamento prévio da biópsia e de pessoal habilitado para a coloração e interpretação de resultados (Atkinson e Braden, 2016).

Quando o grau de inflamação na biópsia sugere infecção por *H. pylori*, mas a bactéria não é visível, recorre-se ao processo de imunohistoquímica. Este processo é mais sensível e mais específico e permite que organismos com morfologia semelhante à *H. pylori* sejam excluídos do diagnóstico (Atkinson e Braden, 2016).

## **ii. Cultura celular**

A cultura a partir de biópsias é um processo complicado, muito longo e de baixa especificidade, o que dificulta o seu uso em diagnósticos de rotina. Por outro lado, a cultura de *H. pylori* permite a realização de testes para a sensibilidade bacteriana a antibióticos, facilitando a escolha do agente terapêutico mais eficaz. As normas de Maastricht IV recomendam o teste de susceptibilidade a antibióticos quando a terapia de segunda linha falha ou quando se estima que a resistência primária da bactéria à claritromicina seja superior a 20%. A cultura de *H. pylori* é feita a partir de biópsias gástricas, já que é extremamente difícil isolar a bactéria em amostras provenientes de fezes, saliva ou placa bacteriana dentária (Wang *et al.*, 2015).

## **iii. RUT (Teste rápido à urease)**

Este teste tem por base a reacção da urease característica da *H. pylori*. Neste teste, a amostra (biópsia) é colocada num gel que contém ureia (substrato). Se a urease bacteriana estiver presente na amostra, a ureia é hidrolisada produzindo-se dióxido de carbono e amónia, o que resulta numa alteração do pH observada devido à presença de um indicador de pH. É aconselhado que se coloque uma biópsia proveniente do antro e outra do corpo no mesmo gel, de modo a obter-se um resultado mais conclusivo. Este teste é rápido, simples e de baixo custo. Este teste é bastante preciso, a sua sensibilidade varia entre 80 e 100% e a sua especificidade varia entre 97 e 99%. Quando o paciente apresenta acloridria, o RUT pode apresentar resultados falso-positivos, que se devem à presença de outras bactérias produtoras de urease, como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ou *Proteus mirabilis*, entre outras. Resultados falso-positivos

podem ocorrer 24 horas após efectuado o teste, já que apesar de o gel conter uma substância inibidora do crescimento bacteriano, poderá dar-se o crescimento de bactérias produtoras de urease que não a *H. pylori*, após este período de tempo (Atkinson e Braden, 2016).

#### **4. Técnicas de diagnóstico não invasivas**

Os testes de diagnóstico da infecção por *H. pylori* que utilizam amostras obtidas por processos não invasivos incluem análises ao ar expelido pelos pulmões, às fezes e ao soro, em *kits* de diagnóstico rápido (Wang *et al.*, 2015).

##### **i. UBT (Teste à ureia presente no ar expirado)**

Este teste é o teste mais eficaz, com uma sensibilidade e especificidade de cerca de 95% em adultos e cerca de 90% em crianças com idade inferior a seis anos. O teste é relativamente simples, baseia-se na detecção da actividade da urease bacteriana e requer que o paciente beba uma solução de um substrato <sup>13</sup>C-ureia, recolhendo-se amostras do ar expirado antes da ingestão e 15 a 30 minutos após a ingestão do substrato. Se a *H. pylori* colonizar a mucosa gástrica, a ureia presente na solução ingerida é hidrolisada em amónia e ácido carbónico, que são absorvidos para a corrente sanguínea, sendo expirado dióxido de carbono <sup>13</sup>C, que é detectado pelo teste. A concentração de dióxido de carbono <sup>13</sup>C é proporcional à densidade bacteriana na mucosa gástrica do paciente. É aconselhado um período de jejum antes da realização do teste de modo a otimizar o contacto entre a solução com o substrato e as bactérias. A amostra de ar expirado é analisada por espectrometria de massa ou espectroscopia de infravermelhos isótopo-selectiva. Já que as amostras de ar expirado podem ser armazenadas até um mês, podem ser enviadas para laboratórios especializados, o que faz com que este teste esteja facilmente disponível (Atkinson e Braden, 2016).

