

**CHRISTIANE TEIXEIRA CARTELLE**

**ESTUDO DA APOPTOSE EM PACIENTES INFECTADOS POR *HELICOBACTER*  
*PYLORI* PORTADORES DE DOENÇAS COM DIFERENTES RISCOS DE  
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER GÁSTRICO**

**Belo Horizonte  
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG  
FACULDADE DE MEDICINA**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO DA APOPTOSE EM PACIENTES INFECTADOS POR *HELICOBACTER  
PYLORI* PORTADORES DE DOENÇAS COM DIFERENTES RISCOS DE  
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER GÁSTRICO**

**Belo Horizonte  
2010**

**CHRISTIANE TEIXEIRA CARTELLE**

**ESTUDO DA APOPTOSE EM PACIENTES INFECTADOS POR *HELICOBACTER*  
*PYLORI* PORTADORES DE DOENÇAS COM DIFERENTES RISCOS DE  
DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER GÁSTRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Patologia – área de concentração Patologia Geral.

**Orientadora:** Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes  
**Coorientadora:** Dr. Eládio Oswaldo Flores Sanchez

**Belo Horizonte – MG  
Faculdade de Medicina da UFMG  
2010**

C322e Cartelle, Christiane Teixeira.  
Estudo da apoptose em pacientes infectados por *Helicobacter pylori* portadores de doenças com diferentes riscos de desenvolvimento de Câncer Gástrico [manuscrito]. / Christiane Teixeira Cartelle. - - Belo Horizonte: 2010.  
106f.: il.  
Orientador (a): Rosa Maria Esteves Arantes.  
Coorientador (a): Eládio Oswaldo Flores Sanchez.  
Área de concentração: Patologia Geral.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Apoptose. 3. Neoplasias Gástricas. 4. Gastrite. 5. Úlcera. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Arantes, Rosa Maria Esteves. II. Sanchez, Eládio Oswaldo Flores. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 375

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental, do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e no Laboratório de patologia gástrica, do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A parte clínica do estudo foi realizada no Hospital Odilon Behrens em Belo Horizonte/MG. Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado ao meu esposo Cástor Cartelle e ao meu filho Cástor Henrique. Para meus pais, Ceci e Juarez, e ao irmão, Antônio.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPq, Instituições que me propiciaram os meios para poder dedicar-me, com exclusividade, ao estudo.

À Fundação Ezequiel Dias, especialmente aos Doutores Eládio Flores Sánchez e Mariem Rodrigues Ribeiro da Cunha pela oportunidade que me concederam na aprendizagem de técnicas e na aquisição de hábitos de trabalho. Técnicos e colegas que encontrei nessa magnífica Instituição muito estimularam meu crescimento intelectual.

À Doutora Cláudia Maria de Castro Mendes e à enfermeira Vilma A. Rodrigues, do serviço de endoscopia do Hospital Odilon Behrens, pela contínua ajuda prestada na coleta de material usado no nosso estudo.

Agradecimento especial à Universidade Federal de Minas Gerais à qual fazem parte os que à seguir agradeço:

À Doutora Rosa Maria Esteves Arantes pela inestimável e generosa ajuda prestada como Orientadora em momento para mim muito difícil. Minha gratidão permanente.

À Coordenação e o Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia que personifico nos Professores Geovanni Cassali e Wagner Luiz Tafuri.

Ao Professor Marcelo Vidigal Caliari, pela orientação e acolhida no seu laboratório, assim como os colegas do Laboratório de Protozooses do Departamento Patologia Geral do ICB da UFMG, Luana Prata e Fabrício Marcus Silva.

À Doutora Duciene Queiroz do Laboratório de bacteriologia, pela ajuda prestada.  
Aos meus colegas do Laboratório de patologia gástrica que muito me ajudaram Renato, Letícia Figueiredo, Letícia G. e Túlio Pereira Junior.

A Professora Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira partiu repentinamente, sem tempo para despedidas. Mas ao longo destes anos de ausência sempre estive ao meu lado com a permanência do seu exemplo, generosidade e apoio mais do que amigo: fraterno. Este trabalho é homenagem e memória de alguém que muito deixou plantado no meu dia-a-dia. Obrigada, Ana!



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE APÊNDICES .....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivos específicos.....	21
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
3.1 <i>Helicobacter pylori</i> - Aspectos gerais .....	22
3.2 Doenças Associadas à Infecção por <i>H. pylori</i> .....	25
3.2.1 <i>H. pylori</i> e Úlcera Péptica Duodenal .....	25
3.2.2 <i>H. pylori</i> e Gastrite Crônica.....	27
3.2.2.1 Classificação da Gastrite segundo Sistema de Sydney .....	28
3.2.3 Carcinoma Gástrico .....	30
3.3 Apoptose.....	31
3.3.1 Apoptose como Processo Fisiológico .....	31
3.3.2 <i>H. pylori</i> e Apoptose .....	33
3.4 <i>H. pylori</i> e carcinogênese gástrica .....	36
3.4.1 Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) e carcinogênese gástrica .....	38
3.5 <i>H. pylori</i> e Turnover Celular .....	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Estudos Retrospectivos .....	41
4.1.1 Pacientes Estudados .....	41
4.1.2 Características dos Pacientes .....	41
4.1.3 Biópsias Endoscópicas .....	43
4.1.3.1 Coleta e processamento do material .....	43
4.1.3.2 Análise histológica .....	43
4.1.4 Estudo imonohistoquímica (IHQ) das vias intrínseca e extrínseca da apoptose .....	44
4.1.5 Avaliação da intensidade de expressão das proteínas pró-e anti-apoptóticas .....	45
4.1.6 Análise estatística .....	46
4.2 Estudo Prospectivo .....	46
4.2.1 Pacientes Estudados .....	46
4.2.2 Estudo imunohistoquímico .....	46
4.2.3 Morfometria Digital .....	47
4.2.3.1 Análise quantitativa da expressão imunohistoquímica do anticorpo M30 CytoDEATH. .....	48
4.2.3.2 Análise quantitativa da expressão imunohistoquímica de iNOS .....	48
4.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>

5.1 Estudo retrospectivo em Crianças .....	50
5.1.1 Expressão de Proteínas da via intrínseca da apoptose .....	50
5.1.2 Estudo retrospectivo em Adultos .....	53
5.1.2.1 Expressão de Proteínas da via intrínseca e extrínseca da apoptose .....	53
5.2 Estudo prospectivo em adultos .....	56
5.2.1 Análise histológica. ....	56
5.2.2 Avaliação do índice de expressão de iNOS .....	59
5.2.3 Avaliação do índice apoptótico .....	60
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
6.1 Estudos retrospectivos .....	64
6.1.1 Avaliação da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas da via intrínseca da apoptose em crianças .....	64
6.1.2 Avaliação da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose em adultos .....	66
6.2 Estudos prospectivo .....	68
6.2.1 Índice de iNOS em pacientes infectados e não infectados por <i>H. pilory</i> .....	68
6.2.2 Avaliação do índice apoptótico em pacientes <i>Hp-</i> e <i>Hp+</i> e sua correlação com o índice de expressão de iNOS .....	79
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>95</b>
Anexo 1 - Aprovação do COEP (Estudo Retrospectivo) .....	95
Anexo 2 - Aprovação do COEP (Estudo Prospectivo) .....	96
Anexo 3 - Fixa Clínica Endoscópica .....	97
Anexo 4 - Protocolo de Análise de Biópsia Gástrica .....	98
Anexo 5 - Sistema Sidney Modificado (Houston, 1994) .....	99
Anexo 6 – ATA de Aprovação .....	<b>105</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>106</b>
Apêndice 1 – Termo de consentimento .....	106

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>FIGURA 1:</b>	Fotomicrografias: A) Intensidade de expressão de Bax em pacientes com gastrite crônica; B) Intensidade de expressão de Bax em pacientes UD.	52
<b>FIGURA 2:</b>	Fotomicrografias: A) Intensidade de expressão de Bcl2 em pacientes com gastrite crônica; B) Intensidade de expressão de Bcl2 em pacientes com UD.	53
<b>FIGURA 3:</b>	Imunoexpressão citoplasmática de Bax na mucosa gástrica superficial e foveolar de pacientes infectados e não infectados por <i>H. pylori</i> .	54
<b>FIGURA 4:</b>	Imunoexpressão citoplasmática de Bak na mucosa gástrica superficial e foveolar de pacientes infectados e não infectados por <i>H. pylori</i> .	54
<b>FIGURA 5:</b>	Fotomicrografia evidenciando maior expressão de Fas-L na mucosa gástrica em pacientes não infectados em comparação com paciente com gastrite.	55
<b>FIGURA 6:</b>	Fotomicrografias: A) Mucosa gástrica do antro normal ( <i>H.p</i> <sup>-</sup> ) (HE, objetiva 10x); B) Gastrite crônica por <i>H. pylori</i> no antro gástrico com grau de inflamação moderado (HE, objetiva 10x); C) Gastrite crônica por <i>H. pylori</i> no antro gástrico com grau de inflamação acentuado (HE, objetiva 10x); D) Gastrite crônica por <i>H. pylori</i> com atrofia na mucosa antral (HE, objetiva 10x); Gastrite crônica por <i>H. pylori</i> com atrofia e metaplasia na mucosa antral (HE, objetiva 10x).	58
<b>FIGURA 7:</b>	Mucosa gástrica do antro gástrico imunoexpressão de iNOS e M30: A) e B) Imunoexpressão dos anticorpos iNOS e M30, respectivamente, na mucosa gástrica do antro normal ( <i>H.p</i> <sup>-</sup> ) (objetiva 10x); C) e D) Imunoexpressão dos anticorpos iNOS e M30, respectivamente, na mucosa gástrica de paciente apresentando Gastrite crônica por <i>H. pylori</i> (objetiva 20x); D) e E) Imunoexpressão dos anticorpos iNOS e M30, respectivamente, na mucosa gástrica de paciente com Gastrite crônica atrófica por <i>H. pylori</i> (objetiva 20x).	63

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1:</b> Grupos de diagnóstico e <i>status H. pylori</i> em 54 crianças examinadas.	42
<b>Tabela 2:</b> Grupos de diagnóstico e <i>status H. pylori</i> em 70 pacientes examinados.	43
<b>Tabela 3:</b> Características dos anticorpos primários utilizados para a determinação da expressão das proteínas anti- e pro-apoptóticas da via intrínseca e extrínseca em adultos.	44
<b>Tabela 4:</b> Características dos anticorpos primários utilizados para a determinação da expressão de iNOS e M30 em adultos.	47
<b>Tabela 5:</b> Características da gastrite crônica em relação com <i>status H. pylori</i> .	56
<b>Tabela 6:</b> Características da gastrite crônica em relação com <i>status H. pylori</i> .	57

**LISTA DE GRÁFICOS**

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfico 1 :</b> Comparação da intensidade expressão de Bcl2 e Bax entre o grupo de paciente infectado e não infectado por <i>H. pylori</i> (A) e entre os diferentes grupos diagnósticos (B).	50
<b>Gráfico 2 :</b> Comparação da intensidade de expressão de Bax entre os grupos diagnósticos.	51
<b>Gráfico 3:</b> Comparação da intensidade de expressão de Bcl2 entre os grupos diagnósticos	52
<b>Gráfico 4 :</b> Índice de expressão de iNOS na mucosa gástrica dos pacientes pertencentes aos diferentes grupos diagnósticos.	59
<b>Gráfico 5 :</b> Índice apoptótico na mucosa antral dos pacientes pertencentes aos diferentes grupos diagnósticos.	60
<b>Gráfico 6 :</b> Comparação entre o índice apoptótico e os graus de intensidade (A) e atividade (B) da inflamação nos diferentes grupos diagnósticos.	61
<b>Gráfico 7:</b> Correlação entre o índice apoptótico e o índice de expressão de iNOS usando análise de regressão linear.	62

## LISTA DE APÊNDICES

	<b>Pág.</b>
<b>APÊNDICE 1:</b> Termo de consentimento	106

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CaCD</b>	Carcinoma Gástrico do Tipo Difuso de Láuren
<b>CaG</b>	Câncer gástrico
<b>cagA</b>	Citotoxina associada ao gene A
<b>CagA PAI</b>	<i>CagA pathogenecity island</i>
<b>CaGI</b>	Carcinoma Gástrico do Tipo Intestinalde Láuren
<b>Caspases</b>	Cytosolic-aspartate-specific proteases
<b>CGAM</b>	Gastrite Crônica Atrófica Multifocal
<b>EDA</b>	Endoscopia Digestiva Alta
<b>GC</b>	Gastrite Crônica
<b>HE</b>	Hematoxilina & Eosina
<b>Hp</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>IARQ</b>	<i>International Academy of Research on Cancer</i>
<b>Ihq</b>	Imunoistoquímica
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INCA</b>	Instituto nacional do Câncer
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MALT</b>	<i>mucosa- associated lymphoid tissue</i>
<b>MI</b>	Metaplasia Intestinal
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>sABP</b>	streptavidina biotina peroxidase
<b>TUNEL</b>	<i>terminal deoxyuridine nucleotide nick end-labeling</i>
<b>UD</b>	Úlcera Duodenal
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UPD</b>	Úlcera Péptica Duodenal
<b>UPG a</b>	Úlcera Péptica Gástrica

## RESUMO

A infecção crônica da mucosa gástrica por *H. pylori* é a principal causa da gastrite crônica (GC) implicado na patogênese da atrofia e da metaplasia intestinal (MI), condições de risco para o desenvolvimento do carcinoma gástrico (CaG). A infecção na infância determina risco de desenvolvimento do câncer gástrico justificando estudos comparados entre crianças e adultos. O microrganismo modifica o *turnover* da mucosa gástrica induzindo hiperproliferação e apoptose. No entanto, os mecanismos e vias operantes nos processos proliferativos e apoptóticos não são bem entendidos. Apesar de estudos mostrarem relação entre carcinogênese gástrica e expressão da sintase de óxido nítrico induzida (iNOS), ainda não se sabe qual a correlação entre inflamação, apoptose e ativação desta enzima nas condições de risco para transformação maligna associadas à infecção pelo *H. pylori*. Neste trabalho investigamos as vias apoptóticas nas gastrites, na mucosa gástrica de crianças e adultos e correlacionamos a intensidade e atividade da inflamação com expressão de iNOS e o índice apoptótico na mucosa gástrica em pacientes adultos com GC e GCA. Utilizamos material retrospectivo e prospectivo de crianças e adultos biopsiados para o esclarecimento de sintomas dispépticos. Amostras negativas e positivas para *H. pylori* foram classificadas de acordo com as patologias de interesse (UD, GC e GCA). Estudamos por imunohistoquímica a expressão de proteínas pró-e anti-apoptóticas das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose, bem como a proteína iNOS e o marcador M30 CytoDeath, e quantificamos esta expressão por morfometria digital. Em crianças e adultos a via preferencial é intrínseca e há expressão aumentada de proteínas pró-apoptóticas da via intrínseca (Bax e Bak) nos pacientes infectados, além de expressão compensatória de proteínas anti-apoptóticas (Bcl2 e Bclx). Além disso, Bak e Bax tiveram maior expressão nas GCA em relação aos demais diagnósticos levando a hipótese de que a apoptose nos casos de atrofia pode estar relacionada com a susceptibilidade ao câncer. O índice de expressão de iNOS foi maior nos pacientes *H. pylori* positivos que naqueles negativos. Não houve diferença nos índices apoptóticos entre pacientes *H. pylori* positivo ou negativo, ou na correlação estatística entre o índice apoptótico e o índice de expressão de iNOS nos pacientes infectados. Houve correlação entre o índice apoptótico e a intensidade da inflamação nos pacientes infectados.

**Palavras-chaves:** *Helicobacter pylori*, apoptose, câncer, gastrite, úlcera.



## ABSTRACT

Chronic infection of the gastric mucosa by *H. pylori* is the main cause of chronic gastritis (CG) also implicated in the pathogenesis of atrophy and intestinal metaplasia (IM). These conditions are considered risk for developing gastric cancer (AGC) and it is assumed that infection in childhood increases risk to gastric cancer, so comparative studies between children and adults are justified. The organism modify the turnover of gastric mucosal proliferation and inducing apoptosis. However, the mechanisms and pathways in proliferative and apoptotic processes is not well understood. Although studies showed relationship between gastric carcinogenesis and expression of nitric oxide synthase induced (iNOS) it is still unknown if there is a correlation between inflammation, apoptosis and activation of this enzyme in terms of risk for the malignant transformation associated with infection by *H. Pylori*. In this study we investigated the apoptotic pathways in gastritis, gastric mucosa of children and adults and correlated the intensity of inflammation, iNOS expression and apoptotic index in gastric mucosa in adult patients with GC and GCA. We used retrospective and prospective material of children and adults biopsied for clarification of dyspeptic symptoms. Negative and positive samples for *H. pylori* were classified according to the pathologies of interest (UD, GC, and GCA). We studied by immunohistochemistry and quantified by digital morphometry the pro and anti-apoptotic protein expression of intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis, as well as iNOS protein and the apoptosis marker M30 CytoDeath expression. In children and adults the preferred route is intrinsic and an increased expression of pro-apoptotic proteins of the intrinsic pathway (Bax and Bak), in addition to compensatory expression of anti-apoptotic proteins (Bcl2 and Bclx). Furthermore, Bax and Bak expression was higher in GCA compared to other diagnoses confirming the hypothesis that apoptosis can be related to susceptibility to cancer in long-term presence of mucosal atrophy. The iNOS expression was higher in H.pylori-negative patients than in the positive ones. There was no difference in apoptotic indices between patients H. Pylori-positive or negative or statistical correlation between the apoptotic index and the iNOS expression in patients H.Pylori-positive. A correlation between apoptotic index and the intensity of inflammation in infected patients was observed for mild and moderate degrees of gastritis.

## 1- INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico (CaG) de tipo intestinal, mais comum nas populações de alto risco, associa-se a gastrite crônica atrófica multifocal (GCA) em cujo quadro histológico se observa metaplasia intestinal (MI) e displasia, consideradas lesões de risco. Esta cascata de eventos morfológicos ocorre ao longo do tempo, mas as lesões de risco surgem geralmente após os 50 anos, pelo menos na nossa população (CABRAL *et al.*, 2006).

Fatores ambientais estão relacionados com o desenvolvimento do CaG. A infecção por *H. pylori* (FORMAN *et al.*, 1991; PARSONNET *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 1998) e a dieta (CORREA *et al.*, 1990; SOBALA *et al.*, 1991) são fatores de risco, mas os mecanismos não estão bem esclarecidos. O aumento da proliferação celular, induzido direta ou indiretamente na mucosa gástrica, associado ao aumento de radicais livres, altamente mutagênicos, provenientes da atividade da inflamação são fatores geralmente associados ao papel do microrganismo na carcinogênese gástrica (ARROYO *et al.*, 1992; JONES *et al.*, 1997). O aumento luminal (no suco gástrico) das concentrações de nitratos, nitritos e nitrosaminas provenientes da dieta e eventualmente modificados por bactérias na luz gástrica nos estados de atrofia e hipocloridria (CORREA *et al.*, 1990), leva a danos estruturais e bioquímicos do epitélio gástrico e tem sido relacionado ao aumento da apoptose na mucosa gástrica (SOBALA *et al.*, 1991). A persistência da reação inflamatória à infecção por *H. pylori* implica na formação de radicais livres de oxigênio e compostos nitrogenados derivados do óxido nítrico (NO), que podem provocar danos às células, incluindo disfunção mitocondrial, modificação da estrutura protéica e genotoxicidade (ARROYO *et al.*, 1992; LAVAL & WINK, 1994). Além disso, há redução dos níveis de ácido ascórbico, considerado um anti-oxidante endógeno (DRAKE *et al.*, 1996). Admite-se que no processo de carcinogênese gástrica relacionado com a infecção por *H. pylori* ocorra desequilíbrio entre os níveis de anti-oxidantes e a produção de derivados de NO. Estes compostos poderiam favorecer a apoptose e contribuir para a atrofia ou, pelo contrário, inativá-la e assim desempenhar importante papel na carcinogênese. Há evidências que o óxido nítrico leva a inativação do processo de apoptose pela nitrosilação de proteínas pró-apoptóticas, permitindo a sobrevivência de células com danos no DNA (JAISWAL *et al.*, 2000).

Sabemos que a infecção por *H. pylori* altera a homeostase da mucosa gástrica por interferir no balanço entre proliferação celular e apoptose (ANTI *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1997; KONTUREK, PIERZCHALSKI *et al.*, 1999; KRAJEWSKI *et al.*, 1996;

MAEDA *et al.*, 2002; MOSS *et al.*, 1996; MULLIS & FALOONA, 1987; PEEK, 2002; SHIBAYAMA *et al.*, 2001; SZABÓ & TARNAWSKI, 2000; SUZUKI & ISHII, 2000; WAGNER *et al.*, 1997; XIA & TALLEY, 2001; YANG *et al.*, 2003). A apoptose está aumentada na infecção e o aumento da proliferação celular seria causado diretamente pela ação da proteína CagA na célula epitelial, e indiretamente, como resposta ao aumento da apoptose (SZABÓ & TARNAWSKI, 2000; VAN GRIEKEN *et al.*, 2003). A apoptose é modulada por diferentes fatores, extrínsecos e intrínsecos, através de duas vias principais que convergem para a ativação de caspases (ASHKENAZI & DIXIT, 1998; BOISE *et al.*, 1993; FROHMAN, 1990; KORSMEYER, 1995). A via extrínseca é mediada por fatores que se ligam a receptores de morte na membrana citoplasmática, como membros da família de receptores de TNF e FAS (ASHKENAZI & DIXIT, 1998; KORSMEYER, 1995). A via intrínseca envolve a liberação de citocromo c da membrana mitocondrial e tem, como principais agentes, proteínas da família Bcl2, como Bcl2 e Bclx (anti-apoptóticos), Bax e Bak (pró-apoptóticos) (ADAM & CORY, 1998; BOISE *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 1996.). Ao final de décadas de infecção, a mucosa tenderia para a atrofia, que se associaria com MI (JONES *et al.*, 1997; KUIPERS, UYTERLINDE *et al.*, 1995; XIA & TALLEY, 2001). Os estudos a respeito da apoptose na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* relatam seu aumento (ADAMS & CORY, 1998; KONTUREK, BILANSKI *et al.*, 1999; KRAJEWSKI *et al.*, 1996; MOSS *et al.*, 1996; MULLIS & FALOONA, 1987; SHIBAYAMA *et al.*, 2001; SUZUKI & ISHII, 2000; WAGNER *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2003), mas são fragmentados e não esclarecem aspectos relativos às vias envolvidas. Poucos estudos *in vivo* e *in vitro* têm estudado a expressão de proteínas e enzimas envolvidas nas vias extrínseca e intrínseca da apoptose (MAEDA *et al.*, 2002) e, quando o fazem, não analisam totalmente os fatores envolvidos em cada uma das vias (ADAMS & CORY, 1998; ASHKENAZI & DIXIT, 1998). Segundo alguns, a infecção por *H. pylori* desencadeia a apoptose através da via intrínseca, relacionada com a ação de radicais livres. Estes estudos demonstram subexpressão de Bcl2 e/ou Bclx, proteínas anti-apoptóticas e superexpressão de Bax e Bak, proteínas pró-apoptóticas (CHEN *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1996). Entretanto, outros pesquisadores relatam aumento de FAS e FAS-ligante, relacionados com a via extrínseca da apoptose, que pode ser estimulada por diversos compostos lesivos ao epitélio, além de radicais livres (BAIK *et al.*, 1996; LIN, *et al.*, 2001, MANNICK *et al.*, 1996; SOBALA *et al.*, 1991).

Estudos topográficos e de imunohistoquímica, desenvolvidos pelo nosso grupo em pacientes com gastrite associada a *H. pylori*, demonstraram que a gastrite por amostras *cagA*-positivas

acomete o antro e corpo distal, com atrofia e MI predominantemente na pequena curvatura antral (CABRAL *et al.*, 2006), onde se observaram, também, maiores índices de proliferação celular. Nestes pacientes demonstramos super-expressão de Bax e Bak, relação significativa da expressão de Bak com atrofia e MI e nenhuma relação com atrofia sem MI. A expressão de proteínas pró-apoptóticas foi significativamente mais intensa na pequena curvatura antral dos pacientes infectados que no resto da mucosa, mas nesta região observamos também aumento da expressão de Bcl2 e Bclx, quando comparado ao resto da mucosa. O aumento de expressão de proteínas anti-apoptóticas foi interpretado como resposta à apoptose, porém mais estudos são necessários, entre eles a determinação dos índices de apoptose e a determinação da expressão proteica por outros métodos que não apenas o imuno-histoquímico.

Considerando os dados da literatura, das nossas observações e resultados obtidos, diversas questões são levantadas:

- a) A infecção por *H. pylori* desencadeia ambas as vias da apoptose?
- b) O risco para o desenvolvimento do CaG relaciona-se com diferenças na apoptose e suas vias de ativação (intrínseca e extrínseca)?
- c) Há diferenças na apoptose e em suas vias de ativação quando se consideram pacientes, aparentemente sem risco para desenvolver CaG, como os portadores de úlcera duodenal (UD) e aqueles com risco, como os portadores de GCA?

Nossa hipótese é que as vias de ativação da apoptose poderiam ser diferentes, quer se tratasse de pacientes com infecção por *H. pylori* e UD ou pacientes sem UD com risco potencial de desenvolver GCA e CaG, particularmente do tipo intestinal. Neste caso, tanto a infecção, como outros fatores ambientais, entre eles a dieta, estariam envolvidos na apoptose, com possibilidade de ativação de diversos mecanismos de ambas as vias, que seriam importantes no desenvolvimento de atrofia.

## 2- OBJETIVOS

Estudar as vias apoptóticas na infecção por *H. pylori associadas com UD, GC, e GCA*, na mucosa gástrica de crianças e adultos. Correlacionar a intensidade e atividade da inflamação com expressão de iNOS e o índice apoptótico na mucosa gástrica em pacientes adultos com GC e GCA.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se existe diferença entre crianças e adultos na expressão de proteínas e enzimas envolvidos na apoptose, nos pacientes de gastrite crônica por *H. pylori* e naqueles associados a UD:

a) Avaliar se existe uma via preferencial (extrínseca ou intrínseca) de apoptose em pacientes com GC associada a *H. pylori* em relação àqueles que desenvolvem UD.

b) Avaliar se o desenvolvimento de atrofia se relaciona com a ativação de uma via específica da apoptose.

2. Determinar o índice apoptótico na mucosa gástrica de pacientes adultos com GC e GCA associados ou não à infecção por *H. pylori*.

3. Estudar a expressão de iNOS na mucosa gástrica de pacientes com gastrite crônica associada a *H. pylori* e correlacioná-la com o índice apoptótico.

### 3 - REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Helicobacter pylori* – Aspectos gerais

*Helicobacter pylori* é um dos microrganismos patogênicos mais antigos e próximos da espécie humana. As primeiras pesquisas investigando a presença da bactéria na mucosa gástrica ocorreram na primeira metade do século XX (FREEDBERG & BARRON, 1940). Seu estudo permaneceu negligenciado por muito tempo até que, em 1983, recebeu grande impulso a partir do isolamento de microrganismos espiralados, denominados inicialmente *Campylobacter pylori*, em biópsias gástricas por Marshall e Warren (1983, 1984).

A bactéria apresenta forma espiralada, é gram-negativa e pode distribuir-se de maneira focal, segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica, localizando-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio de superfície do estômago (WARREN & MARSHALL, 1983; SUERBAUM & MICHETTI, 2002). Atualmente, *H. pylori* habita o estômago de, aproximadamente, 50% da população mundial (ALGOOD & COVER, 2006; FOX & WANG, 2007).

Após a identificação de *H. pylori*, iniciou-se uma nova era na compreensão das doenças gastroduodenais e está demonstrada forte associação entre *H. pylori* e gastrite crônica (GC), úlcera péptica duodenal (UD), carcinoma gástrico (CaG) e linfomas gástricos (MARSHALL & WARREN, 1984; DRUMM *et al.*, 1987; MARSHALL *et al.*, 1988; BLASER, 1990; THOMSEN *et al.*, 1990; FORMAN *et al.*, 1991; NOMURA *et al.*, 1991; PARSONNET *et al.*, 1991; PETERSON, 1991; SATOH *et al.*, 1991; BLASER, PEREZ-PEREZ *et al.* 1995, KUIPERS, UYTERLINDE *et al.*, 1995; WALKER & CRABTREE, 1998; DRUMM *et al.*, 2000; GOLD *et al.*, 2001; BLASER & ATHERTON, 2004; KATO & SHERMAN, 2005).

Após constatar-se a relação entre a presença de *H. pylori* na mucosa gástrica e a ocorrência de GC em adultos, essa relação foi notada também em crianças (MARSHALL & WARREN, 1984; DRUMM *et al.*, 1987). Entretanto, críticos da idéia de que *H. pylori* teria um papel no surgimento da gastrite, argumentaram que a bactéria, em vez de causar inflamação, colonizava uma mucosa previamente inflamada, já que, gastrite e úlcera péptica duodenal são menos freqüentes em crianças que em adultos (MACARTHUR *et al.*, 1995). Isto levou à investigação do papel da infecção por *H. pylori* na população pediátrica. Diversos estudos demonstraram que *H. pylori* está presente na maioria das crianças e adultos com GC e UD assim como a observação de que, após a erradicação do microrganismo, ocorria a resolução

da inflamação o que demonstrou a principal evidência do papel do microrganismo na etiologia da gastrite e, posteriormente, na UD (MARSHALL & WARREN,1984; DRUMM *et al.*,1987; LEE & HAZELL,1988; MARSHALL *et al.*, 1988; THOMSEN *et al.*,1990; CARVALHO *et al.*,1991; MACARTHUR *et al.*,1995; WALKER & CRABTREE, 1998; YEUNG *et al.*, 1990).

