

Moacir Ferreira Júnior

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DA MUCOSA
GÁSTRICA DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) INFECTADOS POR
LINHAGENS DE *Helicobacter pylori* COM DIFERENTES ILHAS DE
PATOGENICIDADE**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2015**

Moacir Ferreira Júnior

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DA MUCOSA GÁSTRICA DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) INFECTADOS POR LINHAGENS DE *Helicobacter pylori* COM DIFERENTES ILHAS DE PATOGENICIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Geral

Área de Concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari
Universidade Federal de Minas Gerais
Co-orientadora: Prof^a Dra. Ivana Duval de Araújo
Universidade Federal de Minas Gerais

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2015**

F383e Ferreira Júnior, Moacir.
Estudo histopatológico e imuno-histoquímico da mucosa gástrica de Gerbils (*Meriones unguiculatus*) infectados por linhagens de *Helicobacter pylori* com diferentes ilhas de patogenicidade [manuscrito]. / Moacir Ferreira Júnior. - - Belo Horizonte: 2015.
113f.: il.
Orientador: Marcelo Vidigal Caliar.
Coorientador: Ivana Duval de Araújo.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Mucosa Gástrica/patologia. 3. Gastrite. 4. Infecções por *Helicobacter*. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Caliar, Marcelo Vidigal. II. Araújo, Ivana Duval de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 200



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO

MOACIR FERREIRA JUNIOR

Realizou-se, no dia 19 de maio de 2015, às 09:00 horas, sala 241 - Bloco C3 Departamento de Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DA MUCOSA GÁSTRICA DE GERBIS MONGOLIAN (Meriones Unguiculatus) INFECTADOS POR LINHAGENS DE H. PYLORI COM DIFERENTES ILHAS DE PATOGENICIDADE*, apresentada por MOACIR FERREIRA JUNIOR, número de registro 2011655999, graduado no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari - Orientador (UFMG), Prof(a). Ivana Duval de Araujo (UFMG), Prof(a). José Carlos Nogueira (UFMG), Prof(a). Cláudia Martins Carneiro (UFOP), Prof(a). Álvaro Cantini Nunes (UFMG), Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima (UFOP).

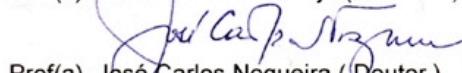
A Comissão considerou a tese:

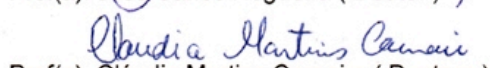
Aprovada () Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 19 de maio de 2015.

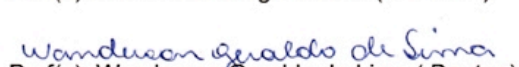

Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari (Doutor)


Prof(a). Ivana Duval de Araujo (Doutora)


Prof(a). José Carlos Nogueira (Doutor)


Prof(a). Cláudia Martins Carneiro (Doutora)


Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Doutora)


Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima (Doutor)

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e, executado nos Laboratórios de Protozooses, de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratórios de Bacteriologia do Departamento de Propedêutica Complementar e de Cirurgia, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico esse trabalho à minha esposa Márcia de Paula Godoy, pelo amor incondicional e dedicação a mim dispensados, pessoa que eu posso contar a qualquer hora, para o que der e vier.

Agradecimentos

A DEUS, por estar sempre derramando maravilhosas bênçãos em minha vida, e seus mensageiros, por estarem sempre me guiando e protegendo.

Ao Prof. Marcelo, pela amizade, confiança, paciência, ajuda e por estar sempre me acalmando nas horas difíceis.

À Prof^a Ivana, por acreditar em mim, e ter me dado o projeto, sem o qual não teria realizado esse trabalho.

À Prof^a Dulciene Queiroz, por todo o apoio, atenção e ajuda a mim dispensados.

Aos colegas de laboratório Luana e Fabrício, pela amizade e por estarem sempre me auxiliando.

À todas as técnicas do laboratório de técnicas histológicas do departamento de Patologia Geral do ICB, especialmente a Mirna, Olinda e Vânia, pela atenção e carinho em realizar os meus trabalhos.

Ao Prof. Wagner Tafuri, coordenador do curso de Pós-Graduação em Patologia, pela compreensão, paciência e atenção.

A todos os meus entes queridos, meus pais, avós e tios, pois onde estiverem, tenho certeza que estão felizes por eu estar concluindo mais essa etapa.