##### **ii. Serologia**

Na análise de amostras de soro provenientes de pacientes infectados por *H. pylori* por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) faz-se a pesquisa de anticorpos IgG e IgA

anti-*H. pylori*. A pesquisa de IgG é muitas vezes o primeiro teste de diagnóstico efectuado tanto num cenário clínico como em estudos epidemiológicos. Como os anticorpos persistem após a erradicação da bactéria, a pesquisa de IgG não permite fazer a distinção entre uma infecção aguda ou terminada, não sendo o método ideal para a verificação do sucesso da terapia de erradicação. Devido à variabilidade de estirpes de *H. pylori* em todo o mundo, os *kits* devem ser adaptados à área geográfica em questão, ou devem ser utilizadas preparações com uma maior variedade de antígenos. Deve ter-se em atenção que a baixa especificidade da serologia pode produzir resultados falso-positivos em zonas de baixa prevalência de infecção por *H. pylori*, sendo aconselhada a confirmação dos resultados por um método alternativo, normalmente o UBT ou o SAT (detecção fecal de antígenos). Em pacientes com baixa densidade bacteriana (quer devido ao uso de fármacos inibidores da bomba de prótons e/ou antibióticos ou devido a causas clínicas como gastrite atrófica, metaplasia intestinal extensa ou até linfoma de MALT, entre outras) a serologia não origina resultados falsamente positivos. Os testes de pesquisa de IgG são de baixo custo e estão disponíveis na maioria dos laboratórios de análises, sendo a pesquisa de IgA menos fiável do que a pesquisa de IgG. No entanto, através do uso de anticorpos específicos, este método permite identificar factores de virulência bacterianos como as proteínas CagA e VacA. A pesquisa de anticorpos por ELISA também pode ser efectuada em amostras de urina ou saliva, apesar de a concentração de anticorpos presente nestas amostras ser mais baixa do que no soro, o que dificulta a sua detecção (Atkinson e Braden, 2016).

### **iii. SAT (Detecção fecal de antígenos)**

Este teste baseia-se na pesquisa imunocromatográfica ou através de ensaio de imunoencontro da presença de antígenos *H. pylori* presentes em amostras de fezes. Tem a vantagem de ser rápido, de custo reduzido, de a colheita das amostras ser relativamente simples, mesmo em crianças e de ser tão simples como um teste de gravidez comum, não sendo necessário equipamento laboratorial específico. Este teste pode ser feito em *kits* com anticorpos mono ou policlonais, sendo a sensibilidade do teste superior no primeiro caso. É necessário ter em consideração que, no caso de o paciente ter diarreia ou não produzir fezes completamente formadas, a amostra pode ter uma concentração de

antígeno inferior ao esperado por se encontrar diluída, diminuindo a sensibilidade do teste (Wang *et al.*, 2015).

## **5. Técnicas baseadas no DNA bacteriano**

A análise de biópsias obtidas por endoscopia utilizando a técnica de PCR permite a detecção de pequenas quantidades de bactéria, a identificação dos seus genes de virulência e mutações específicas associadas à resistência aos antibióticos. A elevada sensibilidade desta técnica possibilita a detecção de DNA de *H. pylori* em amostras obtidas não invasivamente, como placa dentária, saliva, urina, fezes ou sucos gástricos. As desvantagens deste método são a presença de inibidores da polimerase bacterianos na amostra e a possibilidade de contaminação durante a colheita das amostras. Actualmente, o PCR não é a técnica preferencial devido ao seu custo elevado (Atkinson e Braden, 2016).