Existe variação na prevalência de infecção por *H. pylori* entre diferentes países, faixas etárias e níveis sócio-econômicos (MALATY *et al.* 1992, MALATY & GRAHAM 1994). Estudos sorológicos demonstraram que, nos países em desenvolvimento com baixo nível sócio-econômico e más condições de habitação e de higiene, crianças que vivem em residências super-povoadas tornam-se mais susceptíveis à infecção (DRUMM *et al.*,1990; MALATY *et al.*, 1992; MALATY & GRAHAM, 1994).

A compreensão da epidemiologia de transmissão da bactéria *H. pylori* para/entre crianças ainda é limitada. Acredita-se que tanto a via oral-oral quanto a fecal-oral possam ser responsáveis pela transmissão da doença. A primeira hipótese é sustentada por estudos que identificaram DNA bacteriano na saliva e placa dental de adultos e crianças através de PCR (LUZZA *et al.*, 1995; LUZZA *et al.*,1997). Outros estudos têm se debruçado sobre a pesquisa de DNA do microrganismo nas fezes (THOMAS *et al.*, 1992; KELLY *et al.*, 1994; VAN DOORN *et al.*, 2001). Mas o mecanismo exato de transmissão da bactéria continua desconhecido, embora se sabe que a bactéria só consegue alcançar a mucosa gástrica pela boca por se tratar de um microrganismo não invasivo (KODAIRA *et al.*, 2002) e que a transmissão acontece, principalmente, intra familiarmente (MALATY, 2007).

Atualmente, admite-se que a infecção por *H. pylori* é adquirida predominantemente na infância e que, uma vez adquirida, persiste por décadas, seguida por um longo período de fase de quiescência onde há uma gastrite crônica de intensidade variável mas com sintomas mínimos, ou seja, a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomático, mas a infecção é raramente eliminada espontaneamente (BANATVALA *et al.*,1993; BLASER, CHYOU *et al.*, 1995; KUIPERS, THIJS *et al.*,1995; DRUMM *et al.*, 2000; GOLD *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2004; KATO & SHERMAN, 2005; FOX & WANG, 2007). Para tal têm contribuído os fatores de patogenicidade da bactéria responsáveis pela colonização, a cronicidade da infecção e a lesão da mucosa gástrica (MORAN, 1996; ATHERTON 1998). Destacam-se, entre esses fatores, a ampla motilidade conferida pela morfologia espiralada e flagelada (EATON *et al.*,1992), a intensa produção da enzima uréase, que contribui para a

neutralização da acidez do meio gástrico (EATON *et al.*, 1991), e a capacidade de adesão da bactéria por meio de adesinas a receptores das células do epitélio gástrico (HESSEY *et al.*, 1990; ILVER *et al.*, 1998).

*H. pylori* pode causar lesão nas células epiteliais por meio da ação direta de fatores tóxicos tais como a citotoxina vacuolizante (*Vac A*) (ATHERTON *et al.*, 1997) e a proteína *CagA*, produzida pelas amostras virulentas que expressam o gene *CagA* (cytotoxin-associated gene A) (CENSINI *et al.*, 1996; ATHERTON 1998) e de outros produtos citotóxicos nocivos às células epiteliais como a amônia (SMOOT 1997).

Em contrapartida, desenvolvem-se as respostas inflamatória e imunitária do hospedeiro de acordo com as diferentes susceptibilidades individuais moduladas por fatores ambientais (FIOCCA *et al.*, 1994; ERNEST *et al.*, 1999; DORRELL *et al.*, 1998). Portanto, é de grande importância elucidar, na relação bactéria-hospedeiro, os fatores marcadores desta evolução para traçar possíveis estratégias de prevenção destas doenças.

*H. pylori* apresenta, entre suas amostras, grande diversidade genética que amplia suas possibilidades de adaptação ao hospedeiro (JIANG *et al.*, 1996; ATHERTON & BLASER, 2009). Há enormes variações na distribuição geográfica destas amostras entre diversos países e regiões (CAMPBELL *et al.*, 1997; COVACCI *et al.*, 1999; LINZ *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, na prevalência das doenças do trato gastrointestinal superior na população mundial (GENTA *et al.*, 1995, ATHERTON & BLASER, 2009).

As amostras de *H. pylori* que expressam o gene *cag A* (cytotoxin-associated gene A) apresentam uma região multigênica em seu DNA que foi denominada “ilha de patogenicidade” *cag* ou *cag*-PAI (“pathogenicity island”) (CENSINI *et al.*, 1996). As amostras *cagA*-positivas produzem a proteína *cagA*, um antígeno altamente imunogênico, dirigido para o interior das células do epitélio gástrico onde provoca alteração nas vias de transdução de sinal (STEIN *et al.*, 2000). Estas amostras estão relacionadas a respostas inflamatórias acentuadas da mucosa gástrica (CRABTREE & WYATT *et al.*, 1994; ANDO *et al.*, 1996) uma vez que induzem maior produção e liberação de radicais livres de oxigênio, de enzimas pró-inflamatórias como ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido-nitrico sintetase (iNOS), do fator de necrose tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ), de interleucinas (IL) 1- $\beta$ , 2, 6 e 8, notadamente a IL-8 que atua como potente fator quimiotático e ativador de macrófagos e neutrófilos (CRABTREE & FARMERY *et al.*, 1994; ANDO *et al.*, 1996; MANNICK *et al.*, 1996;



NAKAJIMA *et al.*, 1997, FARINATI *et al.*, 2003; KIM 2005). Além do mais, amostras *cagA*-positivas são as mais comumente observadas no carcinoma gástrico (BLASER, CHYOU *et al.*, 1995 b; PARSONNET *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 1998).

Portanto, há evidências de que fatores de virulência do *H. pylori* influenciam o tipo de resposta inflamatória e imunitária do hospedeiro (CRABTREE & FARMERY *et al.*, 1994; CRABTREE & WYATT *et al.*, 1994), o tipo de lesão da mucosa (KUIPERS, THIJSS *et al.*, 1995; KUIPERS, UYTERLINDE *et al.*, 1995; SOZZI *et al.*, 1998) e, conseqüentemente, o tipo de doença que venha se estabelecer (BLASER, PEREZ-PEREZ *et al.*, 1995; CORREA 1995; PARSONNET *et al.*, 1997; SOZZI *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 1998; FARINATI *et al.*, 2003).

### **3.2 Doenças Associadas à Infecção por *H. pylori***

Atualmente encontra-se bem estabelecido que a infecção crônica da mucosa gástrica por *H. pylori* é o principal fator causal da GC, UPD e UPG (WARREN & MARSHALL, 1983; MARSHALL & WARREN, 1984; MARSHALL *et al.*, 1988; PETERSON, 1991; DIXON, 1994) está implicada na patogênese da atrofia e da metaplasia intestinal (MI), lesões ou condições consideradas de risco para o desenvolvimento do carcinoma gástrico (CaG) (CORREA 1992; CORREA 1995) e representa importante fator de risco para CaG (FORMAN *et al.*, 1991; NOMURA *et al.*, 1991; PARSONNET *et al.*, 1991).

A infecção por *H. pylori* também está associada ao linfoma gástrico de células B do tipo MALT (“mucosa-associated lymphoid tissue”) segundo ISAACSON (1990). Porém, a história natural da infecção e os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento e evolução destas doenças, de perfis aparentemente tão diversos, não estão completamente elucidados.

#### **3.2.1 *H. pylori* e Úlcera Péptica Duodenal**

A úlcera péptica é uma condição crônica caracterizada por digestão de tecido da parede de órgãos (particularmente estômago e duodeno) que entram em contato com a secreção ácido-péptica do estômago. A etiopatogenia da úlcera péptica está associada a fatores de risco já confirmados e aceitos e a outros que são especulativos. O estresse emocional, o consumo de álcool, o uso de drogas antiinflamatórias não esteróides (DAINEs), medicamentos imunossupressores, outras drogas, a queda dos níveis de prostaglandina e infecção por

amostras toxigênicas de *H. pylori* têm sido considerados fatores contribuintes no aparecimento da úlcera (CARRICK *et al.*, 1989; MERTZ & WALSH, 1991; ATHERTON *et al.*, 1995; KUIPERS, THIJS *et al.*, 1995; KHULUSI *et al.*, 1996; GILLEN *et al.*, 1998; YUANG *et al.*, 2006).

Existem evidências que conferem à infecção por *H. pylori* um papel importante na etiopatogenia da UD (MARSHALL *et al.*, 1988; PETERSON *et al.*, 1991; QUEIROZ *et al.*, 1991; ATHERTON *et al.*, 1995; KUIPERS, THIJS *et al.*, 1995; HAMLET & OLBE, 1996; WALKER & CRABTREE, 1998, DE GUSMÃO *et al.*, 2000; ASHOUR *et al.*, 2002). O microrganismo está presente em, aproximadamente, 95% dos casos de UD e em 80% dos pacientes portadores de úlcera gástrica. A erradicação da bactéria reduz marcadamente a taxa de recorrência, assim como aumenta a taxa de cura da doença, uma vez que a população não infectada não desenvolve UD. Estima-se que uma pessoa infectada por *H. pylori* tenha em torno de 15% de chance para desenvolver a doença durante toda a sua vida (KUIPERS, THIJS *et al.* 1995). Nas duas últimas décadas, importantes mudanças têm ocorrido na epidemiologia da úlcera duodenal no Brasil (POST, 2006).

Observou-se um decréscimo gradativo dos percentuais de prevalência da UD, ano após ano. Em 1996 ocorreram com 8,6% de prevalência e em 2005 reduziu para 3,3%. O risco de um indivíduo infectado por *H. pylori* desenvolver UD depende, de modo geral, da intensidade do processo inflamatório causado pela colonização por determinadas amostras de *H. pylori*, mas mediado por fatores do hospedeiro e da densidade bacteriana no bulbo duodenal. Indivíduos infectados por amostras *cagA* positivas produzem aumento na quantidade de citocinas e terão maior chance de desenvolver UD. Estudos de Carrick *et al* (1989) demonstraram que a metaplasia gástrica está presente em 98% dos casos de pacientes portadores de UD ativa ou cicatrizada infectados por *H. pylori* e que essa associação desencadeia resposta inflamatória que interfere nos mecanismos de defesa do duodeno, provocando duodenite que, na presença de outros fatores, resulta no aparecimento da úlcera duodenal.

Hamlet *et al.* (1996) demonstraram que a densidade de amostras bacterianas *cagA* positivas, presentes no bulbo duodenal de pacientes portadores de UD, era vinte vezes maior que a observada em pacientes não ulcerosos. A maior densidade de *H. pylori* induziria resposta inflamatória mais intensa, infiltração neutrofílica mais densa e área de metaplasia gástrica no duodeno. Os autores sugeriram, ainda, que a presença de amostras *cagA* positivas poderia

comprometer a secreção de bicarbonato em resposta à acidificação do duodeno. Finalmente, devem-se considerar fatores individuais, que são bem menos estudados.

### 3.2.2 *H. pylori* e Gastrite Crônica

A gastrite por *H. pylori* pode ser assintomática, apresentando reação inflamatória clinicamente irrelevante ou ser causa de doenças gastroduodenais graves. Essas diferenças são determinadas por interações complexas entre a bactéria e o hospedeiro. Estudos sobre a patologia de infecção por *H. pylori* têm levado à identificação de vários tipos de amostras, que permitem supor a evolução da gastrite. A localização e o padrão topográfico inflamatório, o grau de atrofia e metaplasia intestinal parecem ser alterações chaves para tais previsões (CRAANEN *et al.*, 1992; CRAANEN *et al.*, 1994; GENTA *et al.*, 1995; KUIPERS *et al.*, 1995; EL-OMAR *et al.*, 1997; EL-OMAR *et al.*, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2001).

A mucosa gástrica normal contém, apenas, poucas células mononucleares. Este quadro altera-se imediatamente após a infecção por *H. pylori*. A fase aguda, raramente observada, identifica-se por reação inflamatória aguda, caracterizada por intensa infiltração de neutrófilos e hiperemia na mucosa do antro e do corpo gástrico, além de baixa produção ácida (ROCHA *et al.*, 1991).

Na fase crônica da infecção, a gastrite pode ser predominantemente antral, de antro e corpo ou predominantemente do corpo (THOMSEN *et al.*, 1990; BAYERDORFFER *et al.*, 1992; DIXON *et al.*, 1996). Os elementos histológicos consistem de um predomínio de linfócitos, além de plasmócitos e macrófagos, exsudação de neutrófilos, eventualmente eosinófilos e formação de folículos linfóides (THOMSEN *et al.*, 1990). A intensidade do processo inflamatório tem um padrão individual de resposta e, também, do tipo de amostra do microrganismo. O microrganismo, particularmente as amostras cagA positivas, se liga à membrana celular através de moléculas de adesão, provocando redução e perda das microvilosidades, edema intracelular, diminuição das reservas de muco com adelgaçamento da camada mucosa e modificação da superfície luminal das células, que se tornam deprimidas e rugosas, podendo surgir erosões na superfície epitelial (THOMSEN *et al.*, 1990). Assim, há lesão epitelial por ação direta da bactéria e pelo alto grau de atividade inflamatória, o que poderia levar à destruição deste nicho (BLASER, 1990; BLASER & KIRSCHNER, 1999; BLASER & ATHERTON, 2004), o que, entretanto, ocorre apenas em casos de atrofia e extensa metaplasia intestinal (MI).

Após décadas de infecção é freqüente a evolução para atrofia com o surgimento de MI (SIPPONEN & KIMURA, 1994; BLASER, PEREZ-PEREZ *et al.*, 1995; CORREA & MILLER, 1998, SOZZI *et al.*, 1998; MOSS *et al.*, 1996; SCOTINIOTIS *et al.*, 2000). Entretanto, em boa parte dos indivíduos, a atrofia é discreta. O desenvolvimento de atrofia com MI na mucosa gástrica está fortemente associado à infecção por amostras *cagA* positivas (BLASER, PEREZ-PEREZ *et al.*, 1995; SOZZI *et al.*, 1998; HATAKEYAMA, 2004). Acredita-se que a atrofia se relacione com a indução de apoptose que é mais intensa na infecção por amostras *cagA* positivas (MOSS *et al.*, 1996; MAEDA *et al.*, 2002). Num grupo de indivíduos, no qual é grande o risco para CaG, desenvolve-se gastrite crônica atrófica multifocal que progride da pequena curvatura, no antro e em torno da incisura, em direção ao corpo gástrico (CORREA *et al.*, 1990; CORREA, 1995). Há evidências de que a atrofia da mucosa oxíntica, associada à diminuição da secreção ácida gástrica e ao desenvolvimento de MI, pode aumentar o risco de CaG (EL-OMAR *et al.*, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2003). Entretanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos na gastrite induzida por *H. pylori* e desenvolvimento de CaG.

### **3.2.2.1 Classificação da Gastrite segundo Sistema de Sydney**

A necessidade crescente de melhores critérios diagnósticos e classificatórios para a gastrite crônica levou à elaboração do Sistema de Sydney para o diagnóstico histológico, adotado no Congresso Mundial de Gastroenterologia realizado em Sydney, Austrália, em 1990 (PRICE, 1991; MISIEWICZ, 1991). Nesse sistema foram introduzidos vários critérios morfológicos, topográficos e etiológicos, visando a uma classificação que originasse reprodutividade diagnóstica e utilidade clínica. A classificação determinada juntamente com um protocolo para o diagnóstico endoscópico (TYTGAT, 1991) e com definição de locais de biópsia, ganhou aceitação universal.

O Sistema de Sydney introduziu um conjunto flexível de regras, buscando uniformidade de diagnóstico e graduação de cinco variáveis histológicas: densidade de *H. pylori* (Hp), inflamação crônica (IN), atividade inflamatória (AI), metaplasia intestinal (MI) e atrofia glandular (AT), diagnosticadas independentemente e identificadas dicotomicamente como ausentes ou presentes. Neste último item graduadas em discretas, moderadas e acentuadas.

A fim de estabelecer terminologia diagnóstica para as gastrites e identificar, definir e resolver alguns problemas relacionados ao uso da classificação de Sydney, um grupo de patologistas

gastrointestinais de várias partes de mundo reunidos em 1994 em Houston, Texas, Estados Unidos da América (EUA), no Houston Gastritis Workshop (DIXON, 1996), estabeleceu uma revisão consensual do protocolo original de Sydney modificado ou atualizado. Ocorre uma pequena modificação nos princípios e nos sistemas de graduação originais, estimulando-se a graduação das variáveis histológicas com o uso de uma escala visual, criada com esse objetivo. A terminologia da classificação final foi muito melhorada. Assim, a classificação da gastrite pelo Sistema de Sydney atualizado engloba aspectos etiológicos, morfológicos e topográficos, definidos, basicamente, em três tipos de gastrite: aguda, crônica e formas especiais.

Para a classificação da GC são consideradas as seguintes variáveis: inflamação crônica, caracterizada pelo infiltrado inflamatório mononuclear; atividade, representada pelo infiltrado inflamatório neutrofílico; atrofia, definida como a rarefação do componente glandular da mucosa gástrica; metaplasia intestinal que consiste na substituição do epitélio gástrico de revestimento e glandular por epitélio do tipo intestinal especializado. Estas variáveis, consideradas semi quantitativas e os score, são graduados como ausentes, discretas, moderadas e acentuadas e registradas em cada caso em protocolo individual (ANEXOS).

O Sistema de Sydney atualizado enfatiza a distinção entre gastrite crônica atrófica (GCA) e GC-não atrófica e permite, ainda, a definição do padrão topográfico predominante de gastrite: a) predominantemente antral, b) predominantemente do corpo e c) do antro e corpo. Assim, definiram-se o perfil evolutivo de três tipos de GC:

- 1) GC-não atrófica, predominantemente antral e geralmente associada a úlcera péptica duodenal (UPD);
- 2) GCA multifocal (GCAM), provavelmente evoluindo para a gastrite do antro e corpo e frequentemente observada na úlcera péptica gástrica (UPG) e CaG;
- 3) GCA do corpo de natureza auto-imune.

A atualização do Sistema de Sydney recomenda que para a avaliação adequada da mucosa gástrica e diagnóstico correto da gastrite sejam colhidas 5 biópsias: duas no antro e duas no corpo na pequena e grande curvatura e uma na incisura angular, consideradas as áreas onde se iniciam e, portanto, são mais frequentes e intensas a atrofia e a MI. Considera-se que estes

locais sejam representativos de toda a mucosa gástrica e, portanto, com a colheita destas amostras, todos os diagnósticos possíveis possam ser feitos.

### 3.2.3 Carcinoma Gástrico

O câncer tem sido uma das principais causas de morte em todo o mundo. O câncer gástrico representa, atualmente, o quarto tumor maligno mais freqüente no mundo sendo a segunda causa de óbitos por câncer, no geral, na acepção mais ampla: aproximadamente um milhão de óbitos por ano. O CaG é cerca de três a duas vezes mais freqüente nos países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos e atinge mais homens do que mulheres. No Brasil, ainda é uma importante causa de morbi-mortalidade, sendo um problema de saúde pública (INCA, 2009).

Em nosso país, estão previstos 21.500 mil novos casos de câncer de estômago para o ano de 2010 (13.820 entre os homens e 7.680 entre as mulheres). O risco estimado é de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 8 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2009)

A classificação para o CaG mais utilizada é a de Laurén (LAURÉN, 1965; LAURÉN, 1991) que se baseia em características morfológicas, epidemiológicas e etiopatogênicas, subdividindo o CaG em dois tipos: a) intestinal (CaGI), mais freqüente nas populações de alto risco para CaG, em homens em torno dos 60 anos, geralmente associado a GCAM e MI, constituindo-se pela proliferação de glândulas atípicas; b) difuso (CaGD), mais comum em populações de menor risco para CaG. Ocorre com igual prevalência em homens e mulheres em faixas etárias mais baixas, caracterizando-se pela proliferação de células isoladas que infiltram difusamente a parede gástrica. Os tumores cujas características não se enquadram naquelas descritas para os dois tipos de CaG representam, aproximadamente, 15% dos casos e são considerados “não classificáveis”, enquanto que os tumores que apresentam características de um e outro tipo são considerados mistos.

Em relação ao CaGI identificam-se fatores etiopatogênicos que podem atuar no processo de carcinogênese, isolada ou conjuntamente, relacionados ao desenvolvimento de lesões consideradas de risco para CaG (GCAM e MI) e displasia (CORREA, 1988; CORREA *et al.*, 1990; CORREA, 1992; CORREA, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2001), ao tipo de dieta e à infecção por *H.pylori* (FORMAN *et al.*, 1991; NOMURA *et al.*, 1991; PARSONNET *et al.*, 1991; IARC-WHO 1994). Em contrapartida, com relação ao CaGD não se reconhecem fatores etiopatogênicos ou lesões precursoras (LÁUREN, 1991; SOLCIA *et al.*, 1996;

RODRIGUES *et al.*, 2001), havendo consenso de que se origine de epitélio gástrico, aparentemente normal, ou “de novo” (CORREA, 1992; CORREA, 1995), embora também esteja associado à infecção por *H. pylori* e com frequência se observa CGA e MI especialmente em pacientes acima de 55 anos (OSÓRIO & NOGUEIRA, 2001).

Há, também, evidências de que a infecção por *H. pylori* associada ao CaGD esteja relacionada à redução da expressão no epitélio gástrico da caderina-E, molécula responsável pela adesão celular e controle da proliferação epitelial (TERRES *et al.*, 1998), ou à promoção de alterações proliferativas, como a hiperplasia foveolar (CARNEIRO *et al.*, 1993). O desenvolvimento do CaGD parece, portanto, estar mais ligado ao forte estímulo proliferativo associado à presença de radicais livres decorrentes da infecção e a fatores genéticos.

Considerando estes aspectos, levantou-se a hipótese de que o padrão de gastrite desenvolvido pelos pacientes infectados por *H. pylori* e sua evolução, associados a outros fatores como gênero dos pacientes, fatores genéticos, perfil de secreção ácida, antígenos dos grupos sanguíneos de Lewis, dieta e fumo, poderiam modular a resposta à infecção por *H.pylori* e influir no tipo de CaG (CORREA, 1992; CORREA, 1995; KUIPERS *et al.*, 1995; KOMOTO *et al.*, 1998)

O conhecimento de fatores de risco e dos mecanismos envolvidos na etiopatogênese é fundamental na adoção de medidas de prevenção do CaG.

### **3.3 Apoptose**

#### **3.3.1 Apoptose como Processo Fisiológico**

Apoptose ou morte celular geneticamente programada é o mecanismo responsável pela eliminação de células lesadas, envelhecidas ou redundantes que desempenham papel fundamental nos processos de reparação, renovação e remodelação dos diferentes tecidos do organismo (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE *et al.*, 1980; THOMPSON 1995; RAFF, 1998). Ocorre individualmente nas células como fenômeno de auto-destruição isolado sem comprometer as células vizinhas ou provocar resposta inflamatória, uma vez que não determina a lise de organelas ou sua liberação para o interstício (RAFF, 1998). O equilíbrio dinâmico entre a morte celular por apoptose e a produção de novas células por proliferação celular garante a manutenção da integridade e a homeostase tissular (THOMPSON, 1995;

MOSS, 1996; VAUX & STRASER, 1996; SZABÓ & TARNAWSKI, 2000; VON HERBAY & RUDI, 2000).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela degradação de células esparsas com condensação e fragmentação da cromatina, redução citoplasmática e redução do volume celular, mantendo, porém, a integridade das organelas citoplasmáticas e da membrana celular. Em seqüência, ocorre a formação de corpos apoptóticos e fagocitose pelas células vizinhas normais e pelos macrófagos. É um processo rápido e não sincronizado do órgão, coexistindo diferentes estágios de apoptose em diversas regiões dos tecidos (HALL, 1999). A apoptose pode ser induzida por diferentes agentes etiológicos, como infecção viral, radiação, várias toxinas e drogas, isquemia, perturbação metabólica, fatores hormonais e depleção de fatores de crescimento. Por outro lado, alguns outros fatores previnem a apoptose (anti-apoptóticos), como os fatores de sobrevivência tecido-específicos ou gerais, por exemplo, hormônios, citocinas e fatores de crescimento.

A apoptose ocorre em duas fases distintas: a fase de decisão, na qual os produtos gênicos necessários para desencadear o processo são acumulados, e a fase de execução pela ativação em cascata de enzimas específicas denominadas caspases. A partir dessa etapa o processo é irreversível (VALEN, 2003).

As caspases estão presentes no núcleo como enzimas inativas. A ativação das caspases iniciadoras, tais como 2, 8, 9 e 10, por sinais pró-apoptóticos leva a ativação proteolítica das caspases efetoras 3, 6 e 7. Essas caspases clivam um grupo de proteínas vitais (lamininas e gelsolinas) e ativam proteoliticamente enzimas latentes, como as nucleases, iniciando e executando a fase de degradação celular e as mudanças morfológicas típicas da célula. (SARASTE & PULKKI, 2000).

Três vias celulares de sinalização distintas são descritas como responsáveis pelo início da apoptose: via extrínseca ou de sinalização externa, via intrínseca ou mitocondrial e a terceira via, ativa pelo fator de indução da apoptose (AIF) (JOZA *et al.*, 2001).

Na via extrínseca, o processo é ativado por estímulos externos por meio de ligantes e receptores de morte específicos presentes na membrana celular, que recrutam proteínas adaptadoras, ativando, assim, a cascata de caspases, culminando na morte celular (ASHE & BERRY, 2003). Esses fatores de morte pertencem à família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF), que compreende o receptor TNF-1 (TNF-R1), Fas (Apop-1 ou CD19),



receptor de morte DR3, 4 (TRAIL R1) e DR5 (TRAIL R2) (ASHE & BERRY, 2003). A ligação desses ligantes aos seus respectivos receptores de morte promove o recrutamento de proteínas adaptadoras (FADD com o Fas; TRADD com TNF-R1, RIP ou ambos) que, juntamente com a forma inativa da caspase 8, forma um complexo de sinalização de indução de morte (DISC). Este complexo ativa a caspase 8, iniciando-se, assim a cascata de caspases que, por sua vez, ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 e resultam na morte celular apoptótica (ASHE & BERRY, 2003).

A via intrínseca ou mitocondrial ocorre pela ativação por estresse de proteínas intracelulares específicas com a participação dos membros da família de proteínas Bcl-2, considerados os mediadores essenciais de sobrevivência e apoptose celular (ASHE & BERRY, 2003). A família de proteínas Bcl-2 é formada por cerca de 15 membros com função pró-apoptótica (Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Bik, Blk e Hrk) e anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1 e BHRF) (DLAMINI *et al.*, 2004). Essas proteínas localizam-se na membrana mitocondrial externa, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático das células. Os membros com função anti-apoptótica estabilizam a membrana da mitocôndria, enquanto que os pró-apoptóticos permeabilizam e induzem a liberação do citocromo c que, na presença de dATP, forma um complexo com o fator 1 de ativação da proteína apoptótica (APAF-1) e caspase-9, ativando a cascata de caspases efetoras (DLAMINI *et al.*, 2004).

A terceira via de sinalização também depende da mitocôndria, mas independe das caspases. Ocorre pela liberação de fatores apoptogênicos, como citocromo c, fator de indução da apoptose (AIF) (HONG *et al.*, 2004), ATP, proteínas do choque térmico e DIABLO/Smac, um inibidor de IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), neutralizando sua atividade anti-apoptótica (DU *et al.*, 2000).

### **3.3.2 *Helicobacter pylori* e Apoptose**

A infecção por *H. pylori* tem sido frequentemente associada tanto com apoptose aumentada (MOSS *et al.*, 1996; SHIOTANI, 2005), não alterada (ANTI, 1998), ou até mesmo diminuída (WAGNER *et al.*, 1997). Após anos de colonização pela bactéria, os casos em que não há um equilíbrio entre a proliferação celular elevada e o aumento equivalente na apoptose podem reter células com mutações, assim aumentando o risco de câncer gástrico (CHANG *et al.*, 2004).

Um aumento de moderado a acentuado de células apoptóticas é relatado em gastrite crônica, frequentemente associada com atrofia glandular e infecção por *H. pylori* (MOSS *et al.*, 1996; ISHIDA *et al.*, 1996; STEININGER *et al.* 1998). A variação do índice apoptótico pode ser devida à contagem de diferentes tipos celulares (epitélio foveolar, glandular ou ambos) e a diferentes fatores de virulência das amostras *H. pylori* (VON HERBAY & RUDI, 2000). Além disso, tem sido relatada uma correlação positiva entre o índice apoptótico e o grau de atrofia glandular, indicando que o aumento de apoptose pode ter uma função importante no desenvolvimento de atrofia glandular (YOSHIMURA *et al.*, 2000).

Há numerosos estudos mostrando que a infecção por *H. pylori* promove apoptose, mas os mecanismos não estão estabelecidos (MANNICK *et al.* 1996, MOSS *et al.* 1996, CHEN *et al.* 1997, WAGNER *et al.* 1997, KONTUREK *et al.* 1999, ROKKAS *et al.* 1999, JANG & KIM 2000, MOSS *et al.* 2001, MAEDA *et al.* 2002, YANG *et al.* 2003). Questiona-se se a indução de apoptose resultaria diretamente da ação de diversos tipos de *H. pylori* ou indiretamente através da resposta imune e inflamatória do hospedeiro ou da interação de ambos. Considera-se que, a princípio, a indução de apoptose resultaria diretamente da ação de *H. pylori* sobre o epitélio gástrico e que os demais fatores atuariam seqüencialmente modulando o processo (MANNICK *et al.* 1996). O papel de amostras *cagA* positivas na indução de apoptose é controverso, embora recentemente tenha sido demonstrada relação direta entre infecção por amostras *cagA* positivas e apoptose (PEEK *et al.* 1997, MOSS *et al.* 2001, MAEDA *et al.* 2002).