“Depois de tantas tentativas em vão e de tantas ilusões perdidas, ainda vale a pena tentar, pois a gente não desiste da vida”.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histofisiologia do Estômago.....	3
2.2 Aspectos Morfológicos da Mucosa Gástrica do Gerbil.....	4
2.3 Aspectos Biológicos e Epidemiológicos gerais do <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.4 Patogênese das Lesões produzidas pelo <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.5 Infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i> e alterações na expressão de células G e D... 9	9
2.6 Infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i> e alterações nas mucinas gástricas.....	10
2.7 Aspectos gerais das principais doenças gástricas provocadas pelo <i>H. pylori</i>	12
2.7.1 Gastrite crônica.....	12
2.7.2 Gastrite crônica atrófica.....	13
2.7.3 Doença ulcerosa péptica (DUP).....	15
2.7.4 Gastrite crônica atrófica e o câncer gástrico.....	15
2.7.5 Gastrite crônica atrófica e o tumor neuroendócrino do tipo I.....	16
2.7.6 Linfoma de tecido linfóide associado a mucosa gástrica-linfoma MALT.....	17
3. JUSTIFICATIVA	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Gerais.....	19
4.2 Específicos.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Linhagens de <i>H. pylori</i> usadas para inoculação.....	20
5.2 Grupos de Animais e Inoculação.....	20
5.3 Necropsia, processamento e análise histopatológica do estômago.....	20
5.4 Classificação e graduação da gastrite pelo sistema Sydney.....	21
5.5 Reações imuno-histoquímicas para células G e D.....	22
5.6 Reações imuno-histoquímicas para mucinas MUC1 e MUC5AC.....	23
5.7 Análise morfométrica do infiltrado inflamatório e da área de lâmina própria antral.....	23
5.8 Análise quantitativa das células G e D e, das mucinas MUC1 e MUC5AC.....	24
5.9 Análise Estatística.....	25
6. Resultados	26
6.1 Identificação do <i>H. pylori</i>	26
6.2 Análise macroscópica da mucosa gástrica.....	26
6.3 Classificação e graduação da gastrite pelo sistema Sydney.....	26
6.4 Análise Morfométrica do Infiltrado Inflamatório e da área de lâmina própria....	29
6.5 Imuno-histoquímica	32
6.5.1 Análise quantitativa das células G e D.....	32
6.5.2 Análise quantitativa das áreas de mucinas MUC1 e MUC5AC.....	36
7. Discussão	39
8. Conclusões	44
9. Referências Bibliográficas	45
10. Anexos	61
10.1 – Figuras.....	61
10.2 – Artigo Publicado.....	75
10.3 – Artigo Submetido.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico - 1: Representação do número total de células inflamatórias e a área de lâmina própria na mucosa gástrica de gerbils infectados por linhagens de <i>H. pylori</i> CagA positivas contendo um ou três sítios de fosforilação C.....	30
Gráfico - 2: Números de células G e D no antro do estômago de gerbils após 45 dias e seis meses de infecção, e proporção entre células G/D no antro do estômago de gerbis após 45 dias e seis meses de infecção.....	33
Gráfico - 3: Correlação entre o número de células G e o número de células inflamatórias, e correlação entre o número de células G e a área total de lâmina própria.....	36
Gráfico - 4: Área das mucinas MUC1 e MUC5AC da mucosa gástrica antral de gerbils infectados por linhagens de <i>H. pylori</i> CagA positivas contendo um ou três sítios de fosforilação C.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos mecanismos da secreção ácida gástrica.....	4
Figura 2 - Aspectos morfológicos da mucosa gástrica normal do gerbil.....	61
Figura 3 - Padrão de classificação da gastrite e de sua atividade de acordo com o sistema Sydney.....	22
Figura 4 - Reação em cadeia da polimerase, sequenciamento e tradução de genes de isolados de <i>H. pylori</i> pareados a partir de um único paciente que difere na região <i>cagA3'</i>	62
Figura 5 - Aspecto macroscópico da mucosa gástrica de gerbils infectados por <i>H. pylori</i> aos seis meses após a infecção.....	63
Figura 6 - Aspecto microscópico do processo inflamatório na mucosa antral de gerbils infectados por <i>Helicobacter pylori</i> aos 45 dias e aos seis meses de infecção.....	65
Figura 7 - Aspecto microscópico da atrofia, metaplasia intestinal e displasia na mucosa gástrica de gerbils infectados por <i>H. pylori</i> aos seis meses de infecção.....	67
Figura 8 - Reação imuno-histoquímica de células G e D na mucosa antral de gerbils infectados por <i>Helicobacter pylori</i> aos 45 dias e aos seis meses de infecção.....	69
Figura 9 - Reação imuno-histoquímica de mucinas MUC1 e MUC5AC na mucosa antral de gerbils do grupo controle.....	71
Figura 10 - Reação imuno-histoquímica de mucinas MUC1 e MUC5AC na mucosa antral de gerbils infectados por <i>Helicobacter pylori</i> CagA positiva, contendo um ou três segmentos EPYA-C.....	73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Inflamação gástrica, atividade inflamatória e o número de folículos linfóides em gerbils infectados por *Helicobacter pylori* aos 45 dias e seis meses pós-inoculação 28
- Tabela 2** - Lesões na mucosa gástrica de gerbils do grupo controle e dos grupos com seis meses de infecção pelo *Helicobacter pylori* 29

Lista de Abreviaturas e Siglas

H. pylori - *Helicobacter pylori*

CagA- gene associado a citotoxina A

cag PAID - Ilha de patogenicidade cag

VacA – gene associado à citotoxina vacuolizante A

GCA - Gastrite atrófica crônica

MI - metaplasia intestinal

DUP - Doença ulcerosa péptica

CG - Câncer gástrico

TI GC - tumor neuroendócrino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PMN: polimorfonucleares neutrófilos

Grupo CTRL - grupo de animais controle

Grupo CagA1EP - grupo de animais infectados por linhagem de *H. pylori* CagA positiva contendo um sítio de fosforilação.