### **i. Objectivos: determinação de resistências aos antibióticos, quantificação, caracterização genómica**

Além da detecção da bactéria nas amostras, a análise por PCR permite determinar o local de codificação dos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos mais utilizados na erradicação da *H. pylori*. Por exemplo, já foi identificada a resistência ao metronidazol por PCR, que se deve a mutações no gene *rdxA* que codifica uma NADPH nitroreductase que não é sensível ao oxigénio (esta enzima metaboliza o metronidazol originando um metabolito activo que é tóxico para a bactéria). Além do metronidazol, foram testadas resistências à amoxicilina, rifamicina, rifabutina, rifapina e claritromicina (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

A quantificação bacteriana pode ser efectuada pela técnica de RT-PCR altamente sensível, que permite a quantificação de moléculas sem ser necessária a co-amplificação de pseudogenes ou genómica (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

Através das técnicas de “microarray” e hibridização de supressão subtractiva (SSH) é possível realizar a caracterização genómica, determinando as diferenças nas sequências

de DNA entre estirpes bacterianas, obtendo-se informações quanto à expressão genética, polimorfismos ou mutações e permitindo a caracterização genética de diferentes subtipos das patologias associadas à *H. pylori*. Na maioria dos casos, é necessária uma amplificação por PCR do DNA bacteriano, por a quantidade presente nas amostras não ser suficiente. Este método não permite detectar pequenas deleções, mutações pontuais, rearranjos ou deleções em regiões intergenéticas. Estas técnicas têm um custo elevado e requerem material específico e pessoal qualificado, pelo que não estão disponíveis em todos os laboratórios (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

As várias metodologias de PCR têm como alvo diversos marcadores bacterianos, incluindo os genes *cagA*, *vacA*, *iceA*, *picB*, *ureA*, *ureB*, *ureC*, *rpoB*, *rdxA*, *cdrA*, *hpaA*, *babA2*, *flaA* e *flaB* (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

## **ii. PCR**

Os métodos moleculares de detecção bacteriana permitem ultrapassar dificuldades relacionadas com a cultura celular e a obtenção de bactérias viáveis. Devido à sua elevada sensibilidade, o PCR é um método adequado ao diagnóstico quando a bactéria está presente em baixa quantidade, é de crescimento lento ou de identificação complicada. Apesar de ser um método altamente sensível, também é susceptível de inibição por contaminantes presentes na amostra, originando resultados falsamente positivos (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

## **iii. PCR em tempo real**

A técnica quantitativa de PCR em tempo real com fluorescência permite detectar o genótipo e as mutações em estirpes de *H. pylori*. Esta análise apresenta vantagens relativamente ao método clássico de PCR, incluindo prevenção da contaminação da amostra, maior rapidez e o facto de permitir uma análise quantitativa, factores com utilidade quando se comparam diferentes regimes terapêuticos (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

#### **iv. PCR-RFLP**

Em vários estudos, a técnica de PCR com Restrição no Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos (PCR-RFLP) permite analisar os polimorfismos genéticos da *H. pylori* por detecção das mutações A-G mais comuns associadas à resistência à claritromicina, obtendo-se resultados mais específicos, mais rapidamente (Ruzsovcics *et al.*, 2004).