A indução persistente e intensa da apoptose promoveria o desequilíbrio da relação apoptose/proliferação celular e poderia induzir resposta hiperproliferativa compensatória da mucosa gástrica com aumento do *turnover* celular e, conseqüentemente, aumento da susceptibilidade à ocorrência de mutações, favorecendo a carcinogênese gástrica (JANG & KIM 2000, XIA & TALLEY 2001).

Os estudos a respeito da apoptose na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* relatam seu aumento (KONTUREK, BILANSKI *et al.*, 1999; KRAJEWSKI *et al.*, 1996; MOSS *et al.*, 1996; MULLIS & FALOONA, 1987; SHIBAYAMA *et al.*, 2001; SOBALA *et al.*, 1991; WAGNER *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2003), mas são fragmentados e não esclarecem aspectos relativos às vias envolvidas. Poucos estudos *in vivo* e *in vitro* têm estudado a expressão de proteínas e enzimas envolvidas nas vias extrínseca e intrínseca da apoptose (MAEDA *et al.*,

2002) e, quando o fazem, não analisam totalmente os fatores envolvidos em cada uma das vias (ADAM & CORY, 1998; ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

Segundo alguns, a infecção por *H. pylori* desencadeia a apoptose por meio da via intrínseca, relacionada à ação de radicais livres. Estes estudos demonstram subexpressão de Bcl2 e/ou Bclx, proteínas anti-apoptóticas e superexpressão de Bax e Bak, proteínas pró-apoptóticas (CHEN *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1996). Entretanto, outros pesquisadores relatam aumento de FAS e FAS-ligante, relacionados com a via extrínseca da apoptose, que pode ser estimulada por diversos compostos lesivos ao epitélio, além de radicais livres (BAIK *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 2001; MANNICK *et al.*, 1996; SOBALA *et al.*, 1991).

Estudos topográficos e de imunohistoquímica desenvolvidos pelo nosso grupo em pacientes com gastrite associada a *H. pylori*, demonstraram que a gastrite por amostras *cagA* positivas acomete o antro e corpo distal, com atrofia e MI predominantemente na pequena curvatura antral (CABRAL *et al.*, 2006), onde se observaram, também, maiores índices de proliferação celular. Nestes pacientes demonstramos super-expressão de Bax e Bak, relação significativa da expressão de Bak com atrofia e nenhuma relação com MI. A expressão de proteínas pró-apoptóticas foi significativamente mais intensa na pequena curvatura antral dos pacientes infectados que no resto da mucosa mas, nesta região, observamos, também, aumento da expressão de Bcl2 e Bclx, quando comparada ao resto da mucosa.

O aumento de expressão de proteínas anti-apoptóticas foi interpretado como resposta à apoptose. Mais estudos são necessários para a determinação dos índices de apoptose, utilizando outros métodos para a detecção e quantificação diferente do método de TUNEL, no qual a análise é realizada pela marcação *in situ* dos fragmentos de DNA (*terminal deoxyuridine nucleotide nick end-labeling*), (GAVRIELI *et al.*, 1992; GRASL-KRAUPP *et al.*, 1995).

Embora este método seja empregado em vários estudos sobre apoptose, há restrições e críticas quanto à sua aplicação, pois demonstrou-se que os resultados podem ser influenciados pelo tipo e duração do processo histológico de fixação de tecidos (GRASL-KRAUPP *et al.*, 1995; CERVOS-NAVARRO *et al.*, 1996; LABAT-MOLEUR *et al.*, 1998). Assim, há a necessidade de se utilizar novos anticorpos disponíveis para a detecção de enzimas e proteínas diretamente envolvidas nos mecanismos intracelulares reguladores e efetores da apoptose.

Até onde se sabe, existem poucos estudos analisando se há diferenças na apoptose e suas vias de ativação quando se consideram pacientes aparentemente sem risco para desenvolver CaG, como os portadores de úlcera duodenal (UD), e aqueles com risco, como os portadores de GCA, e a determinação do índice apoptótico nos pacientes com GC pela imuno-expressão do anticorpo monoclonal M30 CytoDEATH, o qual permite a identificação das células em processo de apoptose com maior sensibilidade e especificidade.

### **3.4 *H. pylori* e carcinogênese gástrica**

Em 1994, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer reconheceu *H. pylori* com carcinogênio de classe I devido à forte correlação epidemiológica entre infecção crônica por *H. pylori* e CaG (I.A.R.C. 1994). Esta bactéria é o principal agente etiológico de doenças gástricas severas, incluindo a úlcera péptica, GC e eleva o risco em seis vezes para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (I.A.R.C. 1994).

A carcinogênese gástrica é caracterizada por um processo de múltiplas etapas, associada a uma série de mudanças histológicas pré-malignas, iniciando-se a partir de uma gastrite ativa crônica frequentemente associada a infecção por *H. pylori* e progredindo por meio de uma seqüência patogênica para gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma (CORREA, 1988; TAHARA, 2004). A infecção crônica da mucosa gástrica por *H. pylori* é fator de risco para o CaG dos tipos intestinal e difuso de Laurén (FORMAN *et al.*, 1991; NOMURA *et al.*, 1991; PARSONNET *et al.*, 1991; CORREA 1992; CORREA 1995; MEINING *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 1999).

A GC por *H.pylori*, associada ao tipo de dieta, evoluiria para GC atrófica, MI dos tipos completa e incompleta, displasia e CaG tipo intestinal. Por outro lado, a GC por *H.pylori*, sob a modulação de fatores genéticos, progrediria mais diretamente a partir de lesões hiperplásicas e talvez displasia para CaG do tipo difuso.

Embora o papel do *H. pylori* na carcinogênese gástrica não esteja estabelecido, parece estar relacionado com:

a) a capacidade de promover desequilíbrio na relação proliferação celular e apoptose ou morte celular geneticamente programada (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE *et al.*, 1980), interferindo em ambas (BRENES *et al.*, 1993; FAN *et al.*, 1996; MOSS *et al.*, 1996; MURAKAMI *et*

*al.*,1997; WAGNER *et al.*, 1997; ANTI *et al.*, 1998; ROKKAS *et al.*, 1999; JANG & KIM 2000; VON HERBAY & RUDI, 2000);

b) a atividade da reação inflamatória, uma vez que os polimorfonucleares neutrófilos liberam compostos nitrosos, sabidamente mutagênicos (LADEIRA *et al.*, 2004; KIM 2005);

c) o desenvolvimento de GCA associada a MI, observada em uma parte dos pacientes infectados por *H. pylori* (CORREA 1995);

d) a secreção pela mucosa gástrica inflamada de uma isoforma de IL-1 $\beta$  que bloqueia a secreção ácida gástrica (EL-OMAR *et al.*, 1997; EL-OMAR *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2002; MACHADO & FIGUEIREDO 2003; ROCHA *et al.*, 2005) favorecendo o desenvolvimento do CaG;

e) todos esses fatores associados.

A infecção por *H. pylori* resulta na produção aumentada de citocinas gástricas pró-inflamatórias, levando à inflamação contínua e severa, com atividade, hipocloridria e atrofia da mucosa (EL-OMAR *et al.*, 2000; EL-OMAR 2001; MACHADO *et al.*, 2003; BLASER & ATHERTON, 2004). O grau de resposta inflamatória depende do tipo de IL que, por sua vez, se relaciona com o tipo de amostra bacteriana. A IL-8 está aumentada na infecção por *H. pylori* e essa resposta é mais intensa se induzida por amostras *cagA* positivas (CRABTREE & FARMERY *et al.*,1994; CRABTREE & WYATT *et al.*, 1994; CRABTREE *et al.*, 1995; PEEK *et al.*, 1995; KUSTERS *et al.*, 2006; AMIEVA & EL-OMAR, 2008; ARGENT *et al.*, 2008), contribuindo para maiores danos à mucosa gástrica, o desenvolvimento de atrofia e risco de desenvolvimento de GCA (CRABTREE & FARMERY *et al.*, 1994; ANDO *et al.*, 1996; CENSINI *et al.*, 1996). Há evidências de que amostras *cagA* positivas estão relacionadas com risco aumentado de desenvolvimento de CaG (QUEIROZ *et al.*, 1998). A IL-1 $\beta$  é uma potente citocina pró-inflamatória inibidora de secreção ácida gástrica e polimorfismos de IL-1 $\beta$  se relacionam, em alguns hospedeiros, com profunda inibição da secreção ácida na vigência da infecção e estão associados com o aumento de risco para CaG (EL-OMAR *et al.*, 2000; HWANG *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2003, KUSTERS *et al.*, 2006; ANDO *et al.*, 2006). Finalmente, há evidências de que o processo inflamatório induzido pelo microrganismo se associa a dano do DNA epitelial (KANYAMA *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004; BLASER & ATHERTON, 2004; KIM, 2005; CHOI & WU, 2005; LYNCH *et al.*, 2005; ANDO *et al.*, 2006).

### 3.4.1 Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) e carcinogênese gástrica

O óxido nítrico (NO) é reconhecido como um mediador fundamental nos mecanismos de defesa gástrica, devido a sua habilidade de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e a produção de muco e de inibir a aderência de neutrófilos às células endoteliais.

Além disso, o NO tem um papel chave na perfusão e regulação vascular por promover a vasodilatação pela sinalização da célula muscular lisa via GMPc (SHAH et al., 2004). O principal fluxo sanguíneo para o TGI chegar através da veia mesentérica e a regulação do fluxo até as arteríolas mesentéricas é um passo importante para a regulação do fluxo sanguíneo intestinal geral e local (SHAH et al., 2004).

A produção constitutiva de NO é importante para manter a barreira protetora da mucosa gastrointestinal. Esse mecanismo protetor do NO pode ser devido à sua capacidade em aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa e estabilizar a influência dos mastócitos (ALICAN et al., 1996). Entretanto, o excesso na produção de NO, associado com estados inflamatórios, é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira de muco. Assim, os níveis de produção de NO, a isoforma geradora de NO e o estado redox das células epiteliais podem determinar os efeitos do NO na permeabilidade da mucosa e na proteção (SHAH et al., 2004).

O NO é sintetizado pela NO sintase (NOS) a partir de oxigênio (O<sub>2</sub>) e L-arginina. Existem três isoformas conhecidas da NOS: uma forma induzida (ou inflamatória) - iNOS (expressa em macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores) e duas ditas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS) (CHO, 2001; UCHIDA *et al.*, 2001).

Estímulos apropriados, tais como respostas inflamatórias como, por exemplo, na presença de úlcera gástrica, aumentam a atividade da iNOS (KRISTJANSSON *et al.*, 2005). O bloqueio do NO aumenta o estresse oxidativo, ativando mastócitos, que são células encontradas em grandes quantidades no trato gastrointestinal, e que liberam mediadores como histamina e fator ativador de plaquetas, causando aumento da permeabilidade epitelial (KANWAR *et al.*, 1994).

Recentemente, avanços na pesquisa em *H. pylori* associados à carcinogênese gástrica estão esclarecendo que o óxido nítrico (NO), derivado de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), desempenha um papel crucial nesse processo (NAITO & YOSHIKAWA, 2002). Estudos mostram que iNOS é expressa na mucosa gástrica de pacientes com GC associada à infecção por *H. pylori* e que, essa expressão, está intimamente relacionada com a infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (FU *et al.*, 1999).

A influência da expressão da iNOS na carcinogênese gástrica foi claramente demonstrada por (RAJNAKOVA *et al.*, 1997). Seus estudos mostraram que, no grupo de pessoas infectadas por *H. pylori*, a expressão de iNOS e nitrotirosina foi significativamente maior no grupo que desenvolveu câncer de estômago, sugerindo que, nos indivíduos infectados por *H. pylori*, o alto nível de espécies reativas de nitrogênio na mucosa gástrica pode ter um papel crucial no desenvolvimento de câncer gástrico. Estes resultados provaram que a expressão de iNOS na mucosa gástrica está diretamente relacionada com a promoção de desenvolvimento tumoral.

O NO pode contribuir de várias formas na carcinogênese gástrica como danos causados ao DNA (LIU & HOTCHKISS, 1995, SMOOT *et al.*, 2000); aumento da angiogênese e fluxo sanguíneo (FUKUMURA & JAIN, 1998); alterações no processo de morte celular por apoptose (KOLB & KOLB, 1992; CHANG *et al.*, 2004, LI & XU, 2005); alterações no sistema imune do paciente na presença de *H. pylori* (LEJEUNE *et al.*, 1994) e ativação de enzima ciclooxigenase-2 (KIM *et al.*, 2005, JANG *et al.*, 2009).

A determinação da expressão elevada de iNOS na mucosa gástrica pode levar à identificação de grupos de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico. Porém, é impossível determinar o nível de expressão de iNOS na mucosa gástrica durante um exame de rotina endoscópica.

### **3.5 - *Helicobacter pylori* e Turnover Celular**

Está estabelecido que *H. pylori* é capaz de modificar o *turnover* epitelial da mucosa gástrica induzindo apoptose e hiperproliferação (ABDEL-WAHAB *et al.*, 1997; BRENES *et al.*, 1993; CAHIL *et al.*, 1995; LYNCH *et al.*, 1994; LYNCH & AXON, 1994; LYNCH & MAPSTONE *et al.*, 1995; PANELLA *et al.*, 1996).

O distúrbio do equilíbrio entre a proliferação celular e apoptose é considerado um fator de risco para atrofia gástrica e transformação maligna (PEEK *et al.*, 1997; PEEK *et al.*, 2002;

LYNCH & AXON, 1995; ANTI *et al.*, 1998). A renovação do epitélio da mucosa gástrica é rápida e é necessário um equilíbrio entre todos os fatores que atuam nesse processo. O ponto chave desse equilíbrio é o balanço entre proliferação celular e apoptose que podem ser modulados (promovidos ou inibidos) por diversos fatores (ANTI *et al.*, 1998).

A associação entre a infecção da mucosa gástrica pela bactéria *H. pylori* em lesões da mucosa gástrica é um assunto ainda em discussão. Apesar das atividades de urease da bactéria *H.pylori* e a infiltração de leucócitos terem um efeito mitogênico, o aumento da proliferação celular gástrica também ocorre independentemente da infecção por essa bactéria. NARDONE *et al.* (1999), observaram taxa proliferativa aumentada no epitélio gástrico em pacientes com gastrite crônica e câncer gástrico independentemente da infecção por *H. pylori*, enquanto outros estudos têm enfatizado que essa bactéria induz elevação da taxa proliferativa (LEE *et al.*, 2003). Em nível molecular, é postulado que a indução de resposta mitogênica por *H. pylori* ocorre pela ativação dos receptores de fatores de crescimento tirosina-quinase e pela modificação da transdução de sinais na célula por meio de translocação de proteínas bacterianas (NAUMANN & CABTREE, 2004).

A infecção por *H. pylori* está associada com o aumento (PEEK *et al.*, 1999; MOSS *et al.*, 1996; MANNICK *et al.* 1996; JONES *et al.*, 1997; MOSS *et al.* 2001), não alteração (ANTI *et al.*, 1998) e diminuição (HIRASAWA *et al.*, 1999) do índice apoptótico *in vivo*, enquanto que estudos *in vitro* mostram uma redução no índice apoptótico (PEEK *et al.*, 1999; WAGNER *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1997; FAN *et al.*, 1998; HOUGHTON *et al.*, 1999; JONES, *et al.*, 1999). BHATTACHARYYA *et al.* (2009), observaram que a infecção por *H. pylori* estava relacionada com o aumento da endonuclease AP-1 (APE1), redução da expressão da proteína pró-apoptótica Bax mediada por p-53 e conseqüente inibição da apoptose. No entanto, a infecção por *H. pylori* também levou ao aumento da expressão de Bax (pró-apoptótica), sugerindo que o processo apoptótico poderia ser regulado pelo balanço entre a expressão de Bax e acetilação de APE1 durante a infecção por *H. pylori* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2009; MOSS, 1998; YAMASAKI *et al.*, 2006). Além disso, APE1 desempenha importante papel no reparo do DNA de modo que qualquer alteração na expressão desta proteína pode levar a alterações da atividade celular. Os diferentes resultados observados entre os estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a resposta inflamatória pode ter um efeito modulador sobre as células do epitélio gástrico e que isto explicaria as diferenças nos resultados.



## 4- MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois estudos retrospectivos com o objetivo de estudar a imunexpressão de proteínas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose em crianças e adultos infectados por *H.Pylori* em associação com GC e UD. Além disso, um estudo prospectivo descrito no item 4.2 utilizou amostra de pacientes adultos e determinou o índice apoptótico no epitélio gástrico e sua correlação com a expressão de síntase de óxido nítrico induzida (iNOS) e com a intensidade e atividade da inflamação.

### 4.1 Estudos Retrospectivos

#### 4.1.1 Pacientes Estudados

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP, Brasil (Processo ETIC 119/99) (ANEXOS). O consentimento informado foi obtido previamente de cada paciente mediante a assinatura do termo de Consentimento Pós-Informado.

Foram estudadas biópsias gástricas de crianças e adultos submetidas a endoscopia digestiva alta (EDA), atendidos no Serviço de Endoscopia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais para esclarecimento de sintomas dispépticos.

O material para estudo, presente no arquivo do Serviço de Patologia Gastrointestinal do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, foi selecionado a partir de bases de dados de outros estudos prospectivos de adultos e crianças. Foram selecionados os casos que apresentaram material bem preservado e suficiente para análise imunohistológica (IHQ), além de dados clínicos, endoscópicos e estudo microbiológico completos.

#### 4.1.2 Características dos Pacientes

**Crianças:** Selecionaram-se biópsias de antro de 54 pacientes, com média de idade de  $10 \pm 3,7$  anos, que foram distribuídos em três grupos: grupo controle (CT), com exame histológico normal ou apresentando discreta alteração inflamatória não específica e todos os testes microbiológicos negativos para *H. pylori* ( $n= 10$ ), um grupo que apresentava gastrite com *H.pylori* (GC,  $n= 26$ ) e outro formado por pacientes que apresentavam úlcera duodenal com *H.pylori* (UD,  $n=18$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Grupos de diagnóstico e *status H. pylori* em 54 crianças examinadas.

Grupos diagnósticos	<i>status H. pylori</i>		Total
	<i>H. pylori</i> - positivo	<i>H. pylori</i> -negativo	
Controle	0	10	10
Gastrite Crônica (CG)	26	0	26
Úlcera Duodenal (UD)	18	0	18
Total	44	10	54

**Adultos:** Seleccionaram-se biópsias de antro 70 de pacientes adultos com média de idade de  $45,6 \pm 15$  anos que foram distribuídos em três grupos: grupo controle (CT) com exame histológico normal ou apresentando discreta alteração inflamatória não específica e todos os testes microbiológicos negativos para *H. pylori* (n=13), 57 infectados por *H. pylori* dos quais um grupo com gastrite crônica sem atrofia (GC; n=21), um grupo com gastrite crônica com atrofia (GCA, n=18) e um grupo com UD com H.Pylori (n=18) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Grupos de diagnóstico e *status H. pylori* em 70 pacientes examinados

Grupos diagnósticos	<i>status H. pylori</i>		Total
	<i>H. pylori</i> - positivo	<i>H. pylori</i> -negativo	
Normal (CT)	0	13	13
Gastrite Crônica (CG)	39	0	39
↓			
Gastrite Crônica s/ atrofia	21	0	21
Gastrite Crônica c/ atrofia (CGA)	18	0	18
Úlcera Duodenal (UD)	18	0	18

### 4.1.3 Biópsias Endoscópicas

#### 4.1.3.1 Coleta e processamento do material

As biópsias foram executadas para diagnóstico histológico e colhidas sistematicamente na pequena curvatura do antro a 2 cm do piloro e da parede posterior do corpo gástrico. Biópsias adicionais do antro (n=2) e do corpo (n=2) foram colhidas para exame microbiológico. Os fragmentos de cada uma dessas áreas foram acondicionados em frascos separados e imediatamente fixados em formol tamponado a 10% em PBS, por no mínimo 12 horas.

#### 4.1.3.2 Análise histológica

Os fragmentos de biópsia foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura corados pela hematoxilina-eosina e pela carbolfucsina para detecção de *H. pylori* (ROCHA *et al.*, 1989). A bactéria *H. pylori* foi também identificada pelos aspectos macro e microscópicos,

pelo teste da uréase rapidamente positivo e pelas reações de catalase e oxidase positivas (QUEIROZ *et al.*, 1987).

Os diagnósticos histológicos foram realizados de acordo com o Sistema Sydney atualizado (DIXON *et al.*, 1996) (ANEXO.). Na mucosa gástrica examinada histologicamente as variáveis quantitativas inflamação, atividade, atrofia e metaplasia intestinal foram graduadas em: ausente (0), discreta (1), moderada (2) e acentuada (3) e registrado em cada caso em protocolo individual (ANEXOS). O padrão de gastrite foi classificado como predominantemente antral, predominante do corpo e antro-corpo de acordo com o preconizado pelo Sistema Sydney atualizado (DIXON *et al.*, 1996). A gastrite crônica foi classificada como não- atrofica e GCAM. O diagnóstico de GC por *H. pylori* foi confirmado quando a bactéria foi detectada por pelo menos um dos métodos utilizados.

#### 4.1.4 Estudo imunohistoquímico (IHQ) das vias intrínseca e extrínseca da apoptose

Para IHQ fizeram-se novos cortes histológicos de 4µm de espessura de biópsias da porção média da pequena curvatura antral. Foi empregado o método da estreptavidina-biotina (sABC) de acordo com procedimentos publicados (HSU *et al.*, 1981) e modificado utilizando-se um sistema *kit* comercial (Novolink, Novocastra). Os anticorpos mono e policlonais para o estudo das vias intrínseca e extrínseca da apoptose estão discriminados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Anticorpos primários utilizados para o estudo da expressão das proteínas anti- e pró-apoptóticas da via intrínseca e extrínseca em crianças e adultos.

ANTI-SORO	DILUIÇÃO	TIPO	PROCEDÊNCIA
Bclx ( <b>anti-apoptótica</b> )	1:40	Monoclonal	Novocastra
Bcl2 ( <b>anti-apoptótica</b> )	1:300	Monoclonal	Novocastra
Bax ( <b>pró-apoptótica</b> )	1:40	policlonal	Dakopatts
Bak( <b>pró-apoptótica</b> )	1:250	policlonal	Dakopatts
Fas ( <b>pró-apoptótica</b> )	1:40	Monoclonal	Novocastra
Fas-ligante ( <b>anti-apoptótica</b> )	1:50	Monoclonal	Novocastra

A reativação antigênica foi feita com tratamento dos cortes histológicos em solução de reativação antigênica (Dako Target Retrieval Solution S1699) a 98° C por 20 min para os anticorpos Bcl2, Bax, Fas e Fas-ligante (Fas-L). A coloração de fundo foi feita com hematoxilina de Harris. Controles negativos consistirão na substituição dos anti-soros primários por imunoglobulinas de coelho ou cabra da mesma classe e concentração dos anticorpos primários.

Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados de acordo com o roteiro abaixo:

- Reativação dos sítios antigênicos para o anticorpo quando necessário- Pré-tratamento com solução Retrieval (Dako<sup>R</sup> Target Retrieval Solution 10x concentrate –S1699) a 98°C por 20 min seguindo 20 min à temperatura ambiente.
- Bloqueio da atividade de peroxidase endógena – incubação dos cortes em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em metanol por 10 min.
- Incubação com o anti-soro primário em câmara úmida a 4°C por 16 horas.
- Incubação com “Post Primary Block” (Novolink, Novocastra) por 30 min, em câmara úmida à temperatura ambiente.
- Incubação com o “Polymer” (Novolink, Novocastra) em câmara úmida à temperatura ambiente, por 30 min.
- Revelação com 3-3'-diaminobenzidina (DAB em pastilhas, Dako<sup>R</sup>) a 0,03% em PBS com 0,003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 7 min.
- Lavagens intermediárias com PBS-pH 7,4 (2 x 5 min. cada uma).
- Coloração de fundo com Hematoxilina de Harris.

#### **4.1.5 Avaliação da intensidade de expressão das proteínas pró-e anti-apoptóticas.**

As imuno-expressões das proteínas foram avaliadas em toda a área do epitélio gástrico marcado e correlacionadas com infecção por *H. pylori* e em relação aos grupos diagnósticos.

A expressão imunohistoquímica dessas proteínas foi avaliada semi-quantitativamente através de uma escala de intensidade em graus de 0 a 3, a saber: 0) negativo; 1) fraco; 2) moderado;

3) forte em crianças e adultos. A expressão das proteínas foi também analisada em relação à intensidade de expressão e extensão do epitélio gástrico superficial e foveolar marcado (1:<10%; 2:10-25%; 3:25-50%; 4:50-75%, 5:>75%). O resultado final em cada região do epitélio gástrico e em cada caso foi a soma desses graus.

#### **4.1.6 Análise estatística**

Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram aplicados para estudar a variação da intensidade de expressão das proteínas anti- e pró-apoptóticas de ambas as vias, em relação à infecção por *H. pylori* e às doenças associadas a bactéria

### **4.2 Estudo Prospectivo**

#### **4.2.1 Pacientes Estudados**

Biópsias gástricas de 70 pacientes adultos com média de idades de  $43,8 \pm 15,7$  anos e de ambos os gêneros, foram obtidas via endoscopia digestiva alta (EDA), atendidos no Serviço de Endoscopia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital Odilon Behrens da Prefeitura Municipal de Belo horizonte, para esclarecimento de sintomas dispépticos. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP, Brasil (Processo ETIC 275/06) em 30/08/06 (ANEXOS).

Foram incluídos apenas os pacientes que concordaram em participar deste estudo após explicação de seus objetivos e normas e mediante a assinatura do Termo de Consentimento Pós-informado (ANEXOS). Foram excluídos do estudo pacientes que apresentaram relato de uso de drogas (antimicrobianos, AINEs, inibidores da bomba de prótons, bloqueadores H<sub>2</sub>, etc.) até 30 dias antes de serem submetidos à endoscopia, pacientes portadores de câncer (gástrico ou não), cirurgias gástricas prévias ou outras lesões não pépticas.

A coleta, o processamento e a análise histológica foram os mesmos utilizados para os estudos retrospectivos descritos nos itens **4.1.3.1** e **4.1.3**.

#### **4.2.2 Estudo imunohistoquímico**

Para o estudo IHQ fizeram-se cortes histológicos de 4µm de espessura de biópsias da porção média da pequena curvatura antral. Foi empregado o método da estreptavidina-biotina

(sABC) de acordo com procedimentos publicados anteriormente (HSU *et al.*, 1981) e modificado pelo uso de um sistema *kit* comercial (Novolink, Novocastra). Os anticorpos mono e policlonais utilizados neste experimento estão discriminados na Tabela 4 e compreendem um marcador de apoptose, o qual marca fragmentos de citoqueratina 18 (M30 Cytodeath) e um marcador da síntese de óxido nítrico induzida (iNOS).

**Tabela 4** - Anticorpos primários utilizados para estudo da expressão de iNOS e M30 em adultos.

ANTI-SORO	DILUIÇÃO	TIPO	PROCEDÊNCIA
M30 Cytodeath	1: 25	Monoclonal	Roche
iNOS	1:6000	Policlonal	Chemicon

A reativação antigênica foi feita com tratamento dos cortes histológicos em solução de reativação antigênica (Dako Target Retrieval Solution S1699) a 98° C por 20 min para o anticorpo M30 Cytodeath. A coloração de fundo foi feita com hematoxilina de Harris. Controles negativos consistiram na substituição dos anti-soros primários por imunoglobulinas de coelho ou cabra da mesma classe e concentração dos anticorpos primários.

Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados de acordo com o roteiro descrito no item 4.1.4.

#### **4.2.3 Morfometria Digital**

A metodologia empregada para o estudo microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por CALIARI (1997).

Toda a morfometria digital foi realizada no Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral do ICB da UFMG, sob a orientação do Professor Marcelo Vidigal Caliari.

#### 4.2.3.1 Análise quantitativa da expressão imunohistoquímica do anticorpo M30 CytoDEATH

O índice apoptótico da mucosa antral de cada caso foi obtido através do cálculo da proporção volumétrica de células positivas e negativas para o marcador M30 CytoDEATH (ROCHE - GERMANY) localizadas em três regiões distintas: epitélio gástrico foveolar, epitélio gástrico glandular e lâmina própria, através do mesmo analisador de imagens. Toda a mucosa antral de cada caso foi visualizada por intermédio da objetiva de 40X e digitalizada da microcâmara JVC TK-1270/RGB. Com o auxílio do programa KS300 foi criada uma grade virtual de 100 pontos sobre cada imagem para a contagem das células positivas e negativas, todas as vezes que tocavam um ponto de interseção entre os eixos X e Y (modificado de Pinho *et al.*, 2009). Foram contadas as células positivas e negativas do epitélio gástrico e o índice apoptótico foram determinados em cada caso conforme a fórmula a seguir:

$$AI = \frac{\text{Total de núcleos positivos}}{\text{Total de núcleos}} \times 100$$

O índice apoptótico foi avaliado na mucosa gástrica em relação à infecção por *H. pylori*, intensidade e atividade de inflamação, atrofia, expressão de iNOS.