Grupo CagA3EP - grupo de animais infectados por linhagem de *H. pylori* CagA positiva contendo três sítios de fosforilação.

IL1 β - interleucina - 1 β

IL-6 – interleucina - 6

IFN γ - interferon - γ

TNF α - fator de necrose tumoral - α

RUT-Teste Rápido Urease

RESUMO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria que infecta cronicamente a mucosa gástrica de mais da metade da população mundial e que está relacionada ao desenvolvimento de gastrite crônica, úlceras duodenal e gástrica, adenocarcinoma gástrico e linfoma de células B da zona marginal do tecido linfóide associado a mucosa (linfoma MALT). Há estudos em humanos demonstrando que a infecção por linhagens de *H. pylori* contendo mais de um sítio de fosforilação de CagA, está relacionada ao desenvolvimento de lesões gástricas mais graves. Diante da inexistência de estudos experimentais sobre o tema, foi objetivo deste trabalho, avaliar os efeitos da infecção com linhagens de *H. pylori* contendo diferentes números de sítios de fosforilação de CagA sobre a mucosa gástrica de gerbils, em relação às alterações macroscópicas e microscópicas, o número de células G e D e, a expressão das mucinas MUC1 e MUC5AC, em períodos distintos do processo infeccioso. Quarenta e oito gerbils fêmeas com três meses de idade foram divididos em três grupos experimentais: um grupo controle consistindo de animais não infectados, animais tratados com linhagem de *H. pylori* CagA-positiva contendo um segmento EPIYA-C (CagA1Ep), e animais inoculados com linhagem de *H. pylori* com três segmentos EPIYA-C (CagA3Ep). Cada grupo foi constituído de 16 animais; oito animais de cada grupo foram eutanasiados 45 dias após a infecção, e os oito animais restantes foram eutanasiados seis meses após a infecção. Aos quarenta e cinco dias após a infecção, houve um aumento progressivo e significativo no número de células inflamatórias e na área de lâmina própria dos grupos CagA1Ep e CagA3Ep em relação ao grupo controle, sendo esse aumento mais expressivo no grupo CagA3Ep. Neste período da infecção foi observada uma diminuição no número de células D no grupo CagA3EP. Também aos 45 dias foi verificada uma diminuição na área total das mucinas MUC1 e MUC5AC nos grupos CagA1Ep e CagA3Ep em relação ao grupo controle, sendo mais intensa no grupo CagA3Ep. Aos seis meses após a infecção, todas as alterações mencionadas aos 45 dias, foram bem mais intensas, ocorrendo um aumento progressivo e significativo do infiltrado inflamatório, assim como também na área de lâmina própria nos grupos de animais infectados, principalmente no grupo CagA3Ep. Neste mesmo grupo houve aumento do número de células G e redução do número de células D. Nos grupos de animais infectados foi observada uma diminuição significativa e progressiva na expressão das mucinas MUC1 e MUC5AC, sendo mais proeminente no grupo CagA3Ep. Aos seis meses de infecção também foram observadas atrofia, metaplasia

intestinal e a displasia, sendo mais frequentes no grupo CagA3Ep. Os resultados mostraram que linhagens de *H. pylori* contendo maior número de sítios de fosforilação EPIYA-C são significativamente mais patogênicas do que as linhagens com apenas um sítio de fosforilação EPIYA-C, levando ao surgimento de gastrite crônica mais grave e ao desenvolvimento mais frequente de lesões pré-cancerosas.

SUMMARY

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a bacterium that infects chronically the gastric mucosa in more than half of the world population and it is related to the development of chronic gastritis, duodenal and gastric ulcers, gastric adenocarcinoma and lymphoma cutaneous B, from the marginal zone of the lymphoid tissue associated to the mucosa (linfoma MALT). There are studies in humans demonstrating that the infection by strains of *H. pylori* containing more than one site of CagA phosphorylation, is related to the development of more severe gastric lesions. With the absence of experimental studies on the subject, the objective of this study was to evaluate the effects of infection with *H. pylori* strains containing different numbers of CagA phosphorylation sites on the gerbil Mongolian gastric mucosa, in relation to the macroscopic and microscopic changes, the number of D and G cells and the expressiveness of and MUC5AC mucins in different periods of the infection process. 48 gerbil Mongolian 3-months-old females were divided in three experimental groups: one control group consisting of non-infected animals; animals treated with *H. pylori* positive lineage containing one segment EPIYA-C (CagA1Ep) and animals inoculated with *H. pylori* CagA lineage with three segments EPIYA-C (CagA3Ep). Each group was composed of 16 animals; 8 animals of each group were sacrificed 45 days post-infection and the 8 remaining animals were sacrificed 6 months post-infection. At 45 days post-infection there was a progressive and significant increase in the number of inflammatory cells and in the site of the typical slide of the CagA1Ep and CagA3Ep groups in relation to the control group, this increase being most significant in the CagA3Ep group. During this infection period it was observed a decrease in the number of D cells in the CagA3Ep. At 45 days it was also observed a decrease in the total site of MUCI and MUC5AC mucins in the groups CagA1Ep and CagA3Ep, in relation to the control group, this being more intense in the group CagA3Ep. 6 months post-infection all the changes mentioned at 45 days were much more intense, occurring a progressive and significant increase in the inflammatory infiltrate, as well as in the site of the typical slide in the infected groups, mainly in the CagA3Ep. In this same group there was an increase of G cells and a reduction in the number of D cells. It was observed a significant and progressive decrease in the expressiveness of MUCI and MUC5AC mucins in the group of infected animals, this being more prominent in CagA3Ep group. At 6 months of infection it was also observed atrophy, intestinal metaplasia and dysplasia this being more frequent in CagA3Ep