#### **V. Tratamento: Erradicação da *H. pylori***

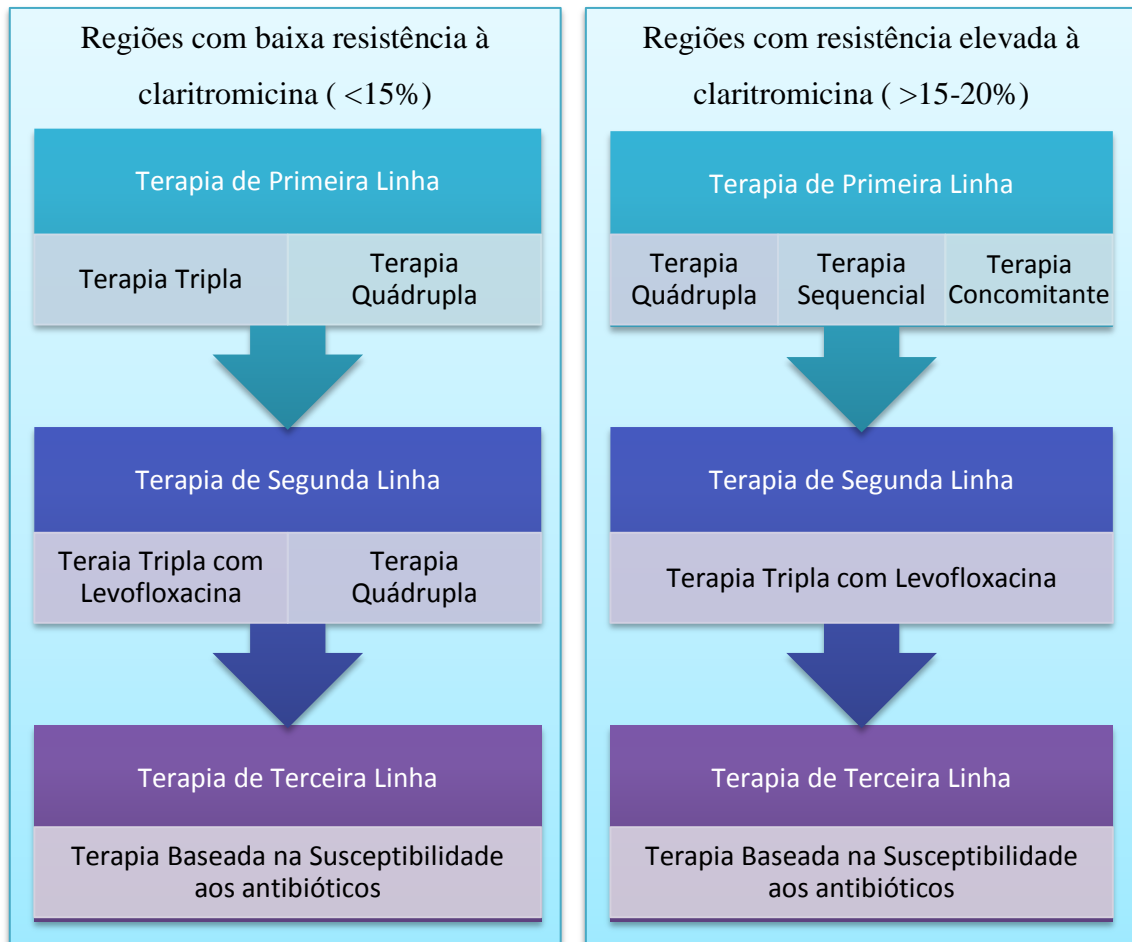
Está comprovado que a erradicação da infecção por *H. pylori* pode prevenir a progressão das lesões pré-cancerígenas para carcinoma. No entanto, esta situação só se verifica se ainda não existir a condição de metaplasia intestinal, já que a partir desta alteração é impossível impedir a progressão da cascata histológica de Correa, apesar do desenvolvimento da metaplasia intestinal ser retardado (Malfertheiner *et al.*, 2012).

##### **1. Terapias de primeira, segunda e terceira linha**

Deve ter-se em consideração a crescente resistência aos antibióticos utilizados no tratamento da infecção por *H. pylori*, nomeadamente a claritromicina, escolhendo-se o antibiótico alternativo mais adequado quando a resistência à claritromicina se encontrar entre os 15 e os 20% (Malfertheiner *et al.*, 2007). Em 2014, um estudo concluiu que a resistência à claritromicina em Portugal se encontra na escala dos 50% (Almeida *et al.*, 2014).

A terapia tripla consiste na administração de um fármaco inibidor da bomba de prótons (IBP) e dois antibióticos (claritromicina e amoxicilina ou metronidazol), com a duração de sete, dez ou catorze dias (Malfertheiner *et al.*, 2012). A terapia quádrupla com bismuto não é utilizada em Portugal (Almeida *et al.*, 2014), apesar de ser uma opção noutros países, nomeadamente nos Estados Unidos da América, e consiste na administração do fármaco inibidor da bomba de prótons (IBP), um sal de bismuto e dois antibióticos (metronidazol ou tinidazol e uma tetraciclina), com a duração de dez ou catorze dias (Malfertheiner *et al.*, 2007). A terapia sequencial consiste na administração dos antibióticos isoladamente, iniciando-se com a administração do IBP juntamente