#### 4.2.3.2 Análise quantitativa da expressão imunohistoquímica de iNOS

A expressão de iNOS foi avaliada em cada caso dos grupos diagnósticos através da contagem das células iNOS<sup>+</sup> e iNOS<sup>-</sup> através do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). A lâmina própria foi observada e digitalizada através da objetiva de 40X e da microcâmara JVC TK-1270/RGB. Através de ferramentas do programa KS300, foram excluídas de cada imagem as áreas de epitélio foveolar e glandular, perfazendo um total de 67.248,62 μm<sup>2</sup> de lamina própria analisada em cada caso. O número total de células (Total = iNOS<sup>+</sup> + iNOS<sup>-</sup>) foi obtido através da seleção dos pixels com tons de marrom (células iNOS<sup>+</sup>) e de roxo (células iNOS<sup>-</sup>) na imagem real, com conseqüente criação de uma imagem binária, processamento digital, definição das condições de morfometria e contagem de todas as células detectadas em cada imagem (método modificado de Pacheco *et al.*, 2007). O índice de expressão dessa enzima foi avaliado em relação à infecção por *H. pylori*, intensidade e atividade da inflamação e índice apoptótico. As células iNOS<sup>+</sup> foram contadas



manualmente devido à diferença na intensidade de marcação entre os grupos de pacientes, o que tornou inaplicável devido a especificidade do programa KS300.

#### **4.2.4 Análise estatística**

Para testar se existem diferenças significativas no índice apoptótico e no índice de expressão de iNOS entre os grupos diagnóstico foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido da comparação múltipla não paramétrica quando as diferenças foram significativas. A análise de Kruskal-Wallis e a comparação múltipla também foram utilizadas para testar diferenças nos índices entre os níveis de intensidade e de atividade de inflamação. Para avaliar se existe relação significativa entre índice apoptótico e o índice de expressão de iNOS foi utilizada a análise de regressão linear. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ .

## 5-RESULTADOS

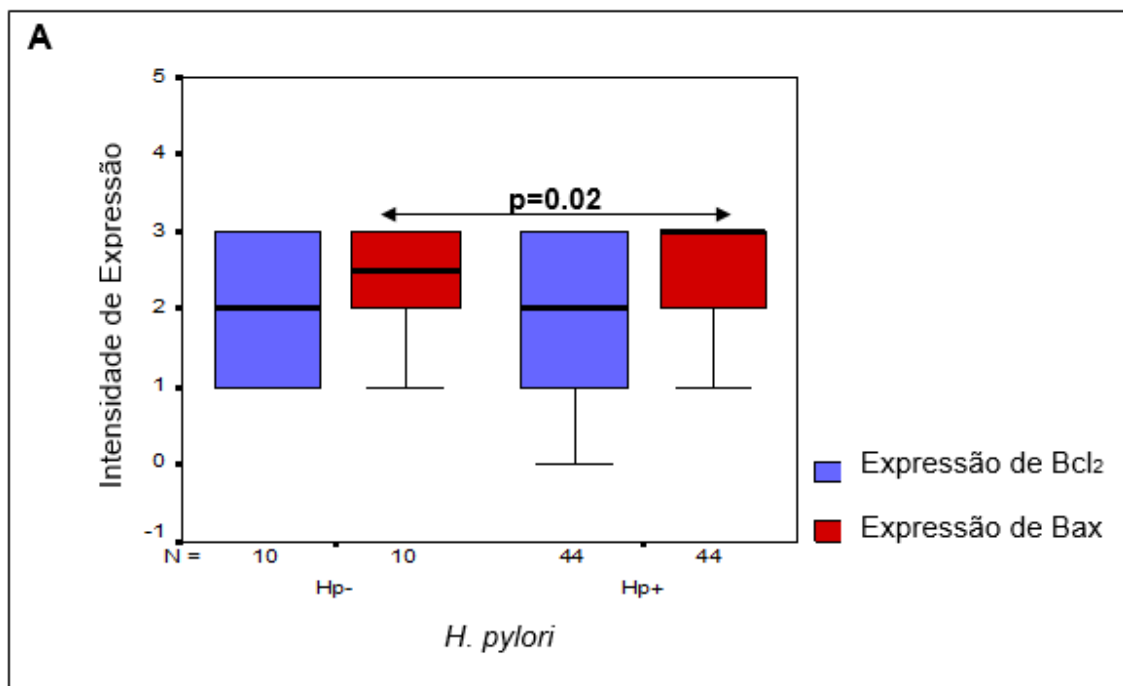
### 5.1 Estudo retrospectivo em crianças

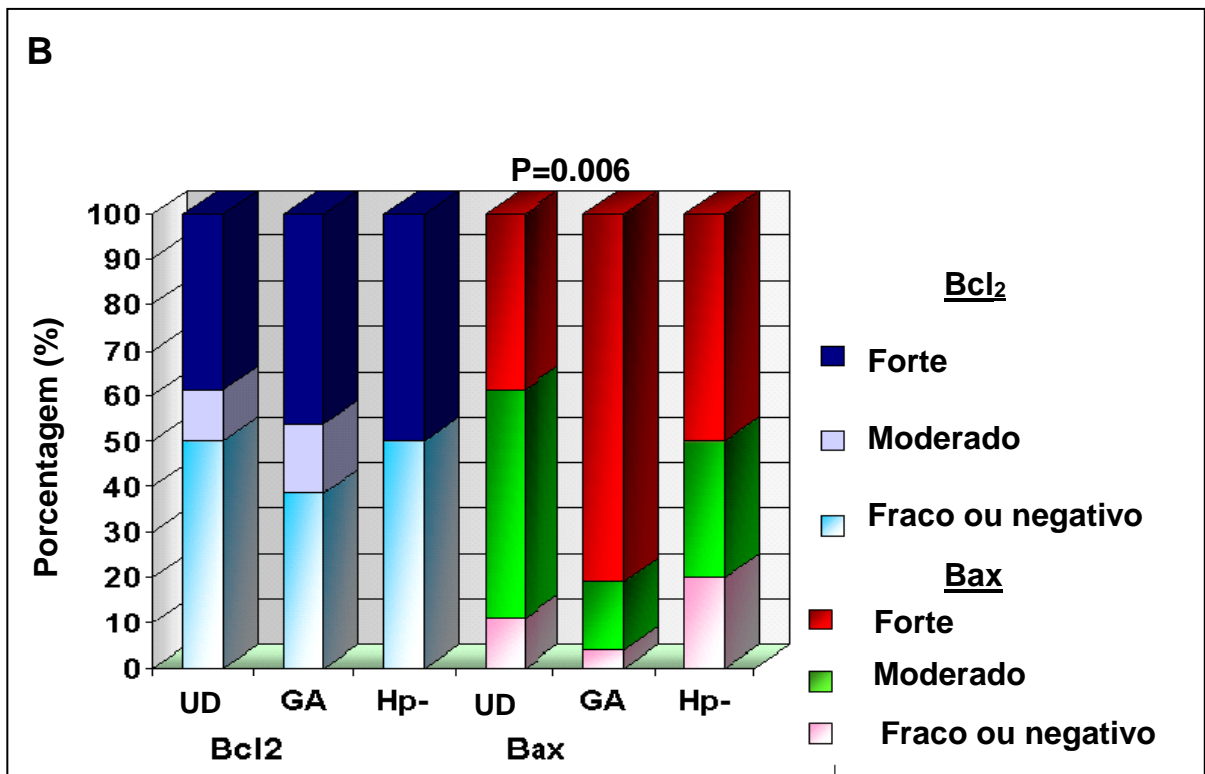
#### 5.1.1 Expressão de Proteínas da via intrínseca da apoptose

A expressão de Bclx foi negativa ou fraca na maioria dos casos.

A expressão de Bax, pró-apoptótica, foi maior no grupo de crianças infectadas ( $Hp^+$ ) quando comparada com a expressão desse anticorpo no grupo normal ( $Hp^-$ ) ( $p=0.02$ ) (Gráfico 1A). A expressão de Bcl2, anti-apoptótica, foi fraca ou negativa em 09 pacientes com UD, 24 com GA e em 5 pacientes CT. (Gráfico1B).

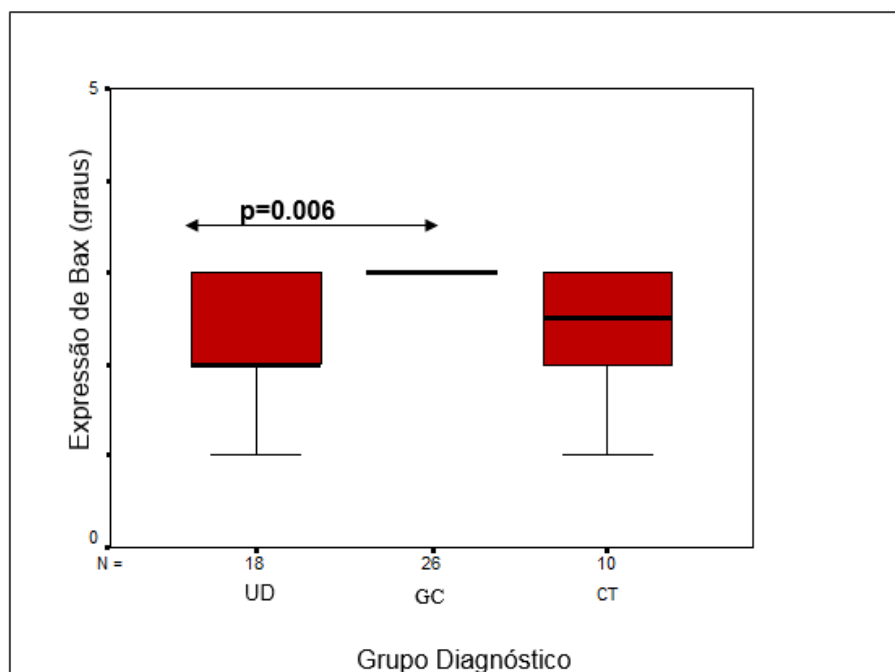
**Gráfico 1** - Comparação da intensidade expressão de Bcl2 e Bax entre o grupo de paciente infectado e não infectado por *H. pylori* (A) e entre os diferentes grupos diagnósticos (B).

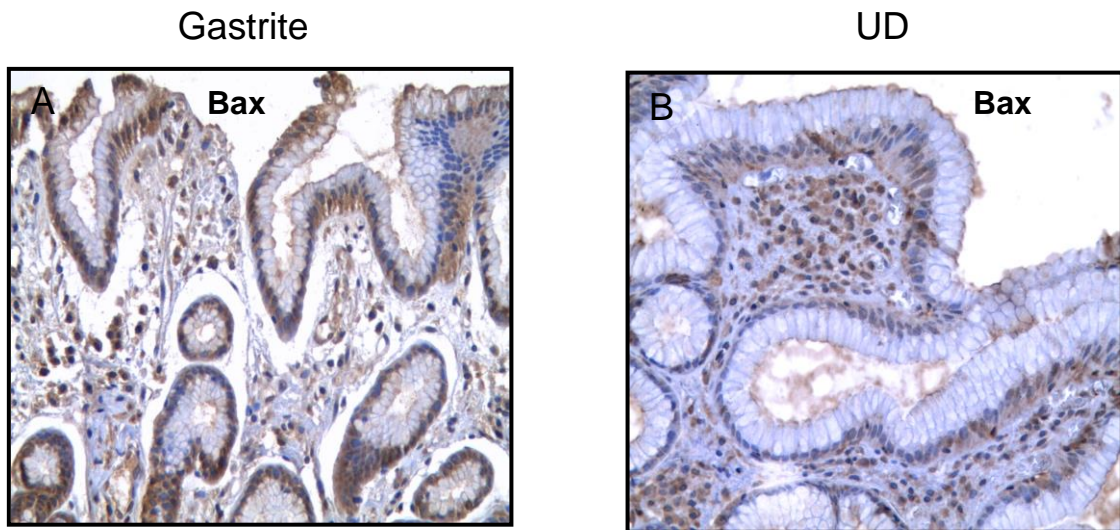




Entre os pacientes infectados, a expressão de Bax foi significativamente maior nos pacientes com gastrite que naqueles com UD ( $p=0.006$ ) (Gráfico 2) (Figura 1)

**Gráfico 2** - Comparação da intensidade de expressão de Bax entre os grupos diagnósticos.

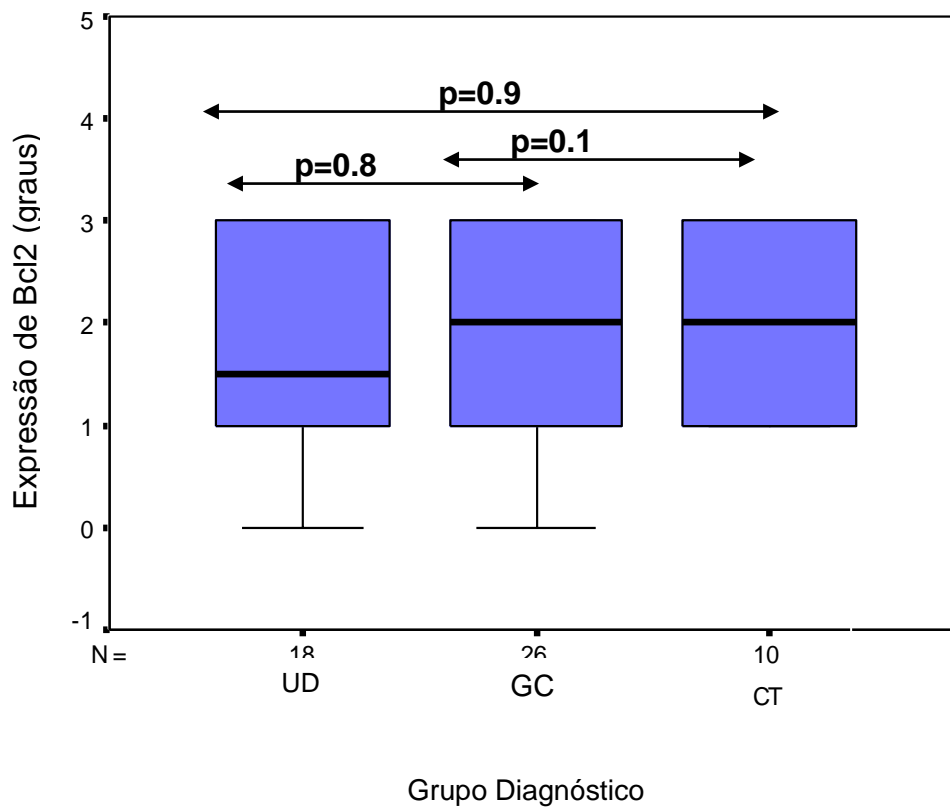


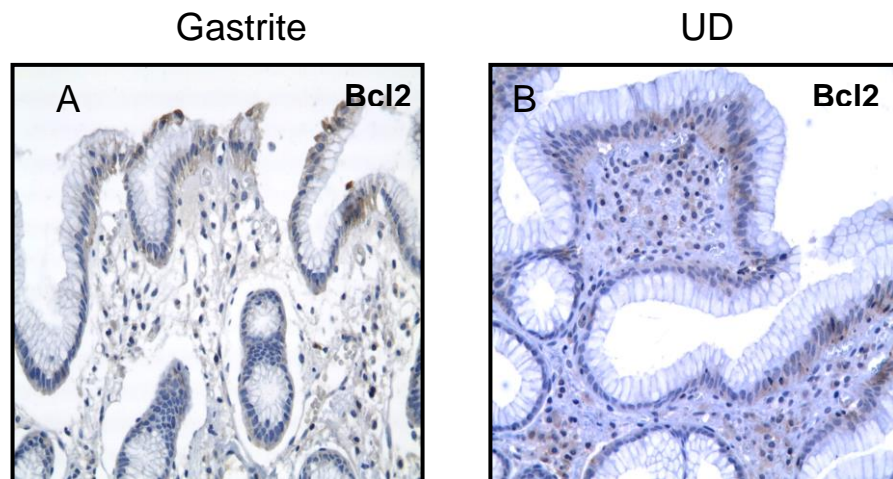


**Figura 1** – Fotomicrografias (40x): A) Intensidade de expressão de Bax pacientes com gastrite crônica; B) Intensidade de expressão de Bax em pacientes UD.

Não houve diferença significativa na expressão de Bcl2 entre os pacientes com gastrite e àqueles que apresentaram UD ( $p=0.8$ ), e entre os pacientes não infectados em comparação com àqueles com UD ( $p=0.9$ ) e gastrite ( $p=0.1$ ) (Gráfico 3) (Figura 2).

**Gráfico 3-** Comparação da intensidade de expressão de Bcl2 entre os grupos de diagnósticos.





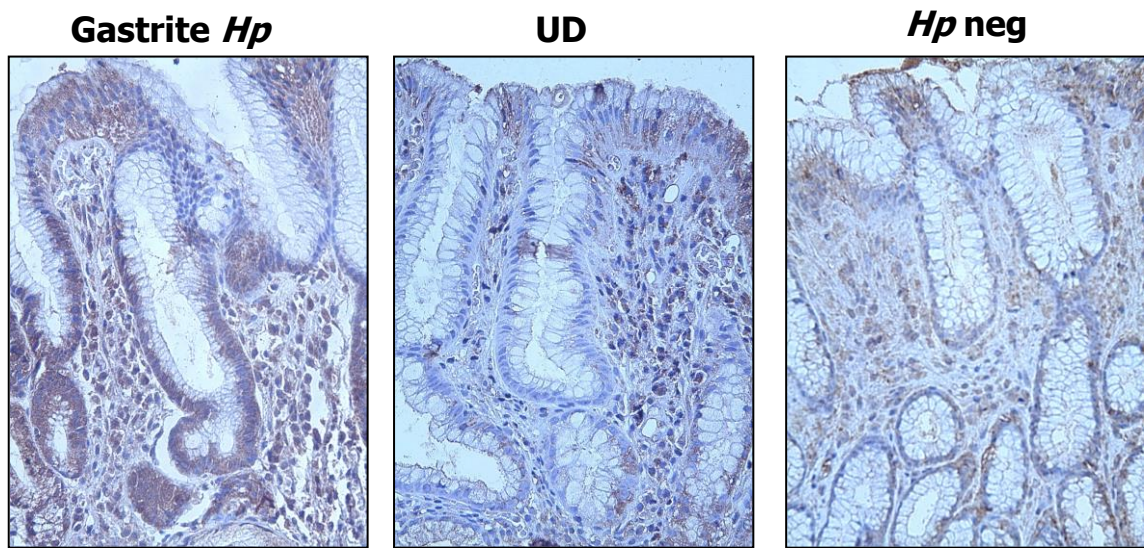
**Figura 2** – Fotomicrografias (40x): Intensidade de expressão de Bcl2 em pacientes com gastrite crônica (A) e em pacientes com UD (B).

### 5.1.2 Estudo retrospectivo Adultos

#### 5.1.2.1 Expressão de Proteínas da via intrínseca e extrínseca da apoptose

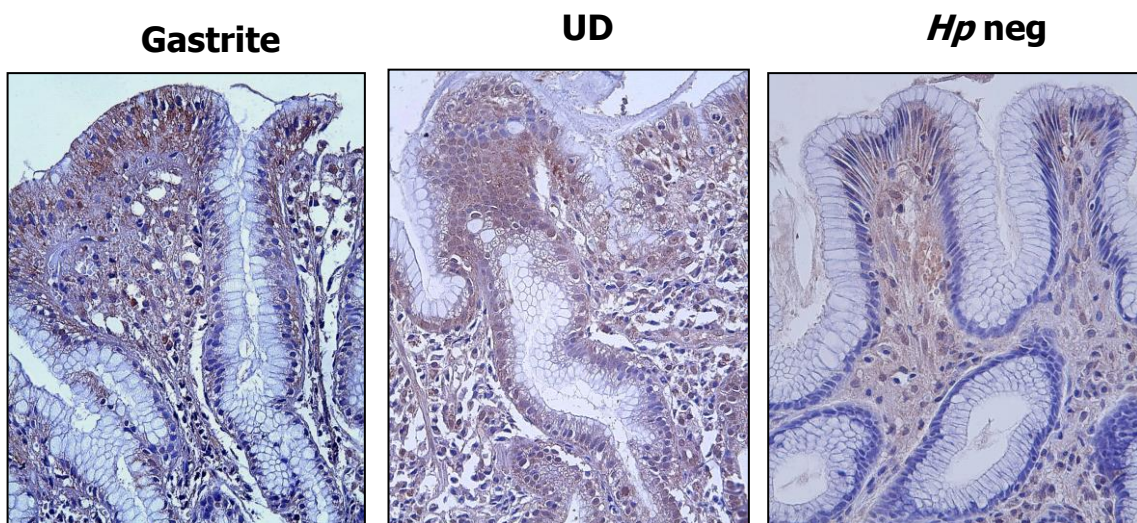
A expressão de Bax foi significativamente maior em pacientes com gastrite associada a *H. pylori* que naqueles com UD ( $p \leq 0.03$ ) e nos pacientes não infectados ( $p \leq 0.02$ ). Não houve diferença significativa na expressão de Bax entre os pacientes ulcerados e aqueles não infectados pela bactéria ( $p > 0.05$ ) (Figura 3).





**Figura 3** - Imunoexpressão citoplasmática de Bax na mucosa gástrica superficial e foveolar de pacientes infectados e não infectados por *H. pylori* (Objetiva de 40x).

A expressão de Bak no epitélio superficial foi mais intensa nos pacientes com UD e nos não infectados que naqueles com gastrite ( $p=0.04$ ,  $p=0.048$ , respectivamente) (Figura 4). No epitélio foveolar, a expressão de Bak foi mais intensa nos pacientes com gastrite que naqueles com UD.



**Figura 4** - Imunoexpressão citoplasmática de Bak na mucosa gástrica superficial e foveolar de pacientes infectados e não infectados por *H. pylori* (Objetiva de 40x).

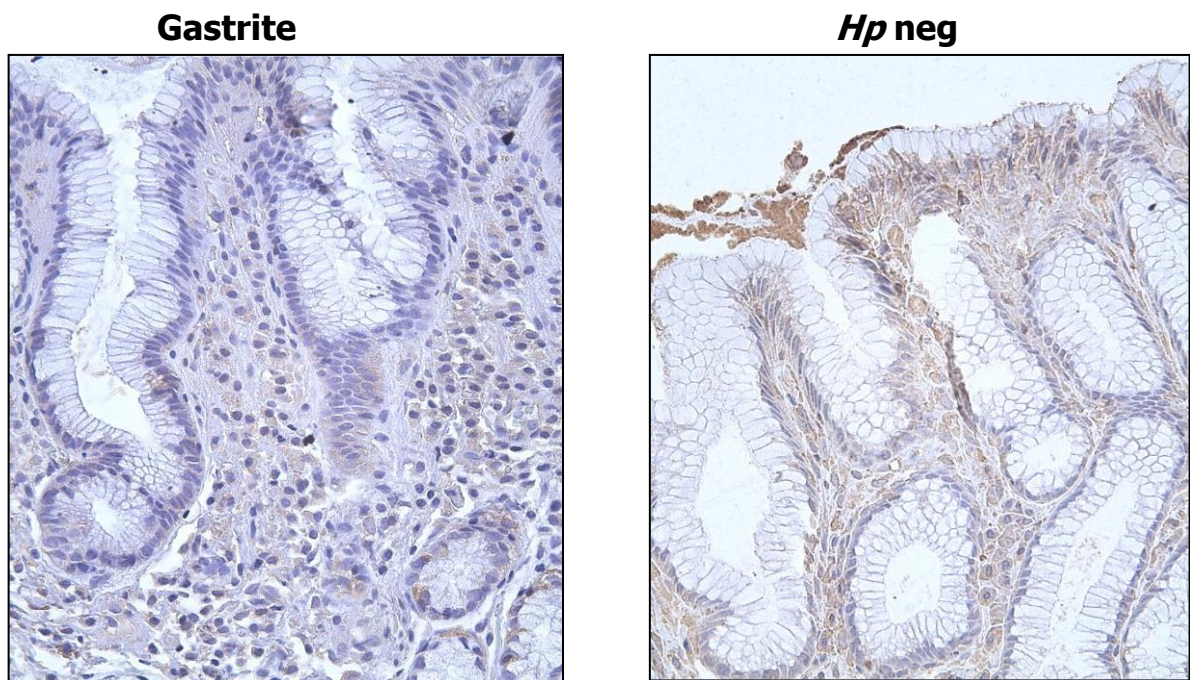
Bcl-x apresentou expressão significativamente maior nos pacientes com gastrite que naqueles com UD ( $p=0.04$ ) e em relação àqueles não infectados ( $p=0.03$ ).

A expressão de Bax, Bak e Bclx foi maior no epitélio foveolar dos casos de gastrite com atrofia que naqueles sem atrofia ( $p=0.05$ ).

A porcentagem de superfície epitelial marcada por Bcl2 foi maior nos pacientes com atrofia ( $p=0.03$ ). Não houve diferença significativa na expressão desse anticorpo nos pacientes com gastrite em comparação com aqueles com UD e os não infectados.

Bcl-x apresentou expressão significativamente maior nos pacientes com gastrite que naqueles com UD ( $p=0.03$ ) e em relação àqueles não infectados ( $p=0.04$ ).

A expressão de Fas foi negativa ou fraca na maioria dos casos. A expressão de Fas-L foi maior na mucosa não infectada que nos casos de gastrite ( $p=0.05$ ) (Figura 5).



**Figura 5** – Fotomicrografia (40x) evidenciando maior expressão de Fas-L na mucosa gástrica em caso de pacientes não infectado em comparação com caso de paciente com gastrite.

## 5.2 Estudo prospectivo em adultos

### 5.2.1 Análise histológica

Estudaram-se 70 pacientes, 18 (26%) homens e 52 (74%) mulheres, com média de idade de  $43,8 \pm 15,7$  anos. Cinquenta e cinco pacientes eram *H. pylori* positivos (79%) e 15 (21%) eram *H. pylori* negativos. Entre os pacientes *H. pylori* positivos 44 (63%) apresentavam CG por *H. pylori* e 11 (16%) GCA associada a bactéria. Destes 11 apresentavam metaplasia intestinal (MI) (Tabela 5). As características da gastrite crônica dos pacientes estudados estão representadas na tabela 6. Aspectos histológicos da GC associada a *H. pylori* são mostradas na Figura 6.

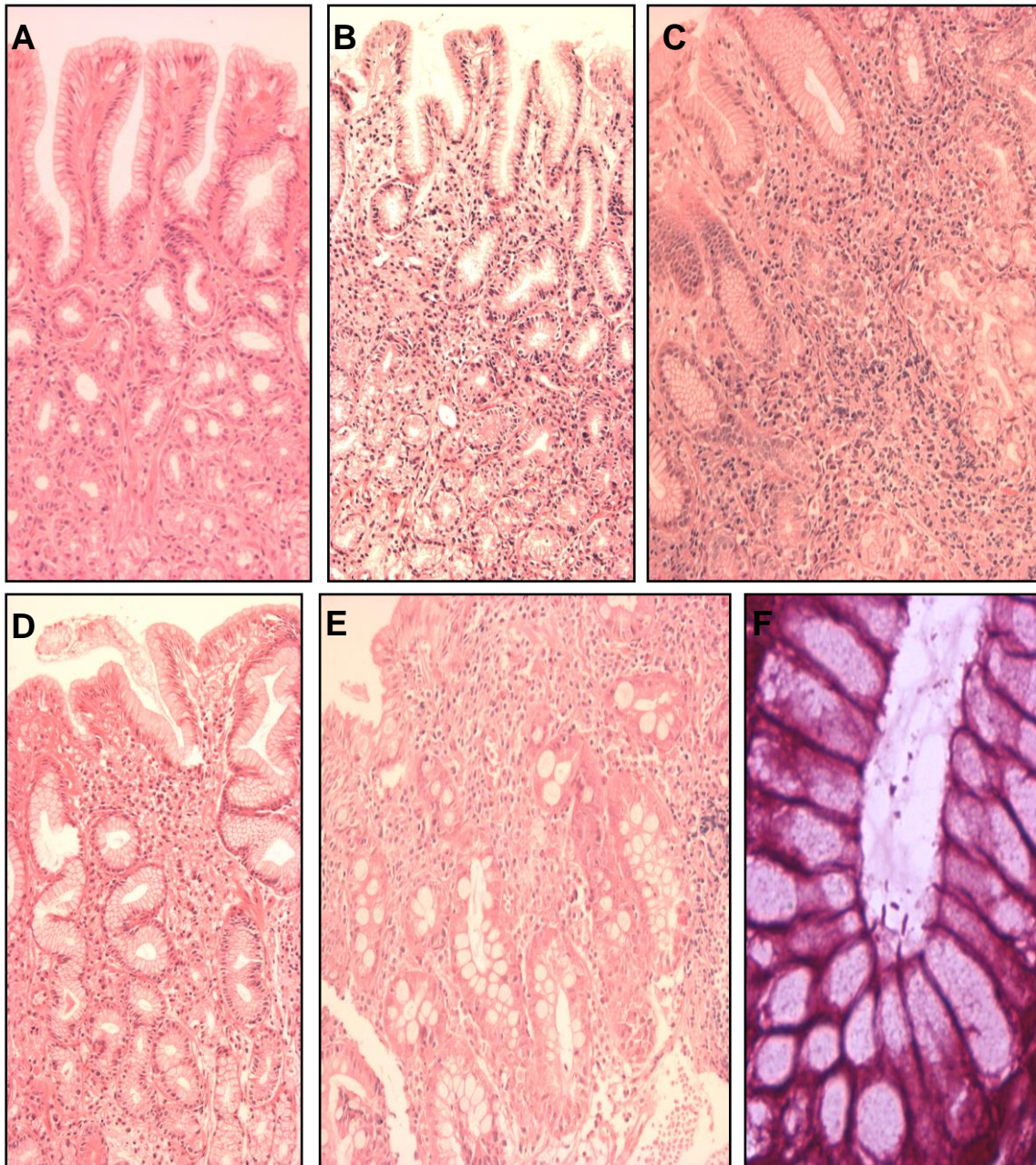
**Tabela 5** – Grupos de diagnóstico e *status H. pylori* em 70 pacientes examinados.