group. The results showed that *H. pylori* lineages containing a greater number of phosphorylation sites are significantly more pathogenic than strains with only one site of phosphorylation EPIYA-C, leading to the development of more severe chronic gastritis and frequently to the development of pre-cancerous lesions.

1. INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria espiralada gram-negativa, que infecta cronicamente a mucosa gástrica de mais de 50% da população mundial (Marshall e Warren,1984; Pounder e Ng D, 1995). A maior parte dos indivíduos infectados apresenta gastrite assintomática; porém 10 a 20% podem desenvolver úlcera péptica e, 1 a 2%, câncer gástrico. Este tipo de infecção está relacionada com o desenvolvimento de gastrite crônica, úlceras gástrica e duodenal, adenocarcinoma gástrico e o linfoma de células B da zona marginal do tecido linfóide associado a mucosa (linfoma MALT) (Blaser, 1998; Covacci *et al.*,1999). Dentre as alterações histológicas da mucosa gástrica provocadas pela colonização do *H.pylori*, destacam-se a reação inflamatória, atrofia, metaplasia intestinal (MI), displasia e o carcinoma gástrico (Dixon *et al.*,1996). Associadas à história natural dessas lesões e doenças, encontram-se as alterações das células G e D, bem como as modificações da camada de mucinas gástricas. Pacientes dispépticos infectados pelo *H. pylori*, apresentam aumento significativo na população de células G, produtoras de gastrina, e diminuição na população de células D, produtoras de somatostatina; ao passo que animais infectados pelo *H. pylori*, apresentam níveis sorológicos mais elevados de gastrina e menores de somatostatina (Wiedemann *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2005; Duval-Araújo *et al.*, 2000). Uma vez que a secreção ácida basal é controlada por essas células produtoras de hormônios, a erradicação do *H. pylori* tem sido considerada um eficiente método na prevenção e tratamento de diferentes tipos de doenças gástricas, uma vez que tal procedimento resulta em diminuição da secreção ácida basal em pacientes com úlcera duodenal (Calam,1999), e em normalização dessa secreção em pacientes com gastrite crônica atrófica (Calam,1996) e da produção de gastrina (Konturek e Brzozowski ,2006). Além disso, pacientes e ou animais infectados pelo *H. pylori* apresentam uma diminuição tanto na quantidade de mucinas da mucosa gástrica, assim como também na espessura da camada de muco firmemente aderente à superfície da mucosa, as quais representam uma grande barreira de defesa contra diferentes tipos de patógenos e contra a própria ação do suco gástrico (Newton *et al.*, 1998; Henriksnas *et al.*,2006).

Estudos recentes têm mostrado que há uma grande variação entre as linhagens de *H. pylori*, em diferentes partes do mundo, e que essas diferentes linhagens exibem uma ampla diversidade genética. Uma diferença que as tornam mais virulentas, é a presença de um locus de aproximadamente 40 Kb denominado Cag PAID (Ilha de

patogenicidade *cag*), o qual está presente em cepas de *H. pylori* distribuídas em diferentes partes do mundo (Matar *et al.*, 2007; McClain *et al.*, 2009). Este locus é composto por cerca de 27 a 31 *genes*, destacando-se o gene *cag26*, o qual codifica uma proteína altamente patogênica, denominada *cagA*; e os genes *cag7*, *cag10* e *cag12*, os quais codificam um fator de secreção tipo IV (T4SS) que transloca *CagA* para o interior das células epiteliais gástricas (Avilés-Jiménez *et al.*, 2012). Após tal translocação, *CagA* é fosforilada por proteínas da família das Quinases, em seus resíduos de tirosina de uma seqüência de cinco aminoácidos repetidos, situados na porção carboxila terminal, denominados EPIYA, resultando na ativação de genes que codificam mediadores inflamatórios e proteínas antiapoptóticas e, induzem também alterações que aumentam o risco de danos celulares para adquirir mudanças genéticas pré-cancerosas, tais como a metaplasia intestinal e a displasia (Backert e Selbach, 2008; Batista *et al.*, 2011; Avilés-Jiménez *et al.*, 2012).