com amoxicilina durante cinco dias, seguindo-se a administração do IBP e dois antibióticos (claritromicina e metronidazol ou tinidazol) durante mais cinco dias (O'Connor *et al.*, 2015). A terapia concomitante é uma terapia que conjuga os fármacos da terapia sequencial, mas administrados conforme a terapia quádrupla (simultaneamente) (Graham e Rimbara, 2011) e com a sua duração (dez ou catorze dias). A terapia tripla com levofloxacina consiste, conforme o nome indica, na administração do IBP e de dois antibióticos (amoxicilina e levofloxacina) durante dez ou catorze dias. Se não se verificar a erradicação da *H. pylori* após a terapia de segunda linha, o tratamento deve ser conduzido mediante os resultados obtidos em testes de susceptibilidade bacteriana a antibióticos (Figura 16). A confirmação da erradicação é feita através dos testes UBT e SAT (Malfertheiner *et al.*, 2012).



**Figura 16** – Resumo esquemático das terapias de erradicação da *H. pylori* (adaptado de Malfertheiner *et al.*, 2012).

## VI. Conclusão

Apesar de a prevalência da infecção por *H. pylori* ter vindo a diminuir nas últimas décadas, cerca de 50% da população mundial está actualmente infectada por esta bactéria classificada pela OMS como agente carcinogénico do Grupo 1. No entanto, apenas um número reduzido de indivíduos infectados desenvolvem carcinomas, sendo necessária uma conjugação de factores de virulência bacterianos e factores inerentes ao hospedeiro para que tal ocorra, estando também associada a diversas patologias não só gastrointestinais, mas também neurológicas, dermatológicas, entre outras.

Esta bactéria que cora negativamente por Gram, espiralada, possui flagelos polares que lhe conferem um elevado grau de motilidade, o que permite a sua deslocação até ao local-alvo, uma vez no compartimento gástrico. Aí, estabiliza o pH ácido do estômago em valores alcalinos através da sua urease endógena e liga-se às células epiteliais gástricas por meio de adesinas como a BabA e a SabA. Após a adesão, o T4SS codificado pela *cagPAI* abre poros nas células do hospedeiro e facilita a entrada de toxinas bacterianas para a célula, nomeadamente a CagA e a VacA, iniciando-se a lesão celular e a resposta inflamatória.

Na resposta inflamatória desencadeada pela *H. pylori*, intervêm os macrófagos, as células dendríticas, e os linfócitos predominantemente Th1. A *H. pylori* é capaz de escapar à fagocitose pelos macrófagos e diminuir a proliferação das células Th1, razão pela qual é tão persistente no organismo do hospedeiro. A infecção contínua é responsável pelo facto de a mucosa gástrica de pacientes infectados apresentar níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias.

Estas alterações celulares induzidas pela *H. pylori* desencadeiam, de forma directa ou indirecta, a carcinogénese das células epiteliais gástricas, que se inicia na gastrite superficial, passando pela inflamação crónica até à gastrite atrófica. Até aqui, ainda é possível reverter a lesão e impedir a progressão para carcinoma gástrico. Se não for tratada, a gastrite atrófica evolui para metaplasia intestinal, SPEM, displasia e, posteriormente, carcinoma (a chamada cascata de Correa).

Aquando da suspeita de patologias associadas à infecção por *H. pylori*, o diagnóstico pode ser feito recorrendo-se a métodos invasivos (tais como a endoscopia) ou não invasivos (tais como o UBT ou o SAT) e a erradicação da infecção é o primeiro passo para o tratamento da patologia em questão, principalmente tratando-se de carcinomas gástricos. A erradicação da infecção pode ser um processo complicado e de longa duração devido à elevada variabilidade genética desta bactéria, à sua excelente capacidade de adaptação a condições adversas e à elevada taxa de resistência a determinados antibióticos.

Devido à sua elevada prevalência e à gravidade das patologias associadas a esta bactéria, a continuidade do seu estudo e caracterização, cada vez mais aprofundados devido aos avanços da tecnologia e medicina, é de elevada importância.