Grupos diagnósticos	<i>status H. pylori</i>		Total
	<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori</i>	
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Normal (CT)	0	15 (21%)	15
Gastrite Crônica (GC)	44 (63%)	-	44
Gastrite Crônica atrófica (GCA)	11(16%)	-	11
Total	55	15	70



**Tabela 6** - Características da gastrite crônica em relação com *status H. pylori*

Parâmetros Gastrite	<i>H.pylori</i> <sup>-</sup>		<i>H.pylori</i> <sup>+</sup>	
			GC	GCA
	N		N	N
<b>Inflamação</b>				
ausente	13		00	00
discreta	03		05	01
moderada	00		32	09
acentuada	00		07	01
<b>Atividade</b>				
ausente	14		00	00
discreta	01		19	05
moderada	00		22	06
acentuada	00		03	00
<b>Atrofia</b>				
ausente	16		44	00
discreta	00		00	07
moderada	00		00	03
acentuada	00		00	01
<b>M. Intestinal</b>				
ausente	16		44	00
discreta	00		00	05
moderada	00		00	03
acentuada	00		00	03



**Figura 6** - Fotomicrografias: A) Mucosa gástrica do antro normal (*H.p*<sup>-</sup>) (HE, objetiva 10x); B) Gastrite crônica por *H. pylori* no antro gástrico com grau de inflamação moderado (HE, objetiva 10x); C) Gastrite crônica por *H. pylori* no antro gástrico com grau de inflamação acentuado (HE, objetiva 10x); D) Gastrite crônica por *H. pylori* com atrofia na mucosa antral (HE, objetiva 10x); E) Gastrite crônica por *H. pylori* com atrofia; F) metaplasia na mucosa antral (HE, objetiva 10x).

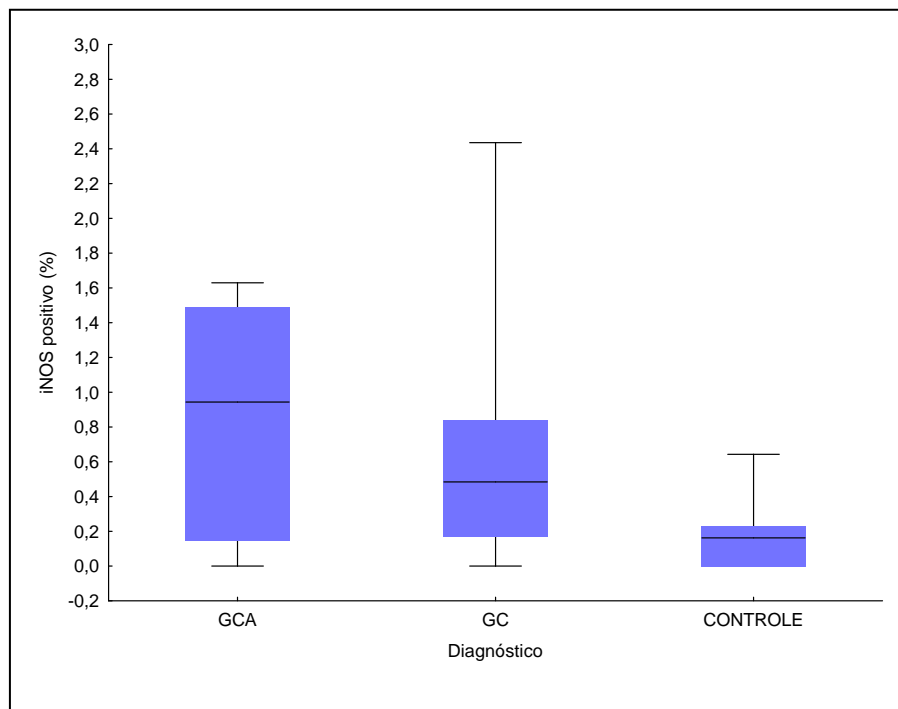
### 5.2.2 Avaliação do índice de expressão de iNOS

O índice de expressão de iNOS mostrou diferença significativa na comparação entre os grupos *H. pylori* positivo ( $Hp^+$ ) e *H. pylori* negativo ( $Hp^-$ ) ( $p=0,002$ ). Na comparação múltipla, não foi encontrada diferença significativa entre GCA e GC ( $p = 0,86$ ), porém o grupo controle ( $Hp^-$ ) mostrou valores significativamente menores que GCA ( $p = 0,006$ ) e GC ( $p = 0,008$ ) (Gráfico 4).

Não houve diferença significativa na comparação entre o índice de expressão de iNOS no grupo  $Hp^+$  com a intensidade e atividade de inflamação ( $p=0,7$ ;  $p=0,2$ ); respectivamente.

A Figura 7 mostra a expressão de iNOS na mucosa gástrica de indivíduos normais e com CG e CGA associadas a infecção por *H. pylori*.

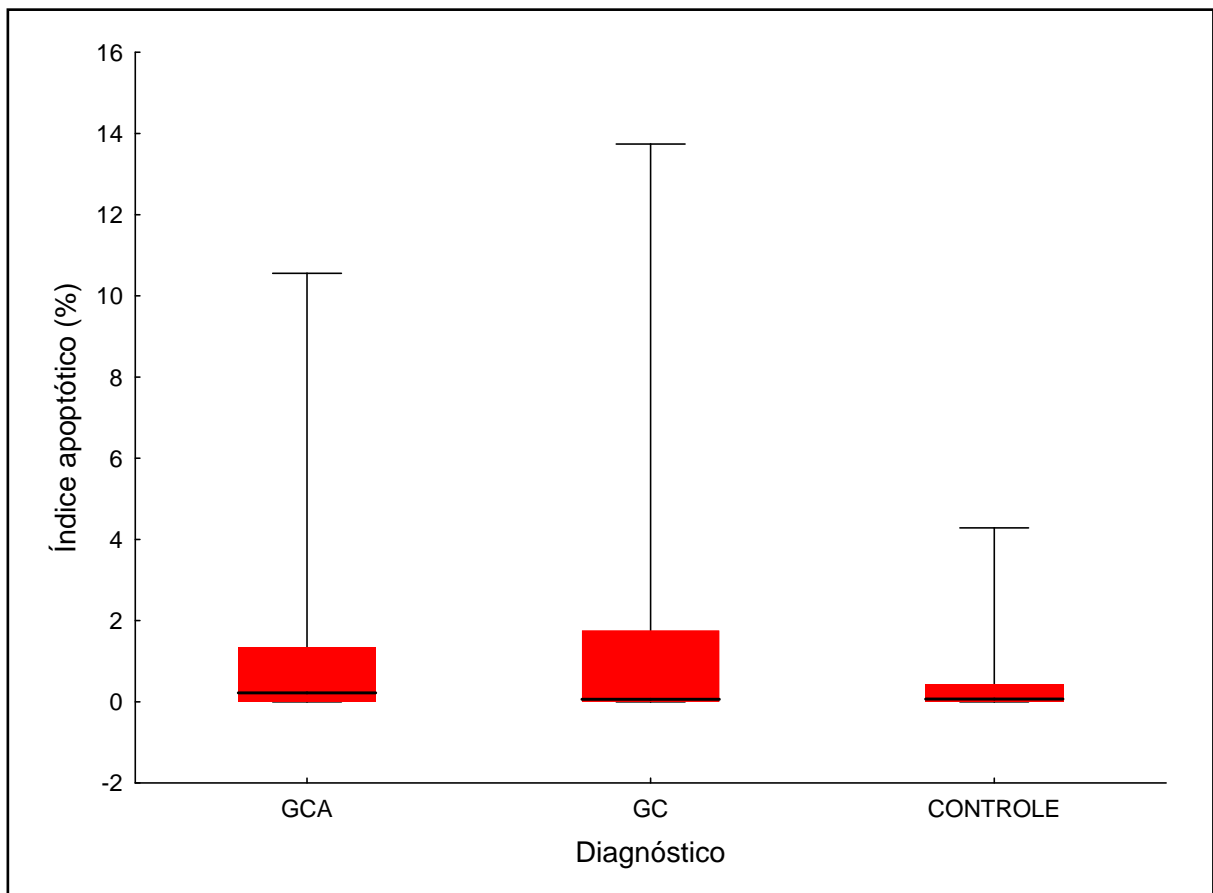
**Gráfico 4** – Índice de expressão de iNOS na mucosa gástrica dos pacientes pertencentes aos diferentes grupos diagnósticos



### 5.2.3 Avaliação do índice apoptótico

Não existe diferença significativa na comparação do índice apoptótico entre a presença ou ausência da bactéria *H. pylori* e entre os diferentes grupos diagnósticos ( $p=0,63$ ). (Gráfico 5).

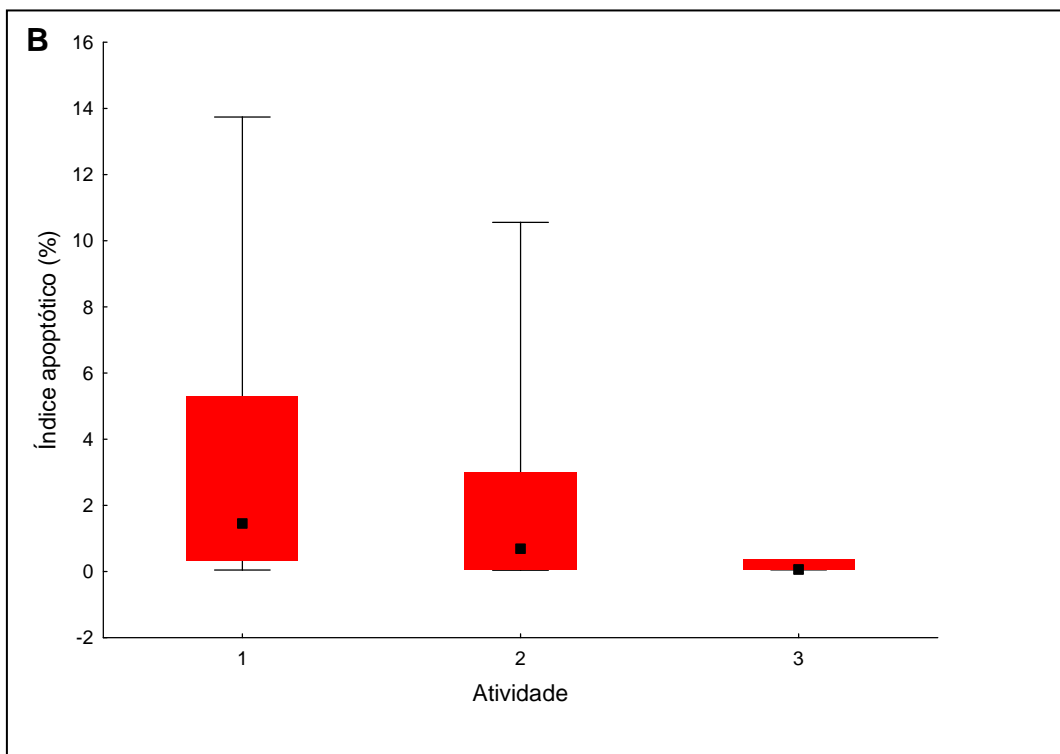
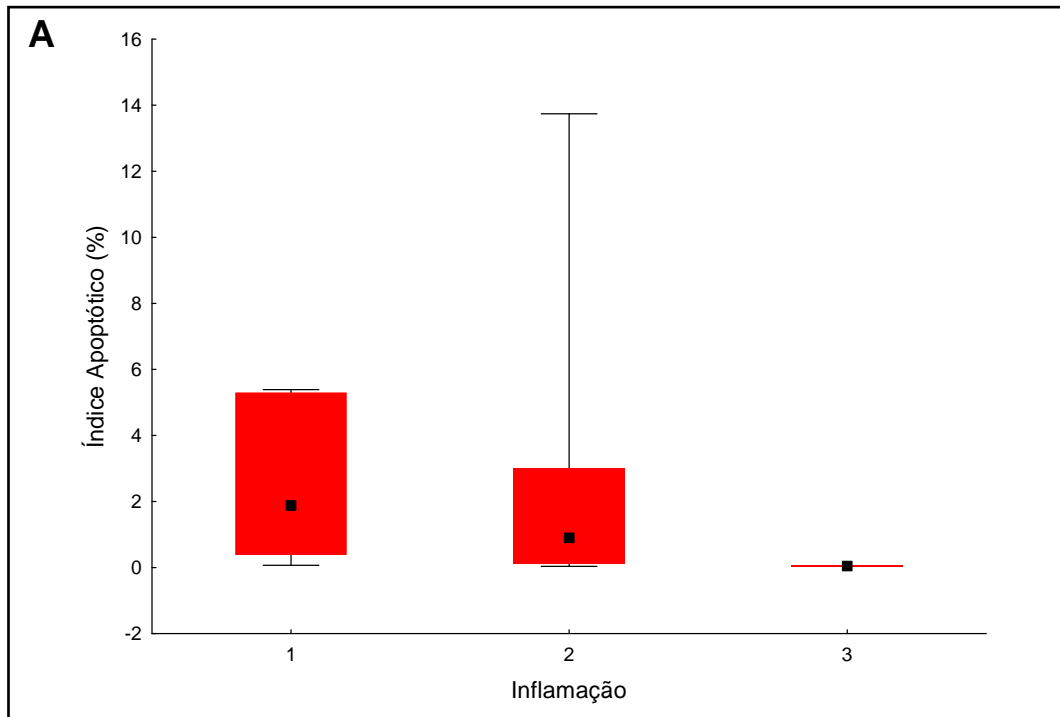
**Gráfico 5** - Índice apoptótico na mucosa antral dos pacientes pertencentes aos diferentes grupos diagnósticos.



Não houve diferença significativa do índice apoptótico em relação a presença de atrofia e MI no antro gástrico de pacientes infectados.

O índice apoptótico no grupo de pacientes infectados ( $Hp^+$ ) depende da intensidade da inflamação ( $p=0,045$ ), sendo maior no grau de inflamação 1 e 2. Não houve diferença significativa entre o índice apoptótico e o grau de atividade da inflamação ( $p=0,08$ ) (Gráfico 6 A e B).

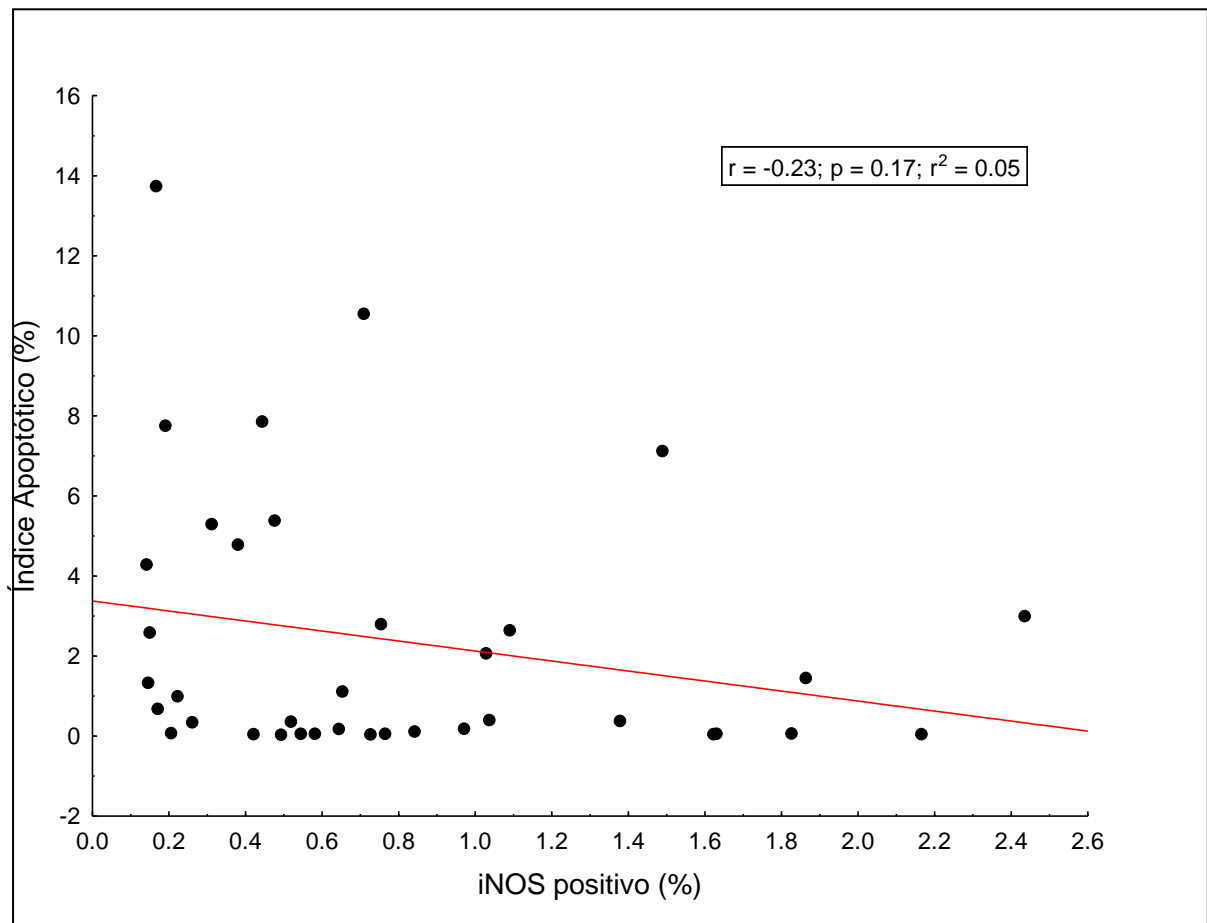
**Gráfico 6** – Comparação entre o índice apoptótico e os graus de intensidade (A) e atividade (B) da inflamação nos diferentes grupos diagnósticos.



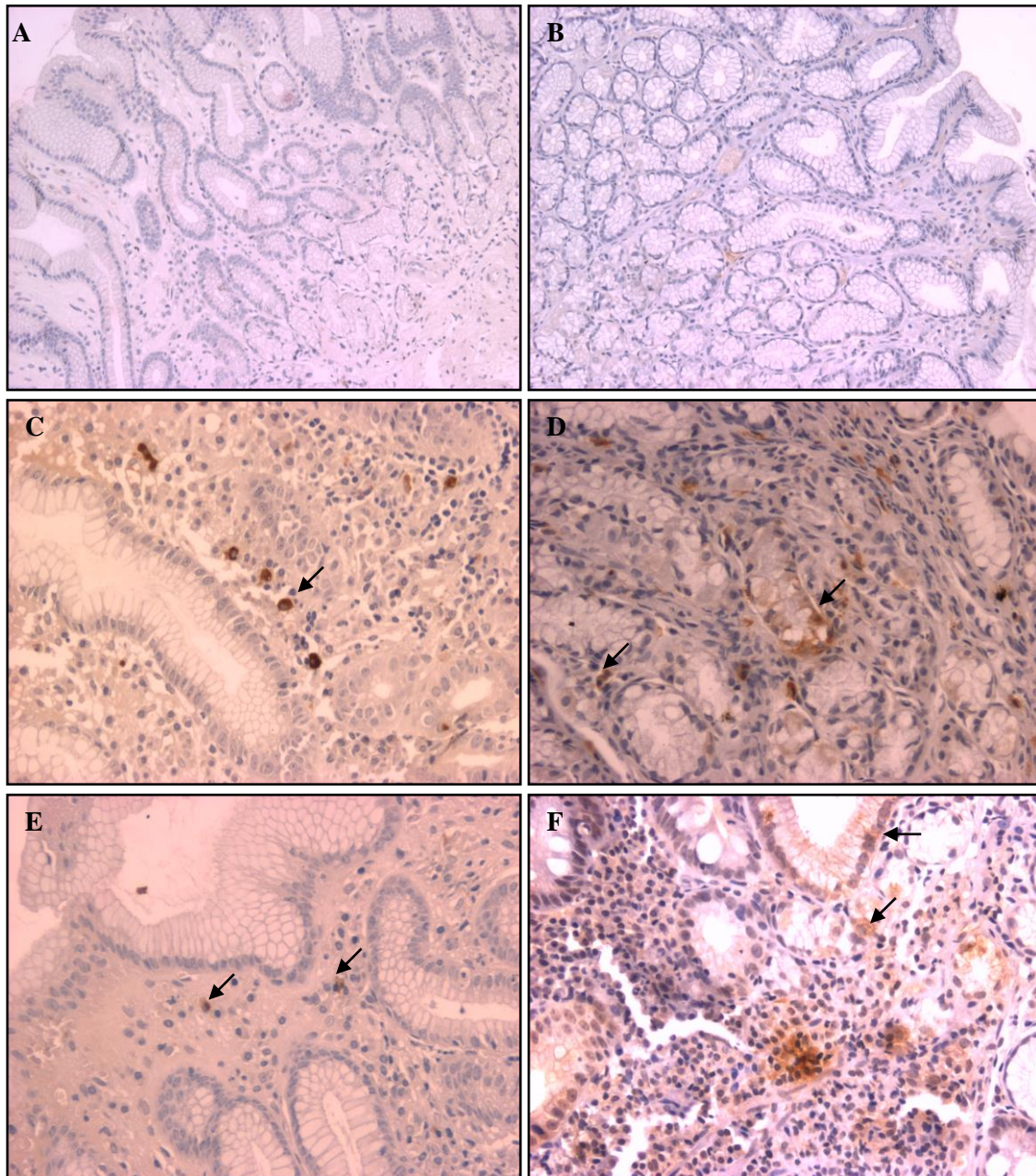
Não houve correlação entre o índice apoptótico e o índice de expressão de iNOS entre os pacientes infectados por *H. pylori* ( $r = -0,23$ ;  $p = 0,17$ ) (Gráfico 7).

A Figura 7 mostra a expressão de M30 CytoDEATH na mucosa gástrica de indivíduos normais e com CG e CGA associadas a infecção por *H. pylori*.

**Gráfico 7** – Correlação de Spearman entre o índice apoptótico e o índice de expressão de iNOS usando análise de regressão linear.







**Figura 7** - Mucosa gástrica do antro gástrico marcada pela imunoposição pelos anticorpos iNOS e M30: A) e B) Com os anticorpos iNOS e M30, respectivamente, na mucosa gástrica do antro normal (*H.p.*<sup>-</sup>) (objetiva 10x); C) e D) Com os anticorpos iNOS e M30, respectivamente, na mucosa gástrica de paciente apresentando Gastrite crônica por *H. pylori* (objetiva 20x); E) e F) Com iNOS e M30, respectivamente, na mucosa gástrica de paciente com Gastrite crônica atrófica por *H. pylori* (objetiva 20x).

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1 Estudos retrospectivos

#### 6.1.1 Avaliação da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas da via intrínseca da apoptose em crianças

A bactéria *Helicobacter pylori* é considerada o principal agente etiológico de gastrite crônica em humanos (MARSHALL & WARREN, 1984) e está envolvida na patogênese de UD e de CaG (MARSHALL *et al.*, 1988; FORMAN *et al.*, 1991; PARSONNET *et al.*, 1991; PETERSON *et al.*, 1991; BLASER & ATHERTON, 2004; DE LUCA & IAQUINTO, 2004). A infecção é adquirida na infância e persiste por toda a vida do indivíduo (BANATVALA *et al.*, 1993; BLASER, CHYOU *et al.* 1995, MALATY *et al.* 2002). Admite-se que a aquisição precoce da infecção na infância se relaciona com o aumento do risco para o desenvolvimento de CaG (BLASER, CHYOU *et al.*, 1995). Os mecanismos envolvidos nesse processo não são conhecidos, mas acredita-se que o desenvolvimento do CaG em indivíduos infectados pode ser resultado de alterações nas células epiteliais gástricas induzidas por fatores de virulência da bactéria e/ou pela resposta inflamatória do hospedeiro que pode incluir transtorno na regulação do ciclo celular (LYNCH & AXON, 1995; CAHILL *et al.*, 1996; PEEK *et al.*, 1997; ANTI *et al.*, 1998; PEEK, 2002; BLASER & ATHERTON, 2004; KIM *et al.*, 2004). Sabe-se que *H. pylori* interfere na homeostase da mucosa gástrica por promover aumento da proliferação celular e da apoptose (LYNCH *et al.*, 1994; MOSS *et al.*, 1996; PANELLA *et al.*, 1996; ABDEL-WAHAB *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1997; HIB *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1997; ANTI *et al.*, 1998; ROKKAS *et al.*, 1999; JANG & KIM, 2000; YOSHIMURA *et al.*, 2000; MOSS *et al.*, 2001; MAEDA *et al.*, 2002; PETERSSON *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2003). O aumento do processo de divisão celular pode ser crucial para a carcinogênese, uma vez que aumenta probabilidade de ocorrência de mutações no DNA das células da mucosa gástrica (HIB *et al.* 1997, EL-ZIMAITY *et al.*, 2000).

Foi bem demonstrado que, em adultos, a infecção por *H. pylori* está associada ao aumento da proliferação celular (BRENES *et al.*, 1993; LYNCH *et al.*, 1994; BECHI *et al.*, 1996; PANELLA *et al.*, 1996; ABDEL-WAHAB *et al.*, 1997; HIB *et al.* 1., 1997; PEEK *et al.*, 1997; ANTI *et al.*, 1998; CORREA & MILLER, 1998; BLASER & KIRSCHNER, 1999; ROKKAS *et al.*, 1999; JANG & KIM, 2000), porém, são poucos os trabalhos realizados em crianças (JONES *et al.*, 1997; JANAS *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2004; OZAWA *et al.*,



2005). Estudos realizados em crianças infectadas por *H. pylori*, como o nosso, podem ser de grande importância para o melhor entendimento da fase inicial da infecção (KIM *et al.*, 2004). Além disso, o estudo de pacientes pediátricos pode ser considerado como um modelo unifatorial, ou seja, sem influência de outros agentes agressores para a mucosa gástrica como cigarros, drogas e álcool, que podem interferir nos resultados dos estudos. Finalmente, seria importante entender se o risco para o desenvolvimento de CaG nos pacientes infectados por amostras mais virulentas é determinado desde a infância (BLASER, CHYOU *et al.* 1995) e se alterações da dinâmica do turnover celular desde o início da infecção poderia estar envolvida no processo (JONES *et al.* 1997, JANAS *et al.* 2000).

Em estudos anteriores do nosso grupo observamos que a proliferação celular correlacionou-se diretamente com a intensidade da inflamação e da atividade nos pacientes *H. pylori* positivos, no grupo de pacientes infectados por amostras *cagA* positivas e no grupo de pacientes com UD.

Nossos resultados anteriores e os atuais representam indicações de que a integridade da mucosa gástrica é mantida pelo balanço entre a proliferação e apoptose como já mostraram outros autores (XIA & TALLEY, 2001). Este balanço pode ser comprometido pela infecção por *H. pylori*. Segundo alguns, a infecção por *H. pylori* desencadeia a apoptose através da via intrínseca, relacionada com a ação de radicais livres. Estes estudos demonstram subexpressão de Bcl2 e/ou Bclx, proteínas anti-apoptóticas e superexpressão de Bax e Bak, proteínas pró-apoptóticas (LIU *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1997). Entretanto, outros pesquisadores relatam aumento de FAS e FAS-ligante, relacionados com a via extrínseca da apoptose, que pode ser estimulada por diversos compostos lesivos ao epitélio, além de radicais livres (BAIK *et al.*, 1996; MOSS *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 2001, SHIBAYAMA *et al.*, 2001).

Para verificar se há diferença entre a resposta de expressão das proteínas anti- e pró-apoptóticas na via intrínseca da apoptose em crianças, avaliamos a expressão dessas proteínas em crianças não infectadas e infectadas por *H. pylori* com UD e GC. Nossos resultados mostraram que a expressão de Bclx, anti-apoptótica, foi negativa ou fraca na maioria das biópsias do antro das crianças analisadas. Já a expressão de Bax, pró-apoptótica, foi maior no grupo de crianças infectadas. Este resultado está de acordo com o que foi descrito em adultos pelo nosso grupo (CABRAL, 2006) e com outros descritos na literatura para adultos (MOSS, 1998; BHATTACHARYYA *et al.* 2009;). Quanto á expressão de Bcl2, anti-apoptótica, não houve diferença significativa entre os pacientes infectados que apresentavam gastrite e

aqueles que apresentavam úlcera duodenal, e entre os pacientes não infectados em comparação com aqueles com UD e gastrite. Estes resultados estão de acordo com o que foi relatado por Chang *et al.* (2004), no qual não observaram diferença significativa de Bcl2 entre amostras de pacientes infectados por *H. pylori* que apresentavam câncer gástrico e aqueles que apresentavam gastrite.

Muitos mecanismos envolvidos no processo da apoptose estão sendo esclarecido em estudos mais modernos (BOISE *et al.*,1993; KORSMEYER, 1995; VAUX & STRASSER, 1996, ADAMS & CURY, 1998; ASHKENAZI & DIXIT, 1998; GREEN & REED, 1998; SZABÓ & TARNAWSKI, 2000, CABRAL, 2006) porém, os resultados desses ainda são controversos. (DIXON, 1994; CHEN *et al.*,1997; WAGNER, 1997; RUDI, KOLB *et al.*, 1998; RUDI, KUCK *et al.*, 1998; KONTUREK *et al.*, 1999; MOSS *et al.*, 2001; XIA & TALLEY, 2001; CABRAL, 2006). Os meios pelos quais as vias intrínseca e extrínseca da apoptose levam a ativação de caspases são pouco estudados. Segundo estudos *in vivo* e *in vitro*, a infecção por *H. pylori* induz a apoptose principalmente pela via intrínseca (CHEN *et al.*,1997; KONTUREK, BILANSKI *et al.*, 1999; MAEDA, 2002; YANG *et al.*, 2003; CABRAL, 2006). Nós demonstramos que tanto a proteína Bax quanto a Bak, pró-apoptóticas, apresentaram uma expressão aumentada na mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* principalmente naqueles infectados pela amostra cagA positiva (CABRAL, 2006). A via intrínseca da apoptose é ativada por estresse oxidativo (ADAMS & CURY, 1998; GREEN & REED, 1998; SZABÓ & TARNAWSKI, 2000), que por sua vez pode ser consequência do aumento de células polimorfonucleares induzido pela infecção por *Hp*. (MANNICK, 1996; FARINATI *et al.*, 2003).