Ainda são necessários maiores estudos que aprofundem o conhecimento sobre as relações do grau de fosforilação da proteína *CagA* e o desenvolvimento de lesões gástricas, assim como também com o número de células G e D e, o conteúdo de mucinas; uma vez que parecem não haver estudos experimentais que avaliaram “*in vivo*” os tipos de lesões desenvolvidas e a sua intensidade, assim como também as alterações no número de células G e D e na expressão de mucinas. Além disso, ainda não há um padrão universal para a quantificação de células inflamatórias presentes em uma mucosa gástrica normal e inflamada, análise esta que é fundamental para a graduação das gastrites e para a predição da progressão da doença.

2 . REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histofisiologia do Estômago

O estômago é constituído por três tipos de mucosa: a mucosa oxíntica, que abrange as regiões do fundo e corpo gástricos, a mucosa cárdica, que reveste a região entre o esôfago e o estômago, e a mucosa antral, que corresponde à região do antro gástrico, na porção distal do estômago. Todas as mucosas são revestidas por epitélio simples prismático, constituído por células produtoras de muco e outros tipos celulares. A mucosa oxíntica é composta por células parietais, secretoras de ácido clorídrico (HCl) e, principais, produtoras de pepsinogênio e lipase. Também na mucosa oxíntica existem células endócrinas que regulam essa secreção, tais como as células D, células enterocromafins-like (ECL) e enterocromafins (EC) produtoras de somatostatina, histamina e serotonina, respectivamente. Além das células D e EC, a mucosa antral também é constituída pelas células G, produtoras de gastrina (Goo, Akiba & kaunitz, 2010).

A secreção ácida ocorre através das células parietais a qual é controlada por uma ação conjunta de sinais neurais e hormonais que regulam a secreção de HCl através da bomba H^+/K^+ ATPase presente nos canalículos secretores dessas células. Conforme representado na figura 1, os estímulos colinérgicos, representados pela acetilcolina, estimulam tanto as células parietais para a secreção ácida, quanto as células G para liberarem gastrina, que provoca estimulação das células parietais e ECL. Tais células endócrinas secretam histamina que também é um fator estimulador de secreção ácida pelas células parietais. Por outro lado, a secreção ácida está sob o controle negativo da somatostatina, a qual inibe tanto as células G quanto as células ECL. Para favorecer a secreção ácida, os estímulos colinérgicos são capazes de inibir a liberação de somatostatina (Josep *et al.*, 2003; Goo, Akiba & kaunitz, 2010). Além do efeito estimulador de secreção ácida pela gastrina, foi bem demonstrado por muitos autores que tal hormônio possui também efeito trófico sobre a mucosa gástrica (Calam, 1996), e que a somatostatina, quando administrada por um curto período de tempo, tem efeito inibidor sobre o crescimento da mucosa (Lehy, 1984).