## VII. Bibliografia

- Akiyama, J. e Uemura, N. (2009). Intestinal metaplasia subtype and gastric cancer risk. *J Gastroenterol Hepatol*, 24, pp. 4-6.
- Alakkari, A., *et al.* (2011). *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. *Helicobacter*, 16 Suppl 1, pp. 33-7.
- Alm, R. A. e Noonan, B. (2001). Chapter 27: The Genome. *In: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. e Hazell, S. (Eds.) Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* Washington, ASM Press, pp. 295-312.
- Almeida, N., *et al.* (2014). *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance rates in the central region of Portugal. *Clin Microbiol Infect*, 20, pp. 1127-33.
- Alvarez-Arellano, L. e Maldonado-Bernal, C. (2014). *Helicobacter pylori* and neurological diseases: Married by the laws of inflammation. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 5, pp. 400-4.
- Andersen, L. P. e Wadström, T. (2001). Chapter 4: Basic Bacteriology and Culture. *In: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. e Hazell, S. L. (Eds.) Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* Washington (DC), ASM Press, pp. 27-39.
- Appelmek, B. J. e Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2001). Chapter 35: Lipopolysaccharide Lewis Antigens. *In: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. e Hazell, S. L. (Eds.) Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* Washington, ASM Press, pp. 419-428.
- Atkinson, N. S. e Braden, B. (2016). *Helicobacter Pylori* Infection: Diagnostic Strategies in Primary Diagnosis and After Therapy. *Dig Dis Sci*, 61, pp. 19-24.
- Azevedo, N. F., *et al.* (2007). A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Crit Rev Microbiol*, 33, pp. 157-69.
- Bastos, J., *et al.* (2013a). Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Portuguese adults. *Helicobacter*, 18, pp. 413-22.
- Bastos, J., *et al.* (2013b). Prevalence, incidence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a cohort of Portuguese adolescents (EpiTeen). *Dig Liver Dis*, 45, pp. 290-5.
- Benajah, D. A., *et al.* (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* and its recurrence after successful eradication in a developing nation (Morocco). *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 37, pp. 519-26.
- BioCYC. 2016. *Helicobacter pylori* Pathway/Genome Databases [Em linha]. Disponível em: <http://helicobacter.biocyc.org/> [Consultado a: 27-05-2016].
- Blaser, M. J. (1998). *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ*, 316, pp. 1507-10.
- Bulajic, M., *et al.* (2014). *Helicobacter pylori* and pancreatic diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 5, pp. 380-3.
- Bures, J., *et al.* (2012). Significant decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* in the Czech Republic. *World J Gastroenterol*, 18, pp. 4412-8.
- Chang, H., *et al.* (2016). Cortactin Mediates Apoptosis of Gastric Epithelial Cells Induced by VacA Protein of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*, 61, pp. 80-90.
- Cooke, C. L., *et al.* (2005). The role of genome diversity and immune evasion in persistent infection with *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 45, pp. 11-23.
- Correa, P. e Piazzuelo, M. B. (2012). Evolutionary History of the *Helicobacter pylori* Genome: Implications for Gastric Carcinogenesis. *Gut Liver*, 6, pp. 21-8.