### **6.1.2 Avaliação da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose em adultos**

No estudo **retrospectivo** realizados em adultos, avaliamos se havia uma via preferencial (extrínseca ou intrínseca) de apoptose em pacientes com GC associada a *H. pylori* em relação àqueles que desenvolvem UD e se o desenvolvimento de atrofia se relaciona com a ativação de uma via específica da apoptose. Neste estudo, nós confirmamos os resultados encontrados tanto em crianças como em adultos infectadas por *H. pylori* (CABRAL, 2006). Além disso, demonstramos que as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, da via intrínseca, foram significativamente mais expressas na mucosa gástrica de pacientes adultos com GC do que naqueles com UD. A maioria dos pacientes com UD estudados foram infectados por uma

amostra cagA-positivo, assim podemos deduzir que fatores do hospedeiro, como o ambiente gastrite e / ou pH luminal e fatores associados na dieta, podem ser responsáveis pela diminuição da expressão de Bax nos pacientes com UD. Apesar da expressão de proteínas pró-apoptóticas ser maior nos pacientes controles (*Hp*<sup>-</sup>) que naqueles com úlcera duodenal, a diferença não foi significativa.. A expressão da proteína pró-apoptótica Bak no epitélio superficial não foi diferente entre os grupos. Estudos anteriores relataram a expressão de proteínas apoptóticas na mucosa normal, principalmente no epitélio superficial, enquanto que na infecção por *H. pylori* envolve principalmente o compartimento do foveolar (MOSS *et al.*, 1996). A expressão de Bak no epitélio superficial foi mais intensa nos pacientes com UD e nos não infectados que naqueles com gastrite (p=0.04, p=0.048, respectivamente). No epitélio foveolar, a expressão de Bak foi mais intensa nos pacientes com gastrite que naqueles com UD, repetindo os mesmos resultados encontrados para a expressão de Bax, Bcl-x, proteína anti-apoptótica da via intrínseca, apresentou expressão significativamente maior nos pacientes com gastrite que naqueles com UD (p=0.04) e em relação àqueles não infectados (p=0.03). Provavelmente, a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl2 e Bcl-x pode secundária à expressão de proteínas pró-apoptóticas na tentativa de manter a homeostase na mucosa gástrica. Por outro lado, isso pode ter um papel na carcinogênese gástrica. Estes resultados são evidências indiretas do envolvimento da via intrínseca na apoptose em pacientes infectados pelo *H.pylori*.

A expressão de Bax, Bak e Bclx foi maior no epitélio foveolar dos casos de gastrite com atrofia que naqueles sem atrofia (p=0.05). A porcentagem de superfície epitelial marcada por Bcl2 foi maior nos pacientes com atrofia (p=0.03). Não houve diferença significativa na expressão desse anticorpo nos pacientes com gastrite em comparação com aqueles com UD e os não infectados. Como estas proteínas são menos expressos na mucosa gástrica de pacientes com UD, isso pode explicar porque a atrofia é rara em pacientes nessas condições. Como discutido anteriormente, outros factores do hospedeiro podem modular a apoptose nessas diferentes condições.

## 6.2 Estudo prospectivo

### 6.2.1 Índice de iNOS em pacientes infectados e não infectados por *H. pylori*

Em condições fisiológicas, a mucosa gástrica mantém sua integridade estrutural e funcional apesar de estar constantemente exposta a fatores nocivos como HCl e pepsina, os quais são capazes de gerar lesões na mucosa gástrica. Nessas condições, a integridade da mucosa gástrica é mantida pelos mecanismos de defesa, os quais incluem fatores pré-epiteliais, uma barreira epitelial (superfície das células epiteliais justapostas secretando muco, gerando bicarbonato, peptídeos e prostaglandinas), renovação contínua de células, fluxo sanguíneo contínuo através de micro-vasos da mucosa, além de barreira endotelial, geração de óxido nítrico (NO) e de mecanismos anti-oxidantes (LAINE *et al.*, 2008).

A indução da síntese de NO está no contexto das defesas do organismo contra infecções, inflamações e muitas neoplasias, contudo, dependendo das quantidades geradas, pode levar à morte celular e a danos teciduais (MONCADA *et al.*, 1991; NATHAN & XIE, 1994). Assim, o excesso na produção de NO associado com estados inflamatórios das mucosas é caracterizado pelo aumento da permeabilidade epitelial e perda da função da barreira do muco.

Existem três isoformas conhecidas da síntese de óxido nítrico sintase (NOS). Dentre elas, a forma induzida (ou inflamatória) iNOS (expressa em macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microorganismos invasores). Esta forma, iNOS, produz NO de importante papel na defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus e parasitas (MONCADA *et al.*, 1991; NATHAN & XIE, 1994). O óxido nítrico produzido pela iNOS difunde-se para fora dos macrófagos e invade a célula alvo destruindo-a, através da inibição de centros Fe-S de enzimas envolvidas na respiração celular e inibindo a replicação do DNA (WINK *et al.*, 1998).

Vários estudos têm demonstrado que a síntese elevada de iNOS em pacientes infectados por *H. Pylori* tem importante papel na carcinogênese gástrica (NAITO & YOSHIKAWA, 2002; NAITO & YOSHIKAWA, 2005). O aumento da expressão de iNOS na mucosa gástrica de pacientes com GC, associada à infecção por *H.pylori*, está estritamente relacionada à infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (FU *et al.*, 1999).

Nossos estudos também confirmaram o aumento de expressão de iNOS em pacientes infectados por *H. pylori* com GC e GCA associadas à presença desta bactéria. O grupo de pacientes não infectados ( $Hp^-$ ) mostrou índices de expressão de iNOS significativamente menores que o grupo infectado ( $Hp^+$ ). Estes resultados confirmam o que já foi descrito na literatura. CHANG *et al.* (2004) concluíram que a expressão crônica de iNOS e as conseqüentes alterações do DNA das células presentes na mucosa gástrica de pacientes com GC, associada à infecção por *H. pylori*, tem papel vital no desenvolvimento do carcinoma gástrico nestes pacientes. Além disso, o NO produzido pela mucosa gástrica inflamada pode ser um dos mecanismos de ligação entre a infecção por *H. pylori* e UD associada a essa bactéria (RACHMILEWETS *et al.*, 1994).

O índice de expressão de iNOS no grupo  $Hp^+$ , a intensidade e atividade de inflamação, não apresentaram correlação significativa, nem houve diferença entre pacientes com GC e GCA em relação ao índice de expressão de iNOS. Entretanto, em estudos onde essa comparação foi realizada com resultados provenientes da análise da concentração de NO em soro humano, a concentração de NO foi significativamente maiores em pacientes  $Hp^+$  com GC que em pacientes com GCA.

Em outros trabalhos, a alta expressão de iNOS na mucosa gástrica pode levar à identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (NAITO *et al.*, 2008). Distúrbios no balanço entre agentes oxidantes e anti-oxidantes no estômago podem levar ao aumento do risco de morte celular por apoptose ou necrose e danos ao DNA celular, produzindo assim uma ligação entre *Hp*, inflamação, apoptose, alterações do ciclo celular e instabilidade genética, fatores que atuam na base da susceptibilidade ao câncer gástrico exibido em pacientes infectados cronicamente.

### **6.2.2 Avaliação do índice apoptótico em pacientes $Hp^-$ e $Hp^+$ e sua correlação com o índice de expressão de iNOS.**

Durante a apoptose, proteínas intracelulares vitais são clivadas. As proteases que medeiam este processo são chamadas caspases. A apoptose ocorre individualmente nas células como fenômeno de auto-destruição isolado sem comprometer as células vizinhas ou provocar resposta inflamatória, uma vez que não determina a lise de organelas ou sua liberação para o interstício (RAFF, 1998). Até recentemente citoqueratinas, em particular a citoqueratina 18 (CK-18), não eram consideradas afetadas por eventos precoces da apoptose. Recentemente,

foi demonstrado que o anticorpo M30 reconhece um sítio de clivagem específico na CK18 em células em apoptose, que não é detectável na CK18 em células normais. Como consequência o anticorpo CytoDeath M30 é um instrumento único para a determinação fácil e confiável de evento apoptótico precoces em células isoladas e amostras de tecidos. Embora o método de TUNEL seja um dos métodos mais utilizados para demonstrar e quantificar a apoptose em cortes histológicos de tecido, a interpretação e especificidade dos resultados provenientes dessa técnica tem sido controversos. Imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal M30, é considerada uma alternativa promissora, uma vez que a imunoexpressão de M30 na mucosa gástrica correlaciona-se com os resultados encontrados pela análise de critérios morfológicos observados nas células em apoptose.

A resposta do hospedeiro nas infecções gástricas associada à bactéria *H. pylori* exerce influência na carcinogênese gástrica incluindo alterações na proliferação das células epiteliais e no índice apoptótico. No estudo retrospectivo discutido anteriormente e realizado em adultos  $Hp^-$  e  $Hp^+$  com ou sem GC, GCA e UD, os resultados indicaram um aumento significativo na expressão da proteína anti-apoptótica BCL2 em pacientes com GCA, em relação aos outros grupos. Entretanto, a associação entre a infecção por *H. pylori* e a proliferação celular em lesões da mucosa gástrica é um assunto ainda em discussão.

Nos resultados prospectivos que delineamos para avaliar o índice apoptótico por imunoexpressão de M30 em pacientes  $Hp^-$  e  $Hp^+$  não foi possível detectar diferença significativa no índice apoptótico em relação à presença da bactéria e entre os diferentes grupos diagnósticos. Estes resultados não confirmam o aumento do índice apoptótico em associação à infecção por *H. pylori* como os relatados em outros trabalhos.

Um aumento de moderado a acentuado de células apoptóticas tem sido relatado em GC frequentemente associada com a atrofia glandular e infecção por *H. pylori* (MOSS *et al.*, 1996; HIRASAWA *et al.*, 1999; STEININGER *et al.*, 1998), ocorrendo principalmente no epitélio foveolar e glandular, regiões em que há um aumento da colonização pela bactéria e inflamação epitelial (STEININGER *et al.*, 1998). Assim, em contraste com o sistemático aumento da proliferação celular, a infecção por *H. pylori* na mucosa gástrica está associada ora ao aumento, ora à ausência de alteração, ou mesmo com a diminuição do índice apoptótico nas análises *in vivo*.

ANTI *et al.* (1998) observaram índices apoptóticos similares em pacientes com gastrite crônica infectados ou não pela bactéria e não encontraram correlação entre o índice apoptótico com o grau de inflamação. Já WAGNER *et al.* (1997) observaram uma diminuição na atividade apoptótica seguida por um aumento da proliferação celular na presença da bactéria. Estes resultados são similares aos encontrados no desenvolvimento do nosso trabalho.

A comparação estatística entre o índice apoptótico e a intensidade da inflamação na mucosa dos pacientes *Hp*<sup>+</sup>, em nosso trabalho, mostrou que o índice apoptótico depende da intensidade de inflamação até que a inflamação atinja o grau 3 de Sydney. Estes resultados não são similares aos encontrados por ANTI *et al.* (1998), pois estes não encontraram relação entre o índice apoptótico com o grau ou intensidade de inflamação

Não encontramos correlação entre o índice apoptótico e o índice de expressão de iNOS. Este resultado é semelhante a outros já mencionados na literatura em células epiteliais (DIMMELER & ZEIHNER, 1997).

Os efeitos pró-apoptóticos do NO parecem estar mais relacionados a condições patológicas onde grande quantidades de NO são produzidas pela enzima iNOS. Em contraste, a liberação contínua de NO pelo epitélio gástrico na presença de *H. pylori* poderia inibir a apoptose.

Assim, na infecção por *H. pylori*, os mecanismos reguladores da apoptose e da proliferação celular, apesar de controversos, apontam para um papel de NO produzido via iNOS na modulação da inflamação, da apoptose e da proliferação celular compensatória, que aumentariam a chance de danos ao DNA e a carcinogênese gástrica. Estudos de longo prazo conduzido por RAJNAKOVA *et al.* (1997) mostraram que a expressão de iNOS e nitrotirosina estava aumentada no grupo que nos grupos que desenvolveram câncer gástrico em relação aos demais. Isto indica que altos níveis de espécies reativas de nitrogênio na mucosa gástrica é um fator de risco para o câncer gástrico.

Assim, os níveis de iNOS em pacientes *Hp*<sup>+</sup> poderiam indicar qual paciente teria risco para desenvolver câncer gástrico. Porém, não é possível detectar os níveis de iNOS na rotina endoscópica, a despeito de haver estudos mostrando correlação entre o padrão endoscópico de alterações epiteliais malignas e a dosagem de iNOS por RT-PCR na mucosa gástrica (NAITO *et al.*, 2008). Por este motivo a regulação da apoptose e o controle da inflamação são alvos promissores para a intervenção terapêutica na infecção por *H.pylori*.

Assim, um dos desdobramentos do nosso trabalho que não foi possível ainda realizar, objetiva dosar os íons nitrito e nitrato do suco gástrico de pacientes infectados e não infectados por *H. pylori* por cromatografia líquida em HPLC utilizando para isso Coluna Shim-pack IC-A3 aniônica com pré-coluna compatível. A quantificação seria realizada com o auxílio de um condutivímetro capaz de detectar e quantificar os íons presentes na amostra. Essas evidências indiretas da ação de iNOS produtora de NO poderiam ser utilizadas como marcadores de prognóstico para transformações malignas em pacientes de risco *Hp+*.



## 7 – CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que nas crianças a expressão de Bax e Bak proteínas pró-apoptóticas da via intrínseca está relacionada à infecção por *H.Pylori*.

Na gastrite crônica a expressão de Bax foi maior do que na UD, o que pode sinalizar para um papel determinante do fenômeno apoptótico no desenvolvimento da atrofia na fase adulta de alguns desses pacientes.

A expressão de BCL2 e BCLx, proteínas anti-apoptóticas da via intrínseca, foi fraca ou negativa em crianças infectadas e não infectadas por *H. pylori*.

Nossos resultados retrospectivos em adultos confirmam que a infecção por *H. pylori* está relacionada principalmente com a via intrínseca da apoptose.

A expressão de proteínas pró-apoptóticas, principalmente Bax, foi significativamente maior nos casos de gastrite que naqueles com UD e se relacionou com a atrofia no primeiro grupo.

A expressão das proteínas Bcl2 e Bclx, anti-apoptóticas da via intrínseca, podem ser secundárias à expressão de proteínas pró-apoptóticas na tentativa de manter a homeostase na mucosa gástrica. Por outro lado, isso pode ter um importante papel na carcinogênese gástrica.

Nossos resultados prospectivos evidenciaram que o índice apoptótico não foi diferente em pacientes infectados por Hp em comparação com os não infectados, contrariando alguns resultados da literatura. O índice apoptótico também não variou entre os grupos diagnósticos positivos para Hp (Gastrite com e sem atrofia).

A comparação entre o índice apoptótico e a intensidade da inflamação na mucosa gástrica de pacientes Hp<sup>+</sup> correlacionou-se positivamente com a atividade da inflamação nos graus I e II, mas não com o grau III de Sideny.

A expressão imunohistoquímica de iNOS (índice de expressão de iNOS) em pacientes infectados por Hp foi significativamente maior que naqueles não infectados.

Não houve diferença no índice de expressão de inos entre pacientes infectados que apresentavam gastrite com e sem atrofia, independentemente da intensidade e atividade da inflamação.

Não houve correlação entre o índice apoptótico e o índice de expressão de iNOS nos pacientes infectados com *Hp* independente do diagnóstico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Wahab, M.; Attallah, A. M., *et al.* Cellular proliferation and ploidy of the gastric mucosa: the role of *Helicobacter pylori*. **Hepatogastroenterology**, v.44, n.15, May-Jun, p.880-885. 1997.
- Adams, J. M.; Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v.281, n.5381, Aug 28, p.1322-6. 1998.
- Alican, I.; Kubes, P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. **Am J Physiol**, v.270, n.2 Pt 1, Feb, p.G225-37. 1996.
- Algood, H. M. S.; Cover, T.L. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 597-613, 2006.
- Amieva, M. R.; El-Omar, E. M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v.134, n.1, Jan, p.306-23. 2008.
- Ando, T.; Kusugami, K. *et al.* Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis. **Am J Gastroenterol**, v.91, n.6, Jun, p.1150-6. 1996.
- Ando, T. Y.; Goto, *et al.* Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v.12 (2), p. 181-186. 2006.
- Anti, M.; Armuzzi, A. *et al.* Importance of changes in epithelial cell turnover during *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis. **Gut**, v.43 Suppl 1, Jul, p.S27-32. 1998.
- Argent, R. H.; Hale, J. L. *et al.* Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. **J Med Microbiol**, v.57, n.Pt 9, Sep, p.1062-7. 2008.
- Arroyo, P. L.; Hatch-Pigott, V. *et al.* Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. **Mutat Res**, v.281, n.3, Mar, p.193-202. 1992.
- Ashe, P. C.; Berry, M. D. Apoptotic signaling cascades. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.27, n.2, Apr, p.199-214. 2003.
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v.281, n.5381, Aug 28, p.1305-8. 1998.
- Ashour, A. A.; Magalhaes, P. P. *et al.* Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.33, n.3, Jul 12, p.173-8. 2002.
- Atherton, J. C.; Blazer, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. **J Clin Invest**, v.119, n.9, Sep, p.2475-87. 2009.

Atherton, J. C. H pylori virulence factors. **Brit Med Bull**, v.54, n.1, p.105-120. 1998.

Atherton, J. C.; Cao, P. *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem**, v.270, n.30, Jul 28, p.17771-7. 1995.

Atherton, J. C.; Peek Jr R. M. *et al.* Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.112, n.1, Jan, p.92-9. 1997.

Baik S. C.; Youn H. S., *et al.* Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **Cancer Res**, v.56, p.1279-1282. 1996.

Banatvala, N.; Mayo, K. *et al.* The cohort effect and *Helicobacter pylori*. **J Infect Dis**, v.168, n.1, Jul, p.219-21. 1993.

Bayerdorffer, E.; Lehn, N. *et al.* Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. **Gastroenterology**, v.102, n.5, May, p.1575-82. 1992.

Bechi, P.; Balzi, M. *et al.* *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis. **Am J Gastroenterol**, v.91, n.2, Feb, p.271-6. 1996.

Bhattacharyya, A.; Chattopadhyay R. *et al.* Acetylation of apurinic/aprimidinic endonuclease-1 regulates *Helicobacter pylori*-mediated gastric epithelial cell apoptosis. **Gastroenterology**, v.136, n.7, Jun, p.2258-69. 2009.

Blaser, M. J.; Kirschner, D. Dynamics of *Helicobacter pylori* colonization in relation to the host response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.15, Jul 20, p.8359-64. 1999.

Blaser, M. J.; Atherton, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J Clin Invest**, v.113, n.3, Feb, p.321-33. 2004.

Blaser, M. J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **J Infect Dis**, v.161, n.4, Apr, p.626-33. 1990.

Blaser, M. J.; Perez-Perez, G. I. *et al.* Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res**, v.55, n.10, May 15, p.2111-5. 1995.

Blaser, M. J.; Chyou, P. H. *et al.* Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. **Cancer Res**, v.55, n.3, Feb 1, p.562-5. 1995.

Boise, L. H.; Gonzalez-Garcia, M. *et al.* bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. **Cell**, v.74, n.4, Aug 27, p.597-608. 1993.

Brenes, F.; Ruiz, B. *et al.* *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium: pre- and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen. **Am J**

**Gastroenterol**, v.88, n.11, Nov, p.1870-5. 1993.

Cabral, M. M. D.A.; Marino, M.; Oliveira, C. A.; Mendes, C. C.; Costa, A.C.F.; Guerra, J.; Queiroz, D. M. M.; Nogueira, A. M. M. F. Características da gastrite crônica associada à *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com *status cagA*. **J Brás atol Lab**; n.1, p. 57-65. 2006.

Cabral, M.M.D.A. Apoptosis in *Helicobacter pylori* infection is related to *cagA* status. **Helicobacter**, v. 11, n. 5, p. 469-76, 2006.

Cahill, R. J.; Xia, H.; Kilgallen, C.; Beattie, S.; Hamilton, H.; O'Morain, C. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. **Dig Dis Sci**, v.40, n.8, Aug, p.1627-31. 1995.

Cahill, R. J.; Kilgallen, C.; Beattie, S.; Hamilton, H.; O'Morain, C. Gastric epithelial cell kinetics in the progression from normal mucosa to gastric carcinoma. **Gut**, v.38, n.2, Feb, p.177-81. 1996.

Caliari, M.V. - Princípios de morfometria digital. KS300 para iniciantes. Belo Horizonte, Ed. UFMG, 1997. p. 1-149.

Campbell, S.; Fraser, A. Holliss, B.; Schmid, J.; O'Toole, P. W. Evidence for ethnic tropism of *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**, v.65, p.3708-3712. 1997.

Carneiro, F.; David, L.; Seruca, R.; Castedo, S.; Nesland, J. M.; Sobrinho-Simões, M. Hyperplastic polyposis and diffuse carcinoma of the stomach. A study of a family. **Cancer**, v.72, n.2, Jul 15, p.323-9. 1993.

Carrick, J.; Lee, A.; Hazell, S.; Ralston, M.; Daskalopoulos, G. *Campylobacter pylori*, duodenal ulcer, and gastric metaplasia: possible role of functional heterotopic tissue in ulcerogenesis. **Gut**, v.30, n.6, Jun, p.790-7. 1989.

Carvalho, A. S.; Queiroz, D. M.; Mendes, E. N.; Rocha, G. A.; Penna, F. J. Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of symptomatic children. **Braz J Med Biol Res**, v.24, n.2, p.163-6. 1991.

Censini, S.; Lange, C.; Xiang, Z.; Crabtree, J. E.; Ghiara, P.; Borodovsky, M.; Rappuoli, R.; Covacci, A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.25, Dec 10, p.14648-53. 1996.

Cervos-Navarro, J.; Schubert, T. E. Pitfalls in the evaluation of apoptosis using TUNEL. **Brain Pathol**, v.6, n.3, Jul, p.347-8. 1996.

Chang, C. S.; Chen, W. N.; Lin, H. H.; Wu, C. C.; Wang, C. J. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**, v.10, n.15, Aug 1, p.2232-40. 2004.

Chen, G.; Sordillo, E. M.; Ramey, W. G.; Reidy, J.; Holt, P. R.; Krajewski, S.; Reed,

- J.C.; Blaser, M. J.; Moss, S. F. Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK. **Biochem Biophys Res Commun**, v.239, n.2, Oct 20, p.626-32. 1997.
- Cho, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J Physiol Paris**, v.95, n.1-6, Jan-Dec, p.253-6. 2001.
- Choi, I. S.; Wu, T. T. Epigenetic alterations in gastric carcinogenesis. **Cell Res**, v.15, n.4, Apr, p.247-54. 2005.
- Correa, P.; Miller M. J. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. **Br Med Bull**, v.54, n.1, p.151-62. 1998.
- Correa, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Am J Surg Pathol**, v.19 Suppl 1, p.S37-43. 1995.
- Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res**, v.52, n.24, Dec 15, p.6735-40. 1992.
- Correa, P.; Haenszel, W.; Cuello, C.; Zavala, D.; Fontham, E.; Zarama, G.; Tannenbaum, S.; Collazos, T.; Ruiz, B. Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies. **Cancer Res**, v.50, n.15, Aug 1, p.4731-6. 1990.
- Correa, P. A. Chronic gastritis: a clinico-pathological classification. **Am J Gastroenterol**, v.83, n.5, May, p.504-9. 1988.
- Covacci, A.; Telford, J. L.; Del Giudice, G.; Parsonnet, J.; Rappuoli, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**, v.284, n.5418, May 21, p.1328-33. 1999.
- Craanen, M. E.; Blok, P.; Dekker, W.; Tytgat, G. N. *Helicobacter pylori* and early gastric cancer. **Gut**, v.35, n.10, Oct, p.1372-4. 1994.
- Craanen, M. E.; Dekker, W.; Blok, P.; Ferwerda, J.; Tytgat, G. N. Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. **Gut**, v.33, n.1, Jan, p.16-20. 1992.
- Crabtree, J. E.; Covacci, A.; Farmery, S. M.; Xiang, Z.; Tompkins, D. S.; Perry, S.; Lindley, I. J.; Rappuoli, R. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. **J Clin Pathol**, v.48, n.1, Jan, p.41-5. 1995.
- Crabtree, J. E.; Wyatt, J. I.; Trejdosiewicz, L. K.; Peichl, P.; Nichols, P. H.; Ramsay, N.; Primrose, J. N.; Lindley, I. J. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. **J Clin Pathol**, v.47, n.1, Jan, p.61-6. 1994.
- Crabtree, J. E.; Farmery, S. M.; Lindley, I. J.; Figura, N.; Peichl, P.; Tompkins, D. S. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. **J Clin Pathol**, v.47, n.10, Oct, p.945-50. 1994.

De Gusmão, V. R.; Nogueira Mendes, E.; De Magalhães Queiroz, D. M.; Aguiar Rocha, G.; Camargos Rocha, A. M.; Ramadan Ashour, A. A.; Teles Carvalho, A. S. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. **J Clin Microbiol**, v.38, n.8, Aug, p.2853-7. 2000.

De Luca, A.; Iaquinto G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. **Cancer Lett**, v.213, n.1, Sep 15, p.1-10. 2004.

Dimmeler, S.; Zeiher A. M. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v.1, n.4, Aug, p.275-81. 1997.

Dixon, M. F. Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v.201, p.7-10. 1994.

Dixon, M. F.; Genta, R. M.; Yardley, J. H.; Correa, P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol**, v.20, n.10, p.1161-1181. 1996.

Dlamini, Z.; Mbita, Z.; Zungu, M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. **Pharmacol Ther**, v.101, n.1, Jan, p.1-15. 2004.

Dorrell, N.; Crabtree, J. E.; Wren, B. W. Host-bacterial interactions and the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Trends Microbiol**, v.6, n.10, Oct, p.379-82. 1998.

Drake, I. M.; Davies, M. J.; Mapstone, N. P.; Dixon, M. F.; Schorah, C. J.; White, K. L.; Chalmers, D. M.; Axon, A. T. Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. **Carcinogenesis**, 17(3): 559-62. 1996.

Drumm, B.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J.; Sherman, P. M. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**, v.322, n.6, Feb 8, p.359-63. 1990.

Drumm, B.; Sherman, P.; Cutz, E.; Karmali, M. Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral gastritis in children. **N Engl J Med**, v.316, n.25, Jun 18, p.1557-61. 1987.

Drumm, B.; Koletzko, S.; Oderda, G. *Helicobacter pylori* infection in children: a consensus statement. European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori*. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.30, n.2, Feb, p.207-13. 2000.

Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v.102, n.1, Jul 7, p.33-42. 2000.

Eaton, K. A.; Brooks, C. L.; Morgan, D. R.; Krakowka, S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **Infect Immun**, v.59, p.2470-2475. 1991.

Eaton, K. A.; Morgan D.R.; Krakowka, S. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. **Med Microbiol**, v.37, p.123-127. 1992.

El-Omar, E. M.; Oien, K.; El-Nujumi, A.; Gillen, D.; Wirz, A.; Dahill, S.; Williams, C.; Ardill, J. E.; McColl, K. E. Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion. **Gastroenterology**, v.113, n.1, Jul, p.15-24. 1997.

El-Omar, E. M.; Carrington, M.; Chow, W. H.; McColl, K. E.; Bream, J. H.; Young, H. A.; Herrera, J.; Lissowska, J.; Yuan, C. C.; Rothman, N.; Lanyon, G.; Martin, M.; Fraumeni, J. F.; Rabkin, C. S. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v.404, n.6776, Mar 23, p.398-402. 2000.

El-Omar, E. M.; Chow, W. H.; Rabkin, C. S. Gastric cancer and H. pylori: Host genetics open the way. **Gastroenterology**, v.121, n.4, Oct, p.1002-4. 2001.

El-Zimaity, H. M.; Graham, D. Y.; Genta, R. M.; Lechago, J. Sustained increase in gastric antral epithelial cell proliferation despite cure of Helicobacter pylori infection. **Am J Gastroenterol**, v.95, n.4, Apr, p.930-5. 2000.

Ernest, P. The role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther**, v.13 (suppl 1), p.S13-S18. 1999.

Fan, X. G.; Kelleher, D.; Fan, X. J.; Xia, H. X.; Keeling, P. W. Helicobacter pylori increases proliferation of gastric epithelial cells. **Gut**, v.38, n.1, Jan, p.19-22. 1996.

Fan, X.; Crowe, S. E.; Behar, S.; Gunasena, H.; Ye, G.; Haeberle, H.; Van Houten, N.; Gourley, W. K.; Ernst, P. B.; Reyes, V. E. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. **J Exp Med**, v.187, n.10, May 18, p.1659-69. 1998.

Farinati, F.; Cardin, R.; Russo, V. M.; Busatto, G.; Franco, M.; Rugge, M. Helicobacter pylori CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? **Helicobacter**, v.8, n.3, Jun, p.227-34. 2003.