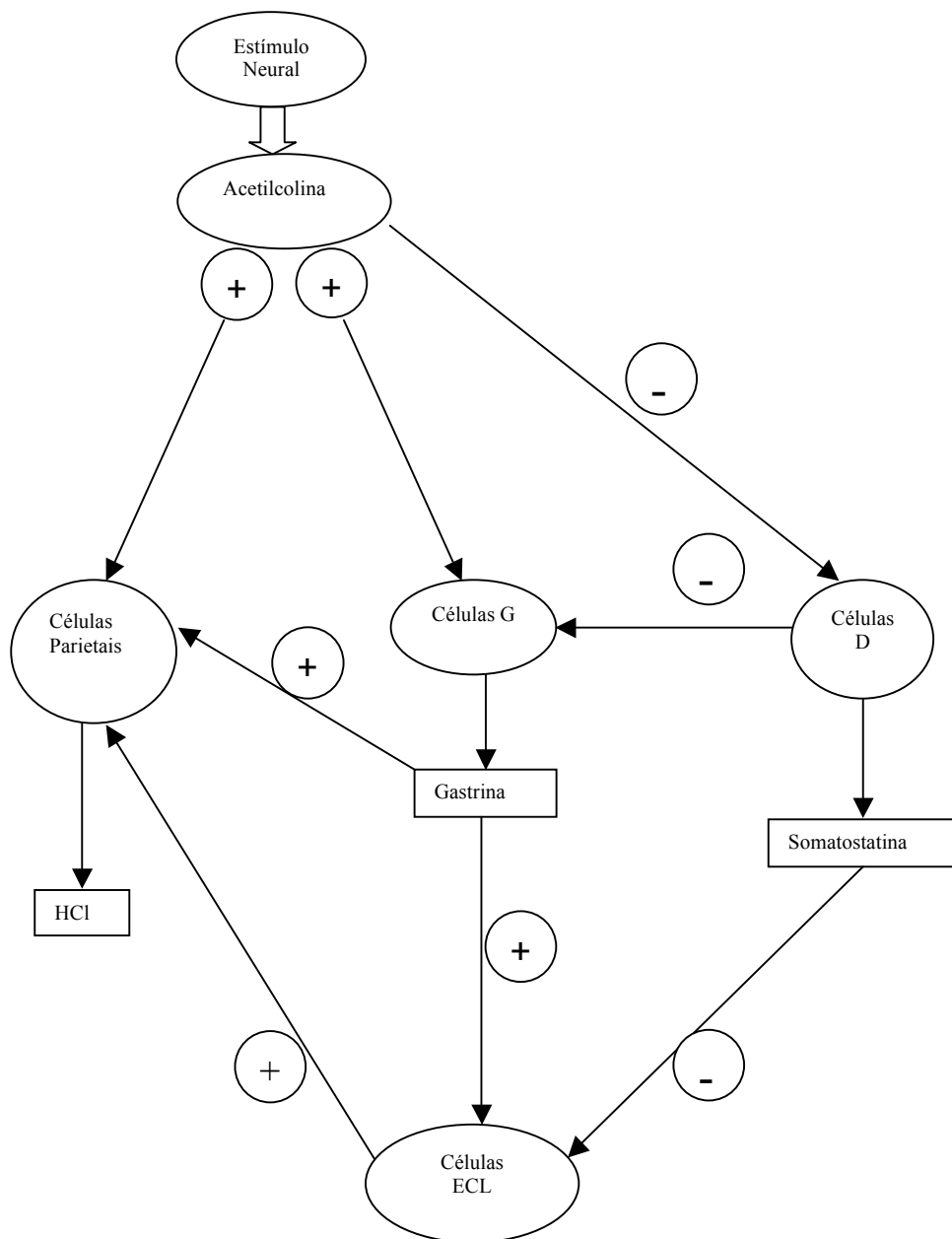


Figura 1 – Esquema dos mecanismos da secreção ácida gástrica.

2.2 Aspectos Morfológicos da Mucosa Gástrica do Gerbil

A mucosa gástrica do gerbil, assim como a de outros mamíferos, tais como a do rato, do camundongo e a do porco, é constituída por uma região proximal revestida por epitélio estratificado pavimentoso do tipo esofágico (pars esofágica) e uma porção glandular, a qual é revestida por uma mucosa constituída por três regiões distintas: cárdica, fúndica e pilórica (Figura 2) (Ikeno *et al.*, 1999).

2.3 Aspectos Biológicos e Epidemiológicos gerais do *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria de estrutura curvada ou espiralada, de superfícies lisas e de extremidades arredondadas, móvel, não esporulada e microaerófila. Mede aproximadamente 0,5µm a 0,1µm de largura e 3µm de comprimento, possuindo de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e bulbos terminais nas extremidades lisas (Ladeira, Salvadori & Rodrigues, 2003). Contém hidrogenases que são usadas para obter energia através da oxidação do hidrogênio molecular (Olson & Maier, 2002). Esse microorganismo foi detectado pela primeira vez em biópsias gástricas obtidas de pacientes com gastrite e úlcera péptica, sendo denominado inicialmente de *Campylobacter pyloridis* e *Campylobacter pylori* (Warren & Marshall, 1983). Somente em 1989, foram verificadas várias diferenças ultra-estruturais e bioquímicas dessa bactéria com o gênero *Campilobacter*, quando foi então denominada de *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989).

A prevalência do *H. pylori* é maior em países em desenvolvimento, sendo ainda alta em vários países. No sul e leste da Europa, América do Sul e Ásia, a prevalência de *H. pylori* é frequentemente superior a 50% (Eusebi *et al.*, 2014). A infecção pode atingir até 50% das crianças já aos cinco anos de idade e acima de 70% aos 10 anos de idade. Esse valor elevado na infância, expressa a condição de vida dos indivíduos nessa fase da vida, uma vez que a aquisição da infecção pelo microorganismo ocorre principalmente neste período, e, de forma geral, o indivíduo passa a albergar a bactéria por toda sua vida (Parente & Parente, 2010). A transmissão do *H.pylori* ocorre normalmente de pessoa para pessoa, pela via oral-oral, por meio de vômito e, possivelmente, pela saliva. A transmissão pela água, provavelmente por contaminação fecal, pode ser uma importante fonte de infecção, especialmente em populações expostas à água não tratada (Brown, 2000).

2.4 Patogênese das lesões produzidas pelo *Helicobacter pylori*

Os diferentes graus de intensidade das doenças causadas pelo *H. pylori* estão intimamente relacionados com o seu perfil genético e com o índice de polimorfismo do mesmo. Diferentes expressões de polimorfismo, assim como a região do DNA em que o mesmo ocorre, resulta em diferentes graus de patogenicidade da bactéria (Jones *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2010). Estudos recentes têm mostrado que há uma grande variação geográfica entre as linhagens de *H. pylori*, e que as diferentes linhagens exibem uma

ampla diversidade genética. Esse fato pode ser consequência de vários fatores como a alta taxa de mutação, alto índice de recombinação gênica entre as espécies e uma longa história de evolução das mesmas (McClain *et al.*, 2009).