- Cover, T. L. e Peek, R. M., Jr. (2013). Diet, microbial virulence, and *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gut Microbes*, 4, pp. 482-93.
- da Costa, D. M., *et al.* (2015). What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World J Gastroenterol*, 21, pp. 10563-72.
- den Hollander, W. J., *et al.* (2013). *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. *Helicobacter*, 18 Suppl 1, pp. 24-7.
- Dore, M. P., *et al.* (2012). Gastrointestinal symptoms and *Helicobacter pylori* infection in school-age children residing in Porto Torres, Sardinia, Italy. *Helicobacter*, 17, pp. 369-73.
- Duque, X., *et al.* (2012). Natural history of *Helicobacter pylori* infection in Mexican schoolchildren: incidence and spontaneous clearance. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 55, pp. 209-16.
- Eusebi, L. H., *et al.* (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 19 Suppl 1, pp. 1-5.
- Faria, C., *et al.* (2013). *Helicobacter pylori* and autoimmune diseases. *Biomed Pharmacother*, 67, pp. 347-9.
- Fock, K. M. (2014). Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 40, pp. 250-60.
- Ford, A. C. e Axon, A. T. (2010). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter*, 15 Suppl 1, pp. 1-6.
- Fox, J. G. e Wang, T. C. (2007). Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*, 117, pp. 60-9.
- Franceschi, F., *et al.* (2014). *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Helicobacter*, 19 Suppl 1, pp. 52-8.
- Fuccio, L., *et al.* (2010). Gastric cancer, *Helicobacter pylori* infection and other risk factors. *World J Gastrointest Oncol*, 2, pp. 342-7.
- Furuta, T. e Delchier, J. C. (2009). *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter*, 14 Suppl 1, pp. 29-35.
- Ghasemi-Kebria, F., *et al.* (2013). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among Iranian children. *Arab journal of gastroenterology : the official publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology*, 14, pp. 169-72.
- Globocan. 2012. *Cancer Fact Sheets* [Em linha]. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) [Consultado a: 16/06/2016].
- Graham, D. Y. e Rimbara, E. (2011). Understanding and appreciating sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol*, 45, pp. 309-13.
- Hanafi, M. I. e Mohamed, A. M. (2013). *Helicobacter pylori* infection: seroprevalence and predictors among healthy individuals in Al Madinah, Saudi Arabia. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*, 88, pp. 40-5.
- Hellstrom, P. M. (2006). This year's Nobel Prize to gastroenterology: Robin Warren and Barry Marshall awarded for their discovery of *Helicobacter pylori* as pathogen in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*, 12, pp. 3126-7.
- IARC, W. H. O.-. 2016. *LIST OF CLASSIFICATIONS, VOLUMES 1-115* [Em linha]. Disponível em: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php) [Consultado a: 12/05/2016].
- Kao, C. Y., *et al.* (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*, 39, pp. 14-23.
- Karimi, P., *et al.* (2014). Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23, pp. 700-13.

- Keilberg, D. e Ottemann, K. M. (2016). How *Helicobacter pylori* senses, targets and interacts with the gastric epithelium. *Environ Microbiol*, 18, pp. 791-806.
- Kennemann, L., *et al.* (2011). *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, pp. 5033-8.
- Krashias, G., *et al.* (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA and vacA genes in Cypriot patients. *J Infect Dev Ctries*, 7, pp. 642-50.
- Kuipers, E. J. (1997). *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 11 Suppl 1, pp. 71-88.
- Kutter, S., *et al.* (2008). Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol*, 190, pp. 2161-71.
- Leja, M., *et al.* (2012). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis in Latvia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 24, pp. 1410-7.
- Magen, E. e Delgado, J. S. (2014). *Helicobacter pylori* and skin autoimmune diseases. *World J Gastroenterol*, 20, pp. 1510-6.
- Malfertheiner, P., *et al.* (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56, pp. 772-81.
- Malfertheiner, P., *et al.* (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61, pp. 646-64.
- Merchant, J. L. (2005). Inflammation, atrophy, gastric cancer: connecting the molecular dots. *Gastroenterology*, 129, pp. 1079-82.
- Miranda, N., *et al.* (2016). Portugal – Doenças Oncológicas em números – 2015. In: Saúde, D. G. D. (Ed.). Lisboa: Direcção Geral de Saúde.
- Mobley, H. L. T. (2001). Chapter 16: Urease. In: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. e Hazell, S. L. (Eds.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington, ASM Press, pp. 179-192.
- O'Connor, A., *et al.* (2015). Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2015. *Helicobacter*, 20 Suppl 1, pp. 54-61.
- O'Rourke, J. e Bode, G. (2001). Chapter 6: Morphology and Ultrastructure. In: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. e Hazell, S. L. (Eds.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC), ASM Press, pp. 53-68.
- Ozaydin, N., *et al.* (2013). Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the (1)(3)C-Urea breath test. *BMC Public Health*, 13, pp. 1215.
- Pacheco, S. L., *et al.* (2013). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of reduced-dose (1)(3)C-urea breath test and early sampling of exhaled breath. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57, pp. 607-11.
- Park, Y. H. e Kim, N. (2015). Review of atrophic gastritis and intestinal metaplasia as a premalignant lesion of gastric cancer. *J Cancer Prev*, 20, pp. 25-40.
- Peleteiro, B., *et al.* (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci*, 59, pp. 1698-709.
- Porras, C., *et al.* (2013). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer causes & control : CCC*, 24, pp. 209-15.
- Pride, D. T., *et al.* (2001). Allelic Variation within *Helicobacter pylori* babA and babB. *Infection and immunity*, 69, pp. 1160-71.