Figueiredo, C.; Machado, J. C.; Pharoah, P.; Seruca, R.; Sousa, S.; Carvalho, R.; Capelina, A.F.; Quint, W.; Caldas, C.; van Doorn, L. J.; Carneiro, F.; Sobrinho-Simões, M. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v.94, n.22, Nov 20, p.1680-7. 2002.

Fiocca, R.; Luinetti, O.; Villani, L.; Chiaravalli, A. M.; Capella, C.; Solcia, E. Epithelial cytotoxicity, immune responses, and inflammatory components of Helicobacter pylori gastritis. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v.205, p.11-21. 1994.

Forman, D.; Newell, D. G.; Fullerton, F.; Yarnell, J. W.; Stacey, A. R.; Wald, N.; Sitas, F. Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. **Bmj**, v.302, n.6788, Jun 1, p.1302-5. 1991.

Fox, J.G.; Wang, T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 60-69. 2007.



Freedberg, A. S.; Barron, L. E. The presence of spirochets in human gastric mucosa. **Am J Dig Dis**, V. 7, p. 443-5. 1940.

Frohman, M. A. Race: rapid amplification of cDNA ends. In: Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky, JJ, *et al.* (Eds.). PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic, p. 28-38. 1990.

Fu, S.; Ramanujam, K. S.; Wong, A.; Fantry, G. T.; Drachenberg, C. B.; James, S. P.; Meltzer, S. J.; Wilson, K. T. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. **Gastroenterology**, v.116, n.6, Jun, p.1319-29. 1999.

Fukumura, D.; Jain, R. K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. **Cancer Metastasis Rev**, v.17, n.1, Mar, p.77-89. 1998.

Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, v.119, n.3, Nov, p.493-501. 1992.

Genta, R. M.; Gurer, I. E.; Graham, D. Y. Geographical pathology of *Helicobacter pylori* infection: is there more than one gastritis? **Ann Med**, v.27, n.5, Oct, p.595-9. 1995.

Gillen, D.; El-Omar, E. M.; Wirz, A. A.; Ardill, J. E.; McColl, K. E. The acid response to gastrin distinguishes duodenal ulcer patients from *Helicobacter pylori*-infected healthy subjects. **Gastroenterology**, v.114, n.1, Jan, p.50-7. 1998.

Gold, B. D.; Van Doorn, L. J.; Guarner, J.; Owens, M.; Pierce-Smith, D.; Song, Q.; Hutwagner, L.; Sherman, P. M.; de Mola, O. L.; Czinn, S. J. Genotypic, clinical, and demographic characteristics of children infected with *Helicobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, v.39, n.4, Apr, p.1348-52. 2001.

Grasl-Kraupp, B.; Ruttkay-Nedecky, B.; Koudelka, H.; Bukowska, K.; Bursch, W.; Schulte-Hermann, R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. **Hepatology**, v.21, n.5, May, p.1465-8. 1995.

Green, D. R.; Reed J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v.281, n.5381, Aug 28, p.1309-12. 1998.

Hall, P. A. Assessing apoptosis: a critical survey. **Endocr Relat Cancer**, v.6, n.1, Mar, p.3-8. 1999.

Hamlet, A.; Olbe, L. The influence of *Helicobacter pylori* infection on postprandial duodenal acid load and duodenal bulb pH in humans. **Gastroenterology**, v.111, n.2, Aug, p.391-400. 1996.

Hatakeyama, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.9, Sep, p.688-94. 2004.

Hessey, S. J.; Spencer, J.; Wyatt, J. I.; Sobala, G.; Rathbone, B. J.; Axon, A. T.; Dixon,

M. F. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. **Gut**, v.31, p.134-138. 1990.

HIB, K.; Mitomi, H.; Koizumi, W.; Tanabe, S.; Saigenji, K.; Okayasu, I. Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. **Am J Clin Pathol**, v.108, n.1, Jul, p.26-34. 1997.

Hirasawa, R.; Tatsuta, M.; Iishi, H.; Yano, H.; Baba, M.; Uedo, N.; Sakai, N. Increase in apoptosis and decrease in ornithine decarboxylase activity of the gastric mucosa in patients with atrophic gastritis and gastric ulcer after successful eradication of *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterol**, v.94, n.9, Sep, p.2398-402. 1999.

Hong, S. J.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. **Trends Pharmacol Sci**, v.25, n.5, May, p.259-64. 2004.

Houghton, J.; Korah, R. M.; Condon, M. R.; Kim, K. H. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway. **Dig Dis Sci**, v.44, n.3, Mar, p.465-78. 1999.

Hsu, S. M.; Raine L.; Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v.29, n.4, Apr, p.577-80. 1981.

Hwang, I.R.; Kodama, T.; Kikuchi, S.; Sakai, K.; Peterson, L. E.; Graham, D. Y.; Yamaoka, Y. Effect os interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 beta production in *helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v.123, n.6, p. 1793-803. 2002.

Ilver, D.; Arnqvist, A.; Ogren, J.; Frick, I. M.; Kersulyte, D.; Incecik, E. T.; Berg, D. E.; Covacci, A.; Engstrand, L.; Borén, T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**, v.279, n.5349, Jan 16, p.373-7. 1998.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2009.

International Agency for Research on Cancer (IARC) / WHO. Infection with *Helicobacter pylori*: in: *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. Evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC Monography, p. 1777- 2002. 1994.

Isaacson, P. G. Lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). **Histopathology**, v.16, n.6, Jun, p.617-9. 1990.

Ishida, M.; Gomyo, Y.; Tatebe, S.; Ohfuji, S.; Ito, H. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. **Virchows Arch**, v.428, n.4-5, Jul, p.229-35. 1996.

Jaiswal M.; La Russo, N. F; Burgard L. J; Gores, G. J. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inHIBt DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. **Cancer Res**, 60(1): 184-90. 2000.

Janas, B.; Orkisz, S.; Bartel, H.; Czkwianianc, E.; Płaneta-Matecka, I.; Suski, S. Proliferative activity of gastric epithelial cells in Helicobacter pylori infected children. **Folia Histochem Cytobiol**, v.38, n.2, p.91-6. 2000.

Jang, S. H.; Lim, J. W.; Kim, H. Beta-carotene inHIBts Helicobacter pylori-induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in human gastric epithelial AGS cells. **J Physiol Pharmacol**, v.60 Suppl 7, Dec, p.131-7. 2009.

Jang, T. J.; Kim, J. R. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with Helicobacter pylori. **J Gastroenterol**, v.35, n.4, p.265-71. 2000.

Jiang, Q.; Hiratsuka, K.; Taylor, D. E. Variability of gene order in different Helicobacter pylori strains contributes to genome diversity. **Mol Microbiol**, v.20, n.4, May, p.833-42. 1996.

Jones, N. L.; Day, A. S.; Jennings, H. A.; Sherman, P. M. Helicobacter pylori induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. **Infect Immun**, v.67, n.8, Aug, p.4237-42. 1999.

Jones, N. L.; Shannon, P. T.; Cutz, E.; Yeger, H.; Sherman, P. M. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of Helicobacter pylori infection. **Am J Pathol**, v.151, n.6, Dec, p.1695-703. 1997.

Joza, N.; Susin, S. A.; Daugas, E.; Stanford, WL.; Cho, S. K.; Li, C. Y.; Sasaki, T.; Elia, A. J.; Cheng, H. Y.; Ravagnan, L.; Ferri, K. F.; Zamzami, N.; Wakeham, A.; Hakem, R.; Yoshida, H.; Kong, Y. Y.; Mak, T. W.; Zúñiga-Pflücker, J. C.; Kroemer, G.; Penninger, J. M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v.410, n.6828, Mar 29, p.549-54. 2001.

Kanwar, S.; Wallace, J. L.; Befus, D.; Kubes, P. Nitric oxide synthesis inHIBtion increases epithelial permeability via mast cells. **Am J Physiol**, v.266, n.2 Pt 1, Feb, p.G222-9. 1994

Kanyama, Y.; HIB, K.; Nakayama, H.; Kodera, Y.; Ito, K.; Akiyama, S.; Nakao, A. Detection of p16 promoter hypermethylation in serum of gastric cancer patients. **Cancer Sci**, v.94, n.5, May, p.418-20. 2003.

Kato, S.; Sherman. P. M. What is new related to Helicobacter pylori infection in children and teenagers? **Arch Pediatr Adolesc Med**, v.159, n.5, May, p.415-21. 2005.

Kelly, S. M.; Pitcher, M. C.; Farmery, S. M.; Gibson, G. R. Isolation of Helicobacter pylori from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterology**, v.107, n.6, Dec, p.1671-4. 1994.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, Aug, p.239-57. 1972.

Khulusi, S.; Badve, S.; Patel, P.; Lloyd, R.; Marrero, J. M.; Finlayson, C.; Mendall, M. A.; Northfield, T. C. Pathogenesis of gastric metaplasia of the human duodenum: role of *Helicobacter pylori*, gastric acid, and ulceration. **Gastroenterology**, v.110, n.2, Feb, p.452-8. 1996.

Kim, H. Oxidative stress in *Helicobacter pylori*-induced promotion of gastric carcinogenesis in rats. **Inflammopharmacology**, v.13, p.63-74. 2005.

Kim, K. M.; Oh, Y. L.; Ko, J. S.; Choe, Y. H.; Seo, J. K. Histopathology and expression of Ki-67 and cyclooxygenase-2 in childhood *Helicobacter pylori* gastritis. **J Gastroenterol**, v.39, n.3, p.231-7. 2004.

Kodaira, M. S.; Escobar, A. M. U.; Grisi, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n.3, p. 356-369, 2002.

Kolb, H.; Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunol Today**, v.13, n.5, May, p.157-60. 1992.

Komoto, K.; Haruma, K.; Kamada, T.; Tanaka, S.; Yoshihara, M.; Sumii, K.; Kajiyama, G.; Talley, N. J. *Helicobacter pylori* infection and gastric neoplasia: correlations with histological gastritis and tumor histology. **Am J Gastroenterol**, v.93, n.8, Aug, p.1271-6. 1998.

Konturek, P. C.; Pierzchalski, P.; Konturek, S. J.; Meixner, H.; Faller, G.; Kirchner, T.; Hahn, E. G. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans. **Scand J Gastroenterol**, v.34, n.4, Apr, p.375-83. 1999.

Konturek, P. C.; Bielanski, W.; Konturek, S. J.; Hahn, E. G. *Helicobacter pylori* associated gastric pathology. **J Physiol Pharmacol**, v.50, n.5, Dec, p.695-710. 1999.

Korsmeyer, S. J. Regulators of cell death. **Trends Genet**, v.11, n.3, Mar, p.101-5. 1995.

Krajewski, S.; Krajewska M; Reed, J. C. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns on Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. **Cancer Res**; 56:2849-55. 1996.

Kristjansson, G.; Hogman, M.; Venge, P.; Hällgren, R. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. **Gut**, v.54, n.6, Jun, p.769-74. 2005.

Kuipers, E. J.; Uytterlinde, A. M.; Peña, A. S.; Roosendaal, R.; Pals, G.; Nelis, G. F.; Festen, H. P.; Meuwissen, S. G. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. **Lancet**, v.345, p.1525-1528. 1995.

Kuipers, E. J.; Thijs, J. C.; Festen, H. P. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v.9 Suppl 2, p.59-69. 1995.

Kusters, J. G.; Van Vliet, A. H.; Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.3, Jul, p.449-90. 2006.

Labat-Moleur, F.; Guillermet, C.; Lorimier, P.; Robert, C.; Lantuejoul, S.; Brambilla, E.; Negoescu, A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. **J Histochem Cytochem**, v.46, n.3, Mar, p.327-34. 1998.

Ladeira, M. S.; Rodrigues, M. A.; Salvadori, D. M.; Neto, P. P.; Achilles, P.; Lerco, M. M.; Rodrigues, P. A.; Gonçalves, I. Jr.; Queiroz, D. M.; Freire-Maia, D. V. Relationships between *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* and DNA damage in the gastric mucosa. **Environ Mol Mutagen**, v.44, n.2, p.91-8. 2004.

Laine, L.; Takeuchi, K.; Tarnawski, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v.135, n.1, Jul, p.41-60. 2008.

Lauren, P. Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v.180, p.160-4. 1991.

Lauren, P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v.64, p.31-49. 1965.

Laval, F.; Wink, D. A. InHIBtion by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. **Carcinogenesis**, v.15, n.3, Mar, p.443-7. 1994.

Lee A.; Hazell, A. S. *Campylobacter pylori* in health and disease: an ecological perspective. **Micro Ecol Health Dis**, v. 1, p. 1-16. 1988.

Lee, K. M.; Lee, D. S.; Yang, J. M.; Ahn, B. M.; Lee, E. H.; Yoo, J. Y.; Kim, Y. J.; Chung, I. S.; Sun, H. S.; Park, D. H. [Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell kinetics and expression of apoptosis-related proteins in gastric carcinogenesis]. **Korean J Gastroenterol**, v.42, n.1, Jul, p.12-9. 2003.

Lejeune, P.; Lagadec, P.; Onier, N.; Pinard, D.; Ohshima, H.; Jeannin, J. F. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. **J Immunol**, v.152, n.10, May 15, p.5077-83. 1994.

Li, L. G.; Xu, H. M. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in gastric adenocarcinomas and their correlation with a poor survival. **World J Gastroenterol**, v.11, n.17. 2005.

Lin, M. T.; Juan, C. Y.; Chang, K. J.; Chen, W. J.; Kuo, M. L. IL-6 inHIBts apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene *mcl-1*. **Carcinogenesis**; 22:1947-53. 2001.

Linz, B.; Balloux F.; Moodley, Y.; Manica, A.; Liu, H.; Roumagnac, P.; Falush, D.; Stamer, C.; Prugnolle, F.; Van der Merwe, S.W.; Yamaoka, Y.; Graham, D. Y.; Perez-Trallero, E.; Wadstrom, T.; Suerbaum, S.; Achtman, M. An African origin for the intimate

association between humans and *Helicobacter pylori*. **Nature**, v.445, n.7130, Feb 22, p.915-8. 2007.

Liu, R. H.; Hotchkiss, J. H. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. **Mutat Res**, v.339, n.2, Jun, p.73-89. 1995.

Liu, X.; Kim, C. N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v.86, n.1, Jul 12, p.147-57. 1996.

Luzza, F.; Oderda, G.; Maletta, M.; Imeneo, M.; Mesuraca, L.; Chioboli, E.; Lerro, P.; Guandalini, S.; Pallone, F. Salivary immunoglobulin G assay to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children. **J Clin Microbiol**, v.35, n.12, Dec, p.3358-60. 1997.

Luzza, F.; Maletta, M.; Imeneo, M.; Fabiano, E.; Doldo, P.; Biancone, L.; Pallone, F. Evidence against an increased risk of *Helicobacter pylori* infection in dentists: a serological and salivary study. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.7, n.8, Aug, p.773-6. 1995.

Lynch, D. A.; Axon A. T. *Helicobacter pylori*, gastric cancer and gastric epithelial kinetics: a review. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.7 Suppl 1, Aug, p.S17-23. 1995.

Lynch, D. A.; Clarke, A. M.; Jackson, P.; Axon, A. T.; Dixon, M. F.; Quirke, P. Comparison of labelling by bromodeoxyuridine, MIB-1, and proliferating cell nuclear antigen in gastric mucosal biopsy specimens. **J Clin Pathol**, v.47, n.2, Feb, p.122-5. 1994.

Lynch, D. A.; Mapstone, N. P.; Clarke, A. M.; Sobala, G. M.; Jackson, P.; Morrison, L.; Dixon, M. F.; Quirke, P.; Axon, A. T. Cell proliferation in *Helicobacter pylori* associated gastritis and the effect of eradication therapy. **Gut**, v.36, n.3, Mar, p.346-50. 1995.

Lynch, H. T.; Grady, W.; Suriano, G.; Huntsman, D. Gastric cancer: new genetic developments. **J Surg Oncol**, v.90, n.3, Jun 1, p.114-33; discussion 133. 2005.

Macarthur, C.; Saunders, N.; Feldman, W. *Helicobacter pylori*, gastroduodenal disease, and recurrent abdominal pain in children. **Jama**, v.273, n.9, Mar 1, p.729-34. 1995.

Machado, J. C.; Figueiredo, C.; Canedo, P.; Pharoah, P.; Carvalho, R.; Nabais, S.; Castro Alves, C.; Campos, M. L.; Van Doorn, L. J.; Caldas, C.; Seruca, R.; Carneiro, F.; Sobrinho-Simões, M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. **Gastroenterology**, v.125, n.2, Aug, p.364-71. 2003.

Maeda, S.; Yoshida, H.; Mitsuno, Y.; Hirata, Y.; Ogura, K.; Shiratori, Y.; Omata, M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. **Mol Pathol**, v.55, n.5, Oct, p.286-93. 2002.

Malaty, H. M.; Graham, D. Y. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v.35, n.6, Jun, p.742-5. 1994.

Malaty, H. M.; El-Kasabany, A.; Graham, D. Y.; Miller, C. C.; Reddy, S. G.; Srinivasan, S. R.; Yamaoka, Y.; Berenson, G. S. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. **Lancet**, v.359, n.9310, Mar 16, p.931-5. 2002.

Malaty, H. M.; Evans, D. G.; Evans, D. J. Jr.; Graham, D. Y. *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. **Gastroenterology**, v.103, n.3, Sep, p.813-6. 1992.

Malaty, H.M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 21, n. 2, p. 205-214, 2007.

Mannick, E. E.; Bravo, L. E.; Zarama, G.; Realpe, J. L.; Zhang, X. J.; Ruiz, B.; Fonham, E. T.; Mera, R.; Miller, M. J.; Correa, P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. **Cancer Res**, v.56, n.14, Jul 15, p.3238-43. 1996.

Marshall, B. J.; Warren, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.1, n.8390, Jun 16, p.1311-5. 1984.

Marshall, B. J.; Goodwin, C. S.; Warren, J. R.; Murray, R.; Blincow, E. D.; Blackbourn, S. J.; Phillips, M.; Waters, T. E.; Sanderson, C. R. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. **Lancet**, v.2, n.8626-8627, Dec 24-31, p.1437-42. 1988.

Meining, A.; Bayerdorffer, E.; Müller, P.; Miehke, S.; Lehn, N.; Hölzel, D.; Hatz, R.; Stolte, M. Gastric carcinoma risk index in patients infected with *Helicobacter pylori*. **Virchows Arch**, v.432, n.4, Apr, p.311-4. 1998.

Mertz, H. R.; Walsh, J. H. Peptic ulcer pathophysiology. **Med Clin North Am**, v.75, n.4, Jul, p.799-814. 1991.

Misiewicz, J. J. The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. **J Gastroenterol Hepatol**, v.6, n.3, May-Jun, p.207-8. 1991.

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.43, n.2, Jun, p.109-42. 1991.

Moran, A. P. Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. **Scand J Gastroenterol**, v.215, p.22-31. 1996.

Moss, S. F. *Helicobacter pylori* and apoptosis. **Yale J Biol Med**, v.71, n.2, Mar-Apr, p.53-61. 1998.

Moss, S. F.; Sordillo, E. M.; Abdalla, A. M.; Makarov, V.; Hanzely, Z.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J.; Holt, P. R. Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with *cagA* + *Helicobacter pylori* strains. **Cancer Res**, v.61, n.4, Feb 15, p.1406-11. 2001.

Moss, S. F.; Calam, J.; Agarwal, B.; Wang, S.; Holt, P. R. Induction of gastric epithelial

apoptosis by *Helicobacter pylori*. **Gut**, v.38, n.4, Apr, p.498-501. 1996.

Mullis, K. B.; Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v.155, p.335-50. 1987.

Naito, Y.; Yoshikawa, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v.33, n.3, Aug 1, p.323-36. 2002.

Naito, Y.; T. Yoshikawa. Carcinogenesis and chemoprevention in gastric cancer associated with *Helicobacter pylori* infection. **J Clin. Biochem Natr**, v.36, p.37-49. 2005.

Naito, Y.; Takagi, T.; Okada, H.; Nukigi, Y.; Uchiyama, K.; Kuroda, M.; Handa, O.; Kokura, S.; Yagi, N.; Kato, Y.; Osawa, T.; Yoshikawa, T. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide-modified proteins in *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastric mucosa. **J Gastroenterol Hepatol**, v.23 Suppl 2, Dec, p.S250-7. 2008.

Nakajima, N.; Kuwayama, H.; Ito, Y.; Iwasaki, A.; Arakawa, Y. *Helicobacter pylori*, neutrophils, interleukins, and gastric epithelial proliferation. **J Clin Gastroenterol**, v.25 Suppl 1, p.S198-202. 1997.

Nardone, G.; Staiban, S.; Rocco, A.; Mezza, E.; D'armiento, F. P.; Insabato, L.; Coppola, A.; Salvatore, G.; Lucariello, A.; Figura, N.; De Rosa, G.; Budillon, G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. **Gut**, v.44, n.6, Jun, p.789-99. 1999.

Nathan, C.C.; Xie, Q. Nitric Oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, p. 915-918, 1994.

Naumann, M.; Crabtree J. E. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. **Trends Microbiol**, v.12, n.1, Jan, p.29-36. 2004.

Nogueira, C.; Figueiredo, C.; Carneiro, F.; Gomes, A. T.; Barreira, R.; Figueira, P.; Salgado, C.; Belo, L.; Peixoto, A.; Bravo, J. C.; Bravo, L. E.; Realpe, J. L.; Plaisier, A. P.; Quint, W. G.; Ruiz, B.; Correa, P.; van Doorn. L. J. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. **Am J Pathol**, v.158, n.2, Feb, p.647-54. 2001.

Nomura, A.; Stemmermann, G. N.; Chyou, P. H.; Kato, I.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **N Engl J Med**, v.325, n.16, Oct 17, p.1132-6. 1991.

Osorio, J. F.; Nogueira, M. F.. Carcinoma gástrico difuso em pacientes idosos: carcinogênese comum com o tipo intestinal? **Revista Med Minas Gerais**1, v. 12, p.129-134. 2001.

Ozawa, K.; Kato, S.; Sekine, H.; Koike, T.; Minoura, T.; Iinuma, K.; Nagura, H. Gastric epithelial cell turnover and mucosal protection in Japanese children with *Helicobacter pylori* infection. **J Gastroenterol**, v.40, n.3, Mar, p.236-46. 2005.



Pacheco, C. M.; Queiroz, C. M. Jr.; Maltos, K. L.; Caliari, M. V.; Rocha, O. A.; Francischi, J. N. Local opioids in a model of periodontal disease in rats. **Arch Oral Biol**, Jul;52(7):677-83. 2007.

Panella, C.; Ierardi, E.; Polimeno, L.; Balzano, T.; Ingrosso, M.; Amoroso, A.; Traversa, A.; Francavilla, A. Proliferative activity of gastric epithelium in progressive stages of *Helicobacter pylori* infection. **Dig Dis Sci**, v.41, n.6, Jun, p.1132-8. 1996.

Parsonnet, J.; Friedman, G. D.; Vandersteen, D. P.; Chang, Y.; Vogelman, J. H.; Orentreich, N.; Sibley, R. K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v.325, n.16, Oct 17, p.1127-31. 1991.

Parsonnet, J.; Friedman, G. D.; Orentreich, N.; Vogelman, H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v.40, n.3, Mar, p.297-301. 1997.

Peek, R. M. Jr. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. **J Gastroenterol**, v.37 Suppl 13, p.10-6. 2002.

Peek, R. M., Jr.; Miller, G. G.; Tham, K. T.; Perez-Perez, G. I.; Zhao, X.; Atherton, J. C.; Blaser, M. J. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. **Lab Invest**, v.73, n.6, Dec, p.760-70. 1995.

Peek, R. M., Jr.; Blaser, M. J.; Mays, D. J.; Forsyth, M. H.; Cover, T. L.; Song, S. Y.; Krishna, U.; Pietenpol, J. A. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. **Cancer Res**, v.59, n.24, Dec 15, p.6124-31. 1999.

Peek, R. M., Jr.; Moss, S. F.; Tham, K. T.; Pérez-Pérez, G. I.; Wang, S.; Miller, G. G.; Atherton, J. C.; Holt, P. R.; Blaser, M. J. *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. **J Natl Cancer Inst**, v.89, n.12, Jun 18, p.863-8. 1997.

Peterson, W. L. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. **N Engl J Med**, v.324, p.1043-1048. 1991.

Petersson, F.; Borch, K.; Franzén, L. E. Gastric epithelial proliferation and p53 and p21 expression in a general population sample: relations to age, sex, and mucosal changes associated with *H. pylori* infection. **Dig Dis Sci**, v.47, n.7, Jul, p.1558-66. 2002.

Pinho, J. M.; Cardoso, F. C.; Lopes, D. O.; Pinheiro, C. S.; Caliari, M. V.; Oliveira, F. M.; Leite, L. C.; Oliveira, S. C. Immunization with SmIg, a novel tegument protein from *Schistosoma mansoni*, fails to induce protection in mice but reduces liver pathology. **Parasitology**. Jun;137(7):1079-88. Epub 2009 Oct 16. 2010.

Post, P. N.; Kuipers, E. J.; Meijer, G. A. Declining incidence of peptic ulcer but not of its complications: a nation-wide study in The Netherlands. **Aliment Pharmacol Ther**, v.23, n.11, Jun 1, p.1587-93. 2006.

Price, A. B. The Sydney System: histological division. **J Gastroenterol Hepatol**, v.6, n.3, May-Jun, p.209-22. 1991.

Queiroz, D. M.; Mendes E. N.; Rocha, G. A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, v.25, n.12, Dec, p.2378-9. 1987.

Queiroz, D. M., Mendes, E. N.; Rocha, G. A.; Oliveira, A. M.; Oliveira, C. A.; Magalhães, P. P.; Moura, S. B.; Cabral, M. M.; Nogueira, A. M. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int J Cancer**, v.78, n.2, Oct 5, p.135-9. 1998.

Queiroz, D. M.; Mendes, E. N.; Rocha, G. A.; Oliveira, A. M.; Oliveira, C. A.; Cabral, M. M.; Nogueira, A. M.; Souza, A. F. Serological and direct diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric carcinoma: a case-control study. **J Med Microbiol**, v.48, n.5, May, p.501-6. 1999.

Queiroz, D. M.; Rocha, G. A.; Mendes, E.; Carvalho, A. S. T. *et al.* Differences in distribution and severity of *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults with duodenal ulcer disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.12, n.2, Feb, p.178-81. 1991.

Rachmilewets, D.; Karmile F.; Eliakim, R.; Stalnikowicz, R.; Ackerman, Z.; Amir, G.; Stamler, J. S. Enhanced gastric nitric oxide synthase activity in duodenal ulcer patients. **Gut**, v.35, p.1394-7. 1994.

Raff, M. Cell suicide for beginners. **Nature**, v.396, n.6707, Nov 12, p.119-22. 1998.

Rajnakova, A.; Goh, P. M.; Chan, S. T.; Ngoi, S. S.; Alponat, A.; Mochhala, S. Expression of differential nitric oxide synthase isoforms in human normal gastric mucosa and gastric cancer tissue. **Carcinogenesis** Sep;18(9):1841-5. 1997.

Rocha, G. A.; Queiroz D. M.; Mendes, E. N.; Lage, A. P.; Barbosa, A. J. Simple carbolfuchsin staining for showing *C pylori* and other spiral bacteria in gastric mucosa. **J Clin Pathol**, v.42, n.9, Sep, p.1004-5. 1989.

Rocha, G. A.; Queiroz, D. M.; Mendes, E. N.; Barbosa, A. J.; Lima Júnior, G. F.; Oliveira, C. A. *Helicobacter pylori* acute gastritis: histological, endoscopical, clinical, and therapeutic features. **Am J Gastroenterol**, v.86, n.11, Nov, p.1592-5. 1991.

Rocha, G. A.; Guerra, J. B.; Rocha, A. M.; Saraiva, I. E.; da Silva, D. A.; de Oliveira, C. A.; Queiroz, D. M. IL1RN polymorphic gene and *cagA*-positive status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. **Int J Cancer**, v.115, n.5, Jul 10, p.678-83. 2005.

Rodrigues, L. G. M.; Nogueira, A. M. M. F. *et al.* Metaplasia Intestinal e carcinoma gástrico; correlação com subtipos histológicos da neoplasia. **J Br Patol**, v.37, n.4, p.279-286. 2001.

Rodrigues, M. N.; Queiroz, D. M.; Bezerra Filho, J. G.; Pontes, L. K.; Rodrigues, R. T.; Braga, L. L. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. **Eur J Gastroenterol**

**Hepatol**, v.16, n.2, Feb, p.201-5. 2004.

Rokkas, T.; Ladas, S.; Liatsos, C.; Petridou, E.; Papatheodorou, G.; Theocharis, S.; Karameris, A.; Raptis, S. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. **Dig Dis Sci**, v.44, n.3, Mar, p.487-93. 1999.

Rudi, J.; Kolb, C.; Maiwald, M.; Kuck, D.; Sieg, A.; Galle, P. R.; Stremmel, W. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. **J Clin Microbiol**, v.36, n.4, Apr, p.944-8. 1998.

Rudi, J.; Kuck, D.; Strand, S.; Von Herbay, A.; Mariani, S. M.; Krammer, P. H.; Galle, P. R.; Stremmel, W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. **J Clin Invest**, v.102, n.8, Oct 15, p.1506-14. 1998.

Saraste, A.; Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v.45, n.3, Feb, p.528-37. 2000.

Satoh, K.; Kimura, K.; Yoshida, Y.; Kasano, T.; Kihira, K.; Taniguchi, Y. A topographical relationship between *Helicobacter pylori* and gastritis: quantitative assessment of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. **Am J Gastroenterol**, v.86, n.3, Mar, p.285-91. 1991.