Dentre as diferentes linhagens de *H. pylori*, a principal diferença em seu conteúdo gênico é a presença ou ausência de um locus de 40 Kb, denominado cag PAID (Ilha de patogenicidade cag), o qual está presente em linhagens de *H. pylori* distribuídas em diferentes partes do mundo, tais como na Europa, Leste e Oeste Asiáticos e nas Américas (Ashour *et al.*, 2002; Matar *et al.*, 2007; McClain *et al.*, 2009). Este locus é composto por cerca de 27 a 31 genes, dentre estes, destacam-se o gene *cag 26*, o qual codifica uma proteína altamente patogênica, denominada CagA; e os genes *cag7*, *cag10* e *cag12*, os quais codificam um fator de secreção tipo IV que transloca CagA para o interior das células epiteliais gástricas (Avilés-Jiménez *et al.*, 2012). No Brasil, esse locus possui uma alta frequência de deleções em algumas partes de seu segmento em amostras de *H. pylori* isoladas de pacientes portadores de úlcera péptica (Matar *et al.*, 2007). No nordeste, região com alta prevalência de câncer gástrico no país, infecção com as linhagens mais virulentas de *H. pylori* contendo os genes *cagA* e *VacA s1m1* são predominantes, e estão relacionadas com as formas mais graves das doenças causadas pelo *H. pylori* (Cavalcante *et al.*, 2012). Linhagens de *H. pylori* que contêm o segmento cag PAID, apresentam maior potencial para induzir a úlcera e câncer gástricos, quando comparadas com as linhagens que não o expressam, sendo o aumento da proliferação das células epiteliais gástricas e a inibição da apoptose, os fatores chave para o risco aumentado de desenvolvimento do câncer gástrico (Backert & Selbach, 2008; McClain *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2010; Buti *et al.*, 2011). Além disso, a proteína CagA induz também a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas tais como a IL-8 (Argent, Zhang & Atherton, 2005; Batista *et al.*, 2011, Papadacos *et al.*, 2013). Deleção total de cag PAID tem sido associado com produção mais baixa de IL-8 in vitro (Audibert *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2002).

Também está envolvida nos mecanismos geradores de lesão do *H. pylori*, uma organela filamentosa localizada na superfície bacteriana, chamada de sistema de secreção tipo IV (T4SS). O fator *H. pylori* T4SS está sempre localizado em um dos pólos bacterianos, e funciona como estrutura capaz de injetar os produtos de secreção bacterianos no interior da célula do hospedeiro. Após *H. pylori* T4SS injetar CagA para o interior da célula,

essa citotoxina é então fosforilada por proteínas da família das Quinases, SFKs, ativadas somente nos estágios iniciais da infecção, e por Quinases Abl (c-Abl and Arg), as quais são ativadas nas fases mais tardias da infecção. O principal efeito da fosforilação de CagA é o recrutamento de proteínas com módulos de ligação a sítios de fosfotirosina específicos, tais como a tirosina fosfatase *SHP-2*, tirosina kinase Csk e a proteína adaptadora Crk, resultando em sinais celulares anormais, os quais induzem a ativação de genes que codificam mediadores inflamatórios e proteínas antiapoptóticas; induzem também alterações no citoesqueleto das células epiteliais gástricas (Backert & Selbach, 2008; Avilés-Jiménez *et al.*, 2012). Essas últimas alterações, geralmente resultam em alterações do crescimento e da proliferação celular, contato célula-célula, migração celular, alongamento e aumento do movimento de células epiteliais, os quais aumentam o risco de danos celulares para adquirir mudanças genéticas pré-cancerosas (Backert & Selbach, 2008; Batista *et al.*, 2011; Avilés-Jiménez *et al.*, 2012). Essas alterações no citoesqueleto e conseqüentemente na morfologia da célula, podem levar também as células epiteliais gástricas a exibirem o fenótipo “hummingbird” (beija-flor), devido à semelhança do formato do bico desse pássaro com a forma das células alteradas (Argent *et al.*, 2005; Backert & Selbach, 2008).

A virulência de algumas linhagens de *H. pylori* é aumentada devido a fosforilação dos resíduos de tirosina de uma seqüência de cinco aminoácidos repetidos, situados na porção carboxila terminal da proteína CagA, denominados EPIYA. O polimorfismo nessa região envolve mudanças na seqüência dos aminoácidos repetidos resultando em EPIYA A, B, C e D modificados. O *cagA* que contém o EPIYA D modificado, como em alguns países do oeste e leste asiáticos, tem uma maior afinidade para se ligar à *SHP-2*, causando danos maiores às células e, por isso, está relacionado com as formas mais graves das doenças (Reyes-Leon *et al.* 2007; Jones *et al.*, 2009). Esses mesmos autores demonstraram em um estudo de epidemiologia molecular, que o *cagA* carregando o EPIYA-ABD modificados estava presente em 80% dos pacientes com gastrite, em 83,3% dos pacientes com úlcera duodenal, em 90,5% dos pacientes com úlcera gástrica e em 100% dos pacientes com câncer gástrico. Concluíram dessa forma, que há uma relação direta entre a infecção com cepas de *H. pylori* contendo *cagA* EPIYA-ABD modificados e o desenvolvimento do câncer gástrico.