- Prinz, C., *et al.* (2003). *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol*, 11, pp. 134-8.
- Rassow, J. e Meinecke, M. (2012). *Helicobacter pylori* VacA: a new perspective on an invasive chloride channel. *Microbes Infect*, 14, pp. 1026-33.
- Roesler, B. M., *et al.* (2014). Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clin Med Insights Gastroenterol*, 7, pp. 9-17.
- Rokkas, T., *et al.* (2007). *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter*, 12 Suppl 1, pp. 20-2.
- Ruzsovics, A., *et al.* (2004). Review article: Deoxyribonucleic acid-based diagnostic techniques to detect *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, 19, pp. 1137-46.
- Sethi, A., *et al.* (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* in a First Nations population in northwestern Ontario. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 59, pp. e182-7.
- Shiota, S., *et al.* (2013). The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *J Dig Dis*, 14, pp. 341-9.
- Shiotani, A., *et al.* (2001). Beneficial effect of *Helicobacter pylori* eradication in dermatologic diseases. *Helicobacter*, 6, pp. 60-5.
- Shirin, H., *et al.* (2008). *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter*, 13 Suppl 1, pp. 23-7.
- Shmuely, H., *et al.* (2012). *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. *Helicobacter*, 17 Suppl 1, pp. 22-5.
- Sodhi, J. S., *et al.* (2013). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and the effect of its eradication on symptoms of functional dyspepsia in Kashmir, India. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28, pp. 808-13.
- Suerbaum, S. e Josenhans, C. (1999). Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Mol Med Today*, 5, pp. 32-9.
- Tavira, L. T. (2000). Capítulo 12: *Helicobacter*. In: Sousa, J. C. F. e Ferreira, W. F. C. (Eds.) *Microbiologia Volume II*. Lisboa, Lidel, pp. 145-149.
- Terradot, L. e Waksman, G. (2011). Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. *FEBS J*, 278, pp. 1213-22.
- Testerman, T. L., *et al.* (2001). Chapter 34: Adherence and Colonization. In: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. e Hazell, S. L. (Eds.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington, ASM Press, pp. 381-428.
- TheHelicobacterFoundation. 2006. *Epidemiology* [Em linha]. Disponível em: [http://studio.helicobacter.com/h\\_epidemiology.html](http://studio.helicobacter.com/h_epidemiology.html) [Consultado a: 17/04/2016].
- Torres, L. E., *et al.* (2009). Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World journal of gastroenterology*, 15, pp. 204-10.
- Vaira, D., *et al.* (2001). Review article: the transmission of *Helicobacter pylori* from stomach to stomach. *Aliment Pharmacol Ther*, 15 Suppl 1, pp. 33-42.
- Vale, F. F. e Vitor, J. M. (2010). Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? *Int J Food Microbiol*, 138, pp. 1-12.
- Vianna, J. S., *et al.* (2015). Detection of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA in gastric biopsy specimens and its relation to gastric diseases. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 83, pp. 89-92.
- Vogelaar, I. P., *et al.* (2012). Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause helps to understand its etiology. *Hered Cancer Clin Pract*, 10, pp. 18.

- Wang, Y. K., *et al.* (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*, 21, pp. 11221-35.
- Wen, S. e Moss, S. F. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*, 282, pp. 1-8.
- Whalen, M. B. e Massidda, O. (2015). *Helicobacter pylori*: enemy, commensal or, sometimes, friend? *J Infect Dev Ctries*, 9, pp. 674-8.
- Wilson, K. T. e Crabtree, J. E. (2007). Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*, 133, pp. 288-308.
- Wroblewski, L. E., *et al.* (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*, 23, pp. 713-39.
- Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 7, pp. 629-41.
- Yu, Y., *et al.* (2014). Association between *Helicobacter pylori* infection and pathological changes in the gastric mucosa in Chinese children. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 53, pp. 83-8.
- Zhang, C., *et al.* (2005). *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 11, pp. 791-6.