Scotiniotis, I. A.; Rokkas, T.; Furth, E. E.; Rigas, B.; Shiff, S. J. Altered gastric epithelial cell kinetics in *Helicobacter pylori*-associated intestinal metaplasia: implications for gastric carcinogenesis. **Int J Cancer**, v.85, n.2, Jan 15, p.192-200. 2000.

Shah, V.; Lyford, G.; Gores, G.; Farrugia, G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v.126, n.3, Mar, p.903-13. 2004.

Shibayama, K.; Doi, Y.; Shibata, N.; Yagi, T.; Nada, T.; Inuma, Y.; Arakawa, Y. Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions. **Infect Immun**, v.69, n.5, May, p.3181-9. 2001.

Shiotani, A.; Iishi, H.; Ishiguro, S.; Tatsuta, M.; Nakae, Y.; Merchant, J. L. Epithelial cell turnover in relation to ongoing damage of the gastric mucosa in patients with early gastric cancer: increase of cell proliferation in paramalignant lesions. **J Gastroenterol**, v.40, n.4, Apr, p.337-44. 2005.

Sipponen, P.; Kimura, K. Intestinal metaplasia, atrophic gastritis and stomach cancer: trends over time. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.6 Suppl 1, Dec, p.S79-83. 1994.

Smoot, D. T. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. **Gastroenterology**, v.113, n.6 Suppl, Dec, p.S31-4; discussion S50. 1997.

Smoot, D. T.; Elliott, T. B.; Verspaget, H. W.; Jones, D.; Allen, C. R.; Vernon, K. G.; Bremner, T.; Kidd, L. C.; Kim, K. S.; Groupman, J. D.; Ashktorab, H. Influence of

*Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. **Carcinogenesis**, v.21, n.11, Nov, p.2091-5. 2000.

Sobala G. M.; Pignate, B.; Schorah, C. ; Bartsch, H.; Sanderson, M.; Dixon, M. F.; Shires, S.; King, R. F.; Axon, A. T. Levels of nitrite, nitrate, *N*-nitroso compounds, ascorbic acid and total bile acids in gastric juice of patients with and without precancerous conditions of the stomach. **Carcinogenesis**, 12:193-198, 1991.

Solcia, E.; Fiocca, R.; Luinetti, O.; Villani, L.; Padovan, L.; Calistri, D.; Ranzani, G. N.; Chiaravalli, A.; Capella, C. Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. **Am J Surg Pathol**, v.20 Suppl 1, p.S8-22. 1996.

Sozzi, M.; Valentini, M.; Figura, N.; De Paoli, P.; Tedeschi, R. M.; Gloghini, A.; Serraino, D.; Poletti, M.; Carbone, A. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* infection: the role of CagA status. **Am J Gastroenterol**, v.93, n.3, Mar, p.375-9. 1998.

Stein, M.; Rappuoli, R.; Covacci, A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.3, Feb 1, p.1263-8. 2000.

Steininger, H.; Faller, G.; Dewald, E.; Brabletz, T.; Jung, A.; Kirchner, T. Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies. **Virchows Arch**, v.433, n.1, Jul, p.13-8. 1998.

Suerbaum, S.; Michetti, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**, v.347, n.15, Oct 10, p.1175-86. 2002.

Suzuki, H.; Ishii, H. Role of apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric mucosal injury. **J Gastroenterol Hepatol**, v.15 Suppl, Mar, p.D46-54. 2000.

Szabo, I.; Tarnawski, A. S. Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications. **J Physiol Pharmacol**, v.51, n.1, Mar, p.3-15. 2000.

Tahara, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. **IARC Sci Publ**, n.157, p.327-49. 2004.

Terres, A. M.; Pajares, J. M.; O'Toole, D.; Ahern, S.; Kelleher, D. H *pylori* infection is associated with downregulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell adhesion and proliferation control. **J Clin Pathol**, v.51, n.5, May, p.410-2. 1998.

Thomas, J. E.; Gibson, G. R.; Darboe, M. K.; Dale, A.; Weaver, L. T. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **Lancet**, v.340, n.8829, Nov 14, p.1194-5. 1992.

Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v.267, n.5203, Mar 10, p.1456-62. 1995.

Thomsen, L. L.; Gavin, J. B.; Tasman-Jones, C. Relation of *Helicobacter pylori* to the human gastric mucosa in chronic gastritis of the antrum. **Gut**, v.31, n.11, Nov, p.1230-6.

1990.

Tytgat, G. N. The Sydney System: endoscopic division. Endoscopic appearances in gastritis/duodenitis. **J Gastroenterol Hepatol**, v.6, n.3, May-Jun, p.223-34. 1991.

Uchida, M.; Matsueda, K.; Shoda, R.; Muraoka, A.; Yamato, S. Nitric oxide donating compounds in HIBt HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. **Jpn J Pharmacol**, v.85, n.2, Feb, p.133-8. 2001.

Valen, G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability. **Ann Thorac Surg**, v.75, n.2, Feb, p.S656-60. 2003.

Van Doorn, O. J.; Bosman, D. K.; Van't Hoff, B. W.; Taminiou, J. A.; Ten Kate, F. J.; Van der Ende, A. Helicobacter pylori Stool Antigen test: a reliable non-invasive test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in children. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.13, n.9, Sep, p.1061-5. 2001.

Van Grieken, N. C.; Meijer, G. A.; Zur Hausen, A.; Meuwissen, S. G.; Baak, J. P.; Kuipers, E. J. Increased apoptosis in gastric mucosa adjacent to intestinal metaplasia. **J Clin Pathol**, v.56, n.5, May, p.358-61. 2003.

Vaux, D. L.; Strasser, A. The molecular biology of apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.6, Mar 19, p.2239-44. 1996.

Von Herbay, A.; Rudi, J. Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. **Microsc Res Tech**, v.48, n.5, Mar 1, p.303-11. 2000.

Wagner, S.; Beil, W.; Westermann, J.; Logan, R. P.; Bock, C. T.; Trautwein, C.; Bleck, J. S.; Manns, M. P. Regulation of gastric epithelial cell growth by Helicobacter pylori: offence for a major role of apoptosis. **Gastroenterology**, v.113, n.6, Dec, p.1836-47. 1997.

Walker, M. M.; Crabtree, J. E. Helicobacter pylori infection and the pathogenesis of duodenal ulceration. **Ann N Y Acad Sci**, v.859, Nov 17, p.96-111. 1998.

Warren, J. R.; Marshall, B. J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**. V. 2, P. 1273-5. 1983.

Wink, D. A.; Vodovotz, Y.; Laval, J.; Laval, F.; Dewhirst, M. W.; Mitchell, J. B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v.19, n.5, May, p.711-21. 1998.

Wyllie, A. H.; Kerr, J. F.; Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v.68, p.251-306. 1980.

Xia, H. H.; Talley, N. J. Apoptosis in gastric epithelium induced by helicobacter pylori infection: implications in gastric carcinogenesis. **Am J Gastroenterol**, v.96, n.1, Jan, p.16-26. 2001.

Yamasaki, E.; Wada, A.; Kumatori, A.; Nakagawa, I.; Funao, J.; Nakayama,

M.; Hisatsune, J.; Kimura, M.; Moss, J.; Hirayama, T. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. **J Biol Chem**, v.281, n.16, Apr 21, p.11250-9. 2006.

Yang, Y.; Deng, C. S.; Peng, J. Z.; Wong, B. C.; Lam, S. K.; Xia, H. H. Effect of Helicobacter pylori on apoptosis and apoptosis related genes in gastric cancer cells. **Mol Pathol**, v.56, n.1, Feb, p.19-24. 2003.

Yeung, C. K.; Fu, K. H.; Yuen, K. Y.; Ng, W. F.; Tsang, T. M.; Branicki, F. J.; Saing, H. Helicobacter pylori and associated duodenal ulcer. **Arch Dis Child**, v.65, n.11, Nov, p.1212-6. 1990.

Yoshimura, T.; Shimoyama, T.; Tanaka, M.; Sasaki, Y.; Fukuda, S.; Munakata, A. Gastric mucosal inflammation and epithelial cell turnover are associated with gastric cancer in patients with Helicobacter pylori infection. **J Clin Pathol**, v.53, n.7, Jul, p.532-6. 2000.

Yu, J.; Leung, W. K.; Go, M. Y.; Chan, M. C.; To, K. F.; Ng, E. K.; Chan, F. K.; Ling, T. K.; Chung, S. C.; Sung, J. J. Relationship between Helicobacter pylori babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. **Gut**, v.51, n.4, Oct, p.480-4. 2002.

Yuang, Y.; Padol, I. T.; Hunt, R. Peptic ulcer disease today. **Nat. Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v. 2, p. 80-89. 2006.

## ANEXOS


## Anexo 1 - Aprovação do COEP (Estudo Retrospectivo)

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de ética em pesquisa da UFMG - COEPParecer nº : ETIC 119/99  
Interessada: Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira

## DECISÃO:

Após cumprida a diligência foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, no dia 22.10.99, o projeto intitulado: «*História Natural da Infecção por Helicobacter pylori no Nosso Meio*» e o Termo de Consentimento, do referido projeto, de interesse da Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco  
Presidente do COEP

Av. Alfredo Balena, 110 - 1º andar  
Bairro Santa Efigênia - Cep 30.130-100 - Belo Horizonte-MG  
Telefone: (031) 248 9364  
FAX: (031) 248-9380 - Telex: (031) 2544

**Anexo 2 - Aprovação do COEP (Estudo Prospectivo)**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

**Parecer nº. ETIC 275/06**

**Interessada: Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira  
Depto. de Anatomia Patológica e Medicina Legal  
Faculdade de Medicina-UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 30 de agosto de 2006, o projeto de pesquisa intitulado "**Evolução da gastrite atrófica e metaplasia intestinal; correlação com alterações moleculares e mecanismos de apoptose**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto, com a recomendação que adicione ao TCLE o endereço e telefone do COEP.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**



## Anexo 3 - Ficha Clínica Endoscópica

Papel da Apoptose na Carcinogênese Gástrica

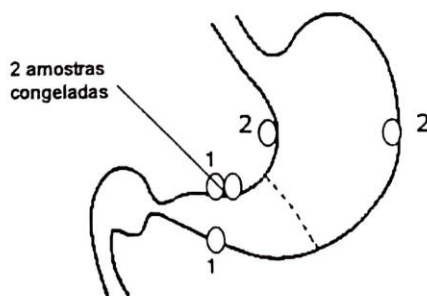
Caso # \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## FICHA CLÍNICO-ENDOSCÓPICA

<b>Nome</b>	<b>Data Nascimento</b>	<b>RG/HC</b>
<b>Endereço</b>	<b>Cidade</b>	<b>Fone</b>
<b>critérios de inclusão</b>		<b>Crítérios de exclusão</b>
Pacientes acima de 40 anos com queixas dispépticas, que serão submetidos à endoscopia pela primeira vez, não tratados para <i>H. pylori</i> .		Pacientes com úlcera péptica gástrica, qualquer tipo de câncer, hipertensão portal; aspecto endoscópico de gastrite atrófica autoimune; uso de medicamentos especificados (IBP, Bloq H2, antibióticos) nas últimas 4 semanas.
<b>Uso medicamentos?</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> antihipertensivos <input type="checkbox"/> hipoglicemiantes orais <input type="checkbox"/> anti-inflamatórios não esteróides <input type="checkbox"/> outros (especificar)		<b>Co-morbidades</b> <input type="checkbox"/> diabetes <input type="checkbox"/> hipertensão arterial <input type="checkbox"/> outros (especificar)
<b>tempo</b>		
<b>contato para acompanhamento seqüencial (retorno para buscar biópsia – assinar termo)</b>		
<b>Observações</b>		

## Endoscopia

**Coleta:** 1 e 2 - Rotina - formol ; 3- 2 fragmentos da peq. curvatura antral em RNA later;  
4- suco gástrico (2-4 mL)



## Impressão Diagnóstica:

Normal  Gastrite não atrófica  Gastrite Atrófica  UPD

## Anexo 4 - Protocolo de Análise de Biópsia Gástrica

**IAG – LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA – HC-UFG**  
**PROTOCOLO DE ANÁLISE DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS**

**Macroscopia:**

**Antro:**.....fragmentos arredondados de tecido branco e macio, medindo em conjunto .....X.....X.....cm.

**Corpo:**.....fragmentos arredondados de tecido branco e macio, medindo em conjunto .....X.....X.....cm.

**Microscopia:**

**Antro:** Cortes histológicos de mucosa antral apresentando ....(quadro). Pesquisa de *H. pylori*.....

**Corpo:** Cortes histológicos de mucosa oxíntica apresentando ...(quadro). Pesquisa de *H. pylori*.....

	CORPO			ANTRO			INCISURA		
	D	M	A	D	M	A	D	M	A
Inflamação									
Atividade									
Atrofia									
Metaplasia Intestinal									
M. Intestinal - tipo									
Atipias									
Hiperpl. foveolar									
Diminuição muco									
Atipias									
Erosões									
Edema									
Folículos Linfoides									
Proliferação vascular									
Fibrose									
Displasia									
Outros									
<i>H. pylori</i>	Pos.	Neg.		Pos.	Neg.		Pos.	Neg.	

**CONCLUSÃO**

**Comentários:**

Preceptor.....  
 Scanned with  
 CamScanner

Residente.....

## Anexo 5 - Sistema Sidney Modificado (Houston, 1994)

### Critérios e procedimentos para diagnóstico histopatológico

#### Sistema Sydney modificado (Houston, 1994)

##### I- Critérios e Procedimentos Gerais:

1. Observar o número de identificação de cada lâmina e registrar o resultado no local apropriado do protocolo de biópsias endoscópicas.
2. Cada lâmina contém uma única amostragem, em um ou mais cortes histológicos. Examine-a bem para firmar uma impressão geral.
3. A seguir examine o corte histológico para cada variável pesquisada, de forma independente. Avaliar cada variável separadamente das demais.
4. Assinalar o resultado no quadrinho adequado de acordo com as convenções do protocolo. Preencher a lápis, para permitir correções.
5. Extrema cautela ao fazer o lançamento do resultado no protocolo. Cuidado para não lançá-lo em local incorreto. Verificar se todos os quadros foram preenchidos (quando for o caso).
6. Graduar as diversas variáveis usando a escala visual de Houston (anexa) baseada na densidade dos achados de cada variável em campos de 40x.
7. Em variáveis distribuídas de forma mais homogênea (inflamação crônica, metaplasia intestinal e atrofia, por exemplo) concluir baseado no padrão predominante.
8. Em variáveis que costumam ter um padrão de distribuição mais heterogêneo (*H. pylori* e PMN, por exemplo) concluir baseado numa média do aspecto encontrado nos vários campos.
9. Somente identificar e quantificar determinada variável (por exemplo, *H. pylori*, células caliciformes, células de Paneth) baseado em critérios morfológicos de certeza. Na dúvida, considerar como negativo.
10. Analisar as cinco amostras de um mesmo paciente de forma independente uma das outras para o estudo das cinco variáveis pesquisadas.
11. Cuidado com artefatos (ex: precipitados de corantes x *H. pylori*).
12. Cuidado com os artefatos de esmagamento pela pinça de biópsia, que podem induzir confusão, por exemplo, com PMN. Ignore as áreas com este artefato.
13. As diversas variáveis serão pesquisadas usando apenas a coloração da HE.
14. A parte inferior do córion da mucosa gástrica, em relação com a muscular da mucosa, costuma mostrar certo aumento no número de células linfóides. Cuidado para não confundir com processo inflamatório.

##### II - Critérios e definições específicas:

#### 1) IDENTIFICAÇÃO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DAS VARIÁVEIS SYDNEY

##### a) *Helicobacter pylori*:

Usar escala visual.

Raros bacilos esparsos correspondem a **discreto**; uma monocamada de bactérias em relação com o epitélio corresponde a **moderado** e grumos e acúmulos de bactérias correspondem a **acentuado**.

Local preferencial de encontro: em relação com a superfície das células mucíparas das fossetas.



Ignorar áreas com metaplasia intestinal, valorizando apenas a colonização do epitélio gástrico autóctone.

Graduar pela média dos campos. Cuidado com artefatos.

b) Inflamação Crônica:

Comparar com a escala visual em campos de 40x.

**Normal:** apenas alguns linfócitos dispersos.

Plasmócitos são ausentes ou escassos em condições normais. Sua presença em número de dois ou mais na média dos campos de 40x é indicativa de inflamação.

Linfócitos intraepiteliais (LIE) ocasionais são considerados achado normal. Mais de 1 LIE/20 células epiteliais indica inflamação.

Não valorizar pequenos folículos linfóides sem centros germinativos como critério de inflamação.

Não computar numericamente os linfócitos de folículos ou de sua vizinhança.

Cuidado na identificação dos linfócitos. Atenção para plasmócitos, células endoteliais e células do estroma conjuntivo, que podem induzir confusão.

Graduar pelo aspecto predominante (distribuição homogênea) ou pela média dos campos (distribuição heterogênea).

c) Atividade Inflamatória:

Presença de polimorfonucleares (PMN) num *background* de inflamação crônica.

Pesquisar na lâmina própria, dentro do epitélio e no lúmen das fossetas. Um ou outro PMN isolado não tem significação. Cuidado com as áreas de pinçamento, que podem induzir artefatos simulando PMN. Não valorizar eosinófilos.

Comparar com a densidade média da escala visual em campos de 40x.

**Normal:** ausência de PMN.

Graduar pela média dos campos de 40x.

d) Metaplasia Intestinal:

Comparar com a escala visual.

Grosseiramente considerar os limites de: **menos de 1/3, de 1/3 a 2/3 e mais de 2/3** de substituição do epitélio original para níveis discreto, moderado e acentuado, respectivamente.

Graduar pela média dos campos de 40x.

e) Atrofia:

Atrofia implica diminuição ou desaparecimento das células autóctones do epitélio. Assim sendo, considerar no seu diagnóstico e quantificação tanto a diminuição do tamanho das glândulas quanto a substituição das células originais por epitélio metaplásico (intestinal ou pseudopilórico).

É mais difícil de se avaliar no antro devido ao estroma mais abundante e à distribuição mais irregular das glândulas.

No antro é normal encontrar três a quatro cortes transversais numa estrutura glandular. O achado de dois ou menos cortes transversais por glândula configura atrofia.

Usar escalas visuais distintas para corpo e antro, usando os marcadores de **menos de 1/3, de 1/3 a 2/3 e mais de 2/3**, respectivamente, para os níveis discreto, moderado e acentuado.

## 2) OUTROS ACHADOS, FORMAS ESPECIAIS DE GASTRITE E CLASSIFICAÇÃO

As variáveis situadas à direita no **Protocolo de biópsias endoscópicas** deverão ser pesquisadas no **contexto geral de cada caso** (no conjunto das cinco amostras) e não individualmente. Assinalar sempre com um “X” a ocorrência de determinado achado. Deixar em branco em caso de ausência da variável pesquisada.

### a) METAPLASIA INTESTINAL:

Assinalar no quadrinho apropriado a ocorrência de células caliciformes, células absortivas e células de Paneth.

Assinalar a presença de metaplasia pseudopilórica na mucosa de corpo.

Assinalar a ocorrência de atipias citológicas ou arquiteturais nas áreas de metaplasia intestinal. (Glândulas com certa tortuosidade, com células de núcleos hipercrômicos, pleomórficos, com alteração da polarização e pseudoestratificação, em vários níveis de intensidade - “displasia”).

Assinalar, por fim, se se trata de metaplasia intestinal completa ou incompleta.

### b) OUTROS ACHADOS:

#### Erosão:

Diagnóstico diferencial com artefatos.

Erosão implica lesão do epitélio superficial acompanhada de fibrina, PMN e atividade regenerativa adjacente.

#### Proliferação de músculo liso:

Assinalar a presença. Hiperplasia da muscular da mucosa. Relacionável com as gastrites reacionais.

#### Folículos linfóides:

Considerar os pequenos e os grandes, com ou sem centros germinativos.

#### Hiperplasia foveolar:

Aumento do comprimento e da tortuosidade das foveolas acompanhado por depleção de muco das células epiteliais, que podem exibir também certa hipertrofia nuclear. Pode ser confundida com displasia.

É achado inespecífico e comum, porém os casos mais acentuados são encontrados nas gastrites reacionais (químicas).

#### Fibrose:

Existência de fibrose na lâmina própria.

### c) FORMAS ESPECIAIS DE GASTRITE:

#### Gastrite aguda:

Presença de edema na lâmina própria, dilatação e congestão capilar, hemorragia intersticial de graus variáveis, podendo haver ou não erosões, encontrando-se às vezes, sinais de atividade reparativa (atipias regenerativas). Podem ou não ser encontrados PMN, geralmente em pequenos números. Ausência de inflamação crônica subjacente. (“gastropatia”).

#### Gastrite reacional (“química”):

Presença de hiperplasia foveolar importante, com depleção de mucina em células foveolares, edema da lâmina própria e proliferação de músculo liso, geralmente com aumento discreto ou mesmo ausência de células inflamatórias (“gastropatia”). Podem ser vistas erosões com infiltrado de PMN, os quais não são vistos na ausência das citadas erosões.

Os achados mais frequentes são hiperplasia foveolar, depleção de mucina e presença de inflamação significativa.

Gastrite linfocítica:

Grande número de linfócitos infiltrando a superfície e o epitélio das foveolas (LIE). Com mais de 25 LIE para 100 células epiteliais (1 para 4) o diagnóstico é firmado. Pode haver erosões e sinais de atividade (PMN), assim como pequeno ou grande número de linfócitos e/ou plasmócitos na lâmina própria. O epitélio superficial é desorganizado, há depleção de mucina e pseudoestratificação nuclear.

Gastrite folicular:

Gastrite crônica com grande número de folículos linfóides proeminentes na lâmina própria.

d) DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO-TOPOGRÁFICO DA GASTRITE:

Ao se firmar o diagnóstico final deve-se considerar a amostra de incisura angular (I.A.) no contexto das amostras de antro (quase sempre) ou corpo (raramente), conforme o caso.

Para o diagnóstico topográfico, considerar a média dos achados nas duas ou três amostras de corpo ou antro.

O diagnóstico “gastrite predominante (mente) antral ou de corpo” implica necessariamente que a graduação do processo inflamatório nos dois sítios divirja no mínimo em dois níveis (ex: acentuada em antro e discreta em corpo ou ausente em corpo e moderada em antro).

O diagnóstico “gastrite crônica inespecífica de antro e/ou de corpo” implica que não haja predominância topográfica significativa do processo inflamatório em um ou outro sítio (no máximo um nível de variação, por exemplo, moderada em antro e discreta em corpo) ou haja equivalência de intensidade nos dois sítios. Nestes casos, geralmente não há atrofia associada.

O diagnóstico “gastrite multifocal” implica lesão presente em no mínimo duas amostras de biópsia.

0) Mucosa gástrica sem alterações inflamatórias.

1) Gastrite crônica não atrófica, predominante ou exclusiva de antro: “Gastrite antral difusa”:

Gastrite crônica caracterizada por infiltrado mononuclear da lâmina própria do antro, e/ou da junção antro/corpo, sem atrofia. O corpo pode exibir discreta inflamação. São comuns plasmocitose, folículos linfóides, neutrófilos intraepiteliais e certa hiperplasia foveolar.

2) Gastrite crônica não-atrófica, predominante ou exclusiva de corpo.

Gastrite crônica sem atrofia, predominante ou exclusiva de corpo.

3) Gastrite crônica atrófica, predominante/ exclusiva de antro: “Gastrite atrófica multifocal”:

Gastrite crônica com atrofia e geralmente metaplasia intestinal em múltiplos focos (no mínimo duas amostras), mais intensa no antro, na incisura angular e na



junção antro/corpo. Os focos independentes podem coalescer com a idade, confluindo (difusa).

4) Gastrite crônica atrófica predominante ou exclusiva de corpo:

Corresponde à gastrite autoimune na maioria das vezes.

Considerar tanto os casos *H. pylori* positivo quanto negativo.

5) Gastrite crônica de antro e/ou corpo, inespecífica:

Gastrite mais acentuada em antro (apenas 1 grau de diferença, por exemplo, moderada em antro e discreta em corpo), sem atrofia ou metaplasia ou com estes processos em nível apenas discreto, quase sempre discreta ou moderada. Pode estar restrita ao antro ou ao corpo.

6) Não classificável.

Escala Visual de  
Houston

	Normal	Mild	Moderate	Marked
<i>H. pylori</i>				
Neutrophils				
Atrophy: Antrum				
Atrophy: Corpus				
Mononuclear Cells				
Intestinal Metaplasia				



## Anexo 6 – ATA de Aprovação



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409 9641 FAX: (31) 3409-9640  
cpg@medicina.ufmg.br



UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **CHRISTIANE TEIXEIRA CARTELLE**, nº de registro 2006218322. Às quatorze horas do dia **28 de dezembro de dois mil e dez**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "ESTUDO DA APOPTOSE EM PACIENTES INFECTADOS POR H. PYLORI PORTADORES DE DOENÇAS COM DIFERENTES RISCOS DE DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER GÁSTRICO", requisito final para a obtenção do grau de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Rosa Maria Esteves Arantes, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Eládio Oswaldo F. Sanchez/Coorientador	Instituição: FUNED	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Anilton Cesar Vasconcelos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Edilberto Nogueira Mendes	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Claudia Martins Carneiro	Instituição: UFOP	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Wanderson Geraldo de Lima	Instituição: UFOP	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de dezembro de 2010.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes Rosa Maria Esteves Arantes

Prof. Eládio Oswaldo F. Sanchez Eládio Oswaldo F. Sanchez

Prof. Anilton Cesar Vasconcelos Anilton Cesar Vasconcelos

Prof. Edilberto Nogueira Mendes Edilberto Nogueira Mendes

Profa. Claudia Martins Carneiro Claudia Martins Carneiro

Prof. Wanderson Geraldo de Lima Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Wagner Luiz Tafuri  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina/UFMG

marques  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina/UFMG  
Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - 5º andar  
CEP 30130-100 Centro BH/MG

## APÊNDICES

### Apêndice 1 – Termo de consentimento

#### Termo de Consentimento Para Participação em Pesquisa

**Título da Pesquisa:** "Evolução da gastrite atrófica e metaplasia intestinal; correlação com alterações moleculares e mecanismos de apoptose"

**Investigadores principais:** Profa. Dra. Ana Margarida M. F. Nogueira

**Objetivos:** A gastrite atrófica associada à infecção pela bactéria *H. pylori* é muito comum e, em alguns pacientes, associa-se a uma lesão chamada Metaplasia Intestinal. Tanto a gastrite atrófica, como a Metaplasia Intestinal, aumentam ao longo dos anos e, em alguns pacientes, estão associadas ao desenvolvimento de tumores do estômago. Como não se sabe exatamente quais pacientes que têm esta doença vão desenvolver tumores, todos os pacientes devem ser examinados periodicamente, para avaliar a evolução da doença e prevenir o aparecimento do tumor. O estudo de muitos doentes com gastrite e que tenham ou não atrofia e metaplasia intestinal, além de acompanhar a doença, pode ajudar a entender como ela se origina e desenvolve. O objetivo desta pesquisa é estudar um grupo de pacientes com gastrite associada à infecção pela bactéria *H. pylori*, com ou sem atrofia e Metaplasia associadas, para tentar esclarecer a formação dessas alterações iniciais e encontrar alguma característica que ajude a identificar os pacientes que têm mais risco de desenvolver tumor no futuro.

**Procedimentos:** Se eu concordar em participar do estudo, acontecerá o seguinte:

Eu farei um exame endoscópico com biópsias (retirada de pequeno fragmento do meu estômago) para fazer o diagnóstico; serão retiradas mais duas biópsias onde os pesquisadores vão fazer outros exames. O suco gástrico, que normalmente é retirado no início do exame e desprezado, será examinado. Caso eu tenha feito outro exame anteriormente, os pesquisadores farão o estudo dessas biópsias e farão outros exames nesse material, que está continuará guardado no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas.

**Benefícios:** Eu posso não ter benefícios diretos da participação nesta pesquisa, além do acompanhamento da minha gastrite, caso seja esse o meu caso. Entretanto, os pesquisadores, após analisar o material de uma série de pacientes na mesma situação que a minha, poderão conseguir entender melhor como se desenvolve a doença. Isso poderá ajudar outros pacientes no futuro.

**Riscos:** A realização deste exame não envolve risco adicional, porque serão retirados apenas mais dois pequenos fragmentos além do que é feito habitualmente. Mesmo após a realização do estudo ainda ficará material arquivado, caso venha a ser necessário futuramente. Entendo que o estudo das minhas biópsias anteriores é uma revisão utilizando métodos que os pesquisadores não tinham à época do meu exame.

**Confidenciabilidade:** Os resultados do estudo serão discutidos comigo e enviados ao meu médico de referência (a menos que eu deseje o contrário). Com exceção dessa liberação dos resultados, todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas estritamente para *fins de pesquisa*. Minha identidade será mantida em segredo.

**Questões:** \_\_\_\_\_, assistente de pesquisa, discutiu essas informações comigo, oferecendo-se para responder as minhas dúvidas. Caso eu

tenha perguntas adicionais, poderei contatar a Profa. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira pelo telefone (31) 32489788.

**Direito de recusa:** Minha participação neste estudo é totalmente voluntária, sendo eu livre para recusar a tomar parte da pesquisa sem afetar ou pôr em risco meu futuro atendimento médico.

**Consentimento:** Concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia do presente termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer dúvidas.

**Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 20 \_\_\_\_.

**Assinatura:**

---

Assinatura do paciente

---

Assinatura do Médico