Segundo Argent *et al.* (2005) e Reyes-Leon *et al.* (2007), linhagens de *H. pylori* que apresentaram maior número de EPIYAS, como as identificadas na África do Sul, também apresentavam maior grau de fosforilação de CagA, e por isso, estavam associadas com os graus mais intensos das doenças gástricas (Argent *et al.*, 2005) Chuang *et al.* (2011) também verificaram um grau mais intenso de fosforilação da proteína CagA em linhagens de *H. pylori* obtidas de pacientes com câncer gástrico e com gastrite associada à metaplasia intestinal, quando comparados com as linhagens de pacientes com gastrite sem metaplasia intestinal e daqueles com úlcera duodenal e gástrica. Constataram também, que a atividade inflamatória foi mais intensa e mais predominante no corpo gástrico nos pacientes portadores de cepas de *H. pylori* contendo CagA com níveis mais elevados de fosforilação. Papadacos *et al.* (2013), demonstraram que a fosforilação de CagA contendo o EPIYA C motif, resulta na secreção aumentada de IL-8 pelas células epiteliais gástricas, independente do número de EPIYAS. Em camundongos transgênicos, resistentes à fosforilação de CagA, Ohnishi *et al.* (2008) demonstraram que esses animais não apresentam hiperplasia de células epiteliais gástricas, leucocitose e nem neoplasia quando comparados com os não transgênicos; a partir desses resultados, esses autores classificaram CagA como uma oncoproteína. Álvares *et al.* (2006) verificaram em pacientes infectados com diferentes linhagens de *H. pylori*, que a inflamação, a atividade, atrofia e a metaplasia intestinal foram significativamente mais intensas nos pacientes infectados por amostras CagA-positivas em relação às negativas, e que 70,6% dos pacientes com câncer gástrico estavam também incluídos nas amostras cagA positivas. A infecção de gerbils com cepas de *H. pylori* contendo CagA produziu lesões de mucosa gástrica mais graves como a gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal do tipo incompleta, ao passo que os animais infectados com cepas CagA negativas desenvolveram apenas gastrite crônica, e a atrofia glandular foi encontrada em apenas um animal estudado (Ohnita *et al.*, 2005). Wiedemann *et al.* (2009) também verificaram risco aumentado para o câncer gástrico em gerbils infectados com cepas de *H. pylori* contendo CagA, quando comparados com animais infectados com uma outra forma mutante de CagA menos patogênica. Os autores verificaram também nos animais infectados por linhagens CagA positivas, um aumento tanto dos níveis de gastrina plasmática quanto do pH gástrico, ao passo que não houve alteração nos infectados com a forma mutante.

Outro gene denominado VacA exibe também um alto grau de patogenicidade e é encontrado em diferentes linhagens de *H. pylori* que pode conter ou não o gene cag PAID. Esse gene codifica uma citotoxina vacuolizante, a qual induz a formação de vacúolos citoplasmáticos em células eucariontes em cultura e em células epiteliais gástricas de pacientes infectados pelo *H. pylori*. (Chiozzi *et al.*, 2009; McClain *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2010). Já foi constatado também por alguns autores, a apoptose de células epiteliais gástricas induzida pelo gen VacA (Chiozzi *et al.*, 2009). Assim como observado no gene cag PAID, diferentes níveis de polimorfismo do gene VacA e sua localização no DNA, podem resultar em diferentes graus de patogenicidade. Diferentes autores mostraram uma correlação positiva entre a associação dos genes cag PAID e VacA com as formas mais graves das doenças gástricas (McClain *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2010; Marie, 2012).

2.5 Infecção pelo *Helicobacter pylori* e alterações na expressão de células G e D

Vários estudos têm sido propostos para avaliar a influência do *H. pylori* sobre a secreção ácida gástrica, assim como também com os seus mecanismos de controle. É bem demonstrado por alguns autores que a infecção pelo *H. pylori* resulta em um aumento da secreção ácida basal através da diminuição do controle inibitório dessa secreção pela redução de somatostatina, e pelo aumento da liberação de gastrina (Calam, 1996 e 1999). Por outro lado, os autores também observaram supressão dos receptores das células ECL e inibição das células parietais por produtos derivados da infecção pelo *H. pylori*, tais como N- α -metil histamina, agonista de receptores H1, H2 e H3 de histamina e de citocinas inflamatórias como o TNF α e Il-1 β , as quais são inibidores de células parietais.

Segundo Calam (1999), a infecção pelo *H. pylori* aumenta os níveis plasmáticos de gastrina através da enzima urease por ela secretada, a qual degrada a uréia e produz amônia, provocando elevação do pH intragástrico, que é capaz de estimular a síntese de gastrina. Além disso, o *H. pylori* libera N- α -metil histamina, o qual induz a liberação de gastrina pelas células G via receptores H2 de histamina.

Y Liu *et al.* (2005) demonstraram um aumento significativo na população de células G e uma diminuição na população de células D em pacientes dispépticos infectados pelo *H.*

pylori, quando comparados com pacientes portadores de gastrite e com mucosa gástrica normal, ambos não infectados. Em gerbils infectados com *H. pylori* foi observado aumento significativo tanto na população de células G, quanto na de células D quando comparados com aqueles não infectados (Barbuto, 2008). Em ratos infectados com *Helicobacter heilmanni*, foi demonstrado um aumento nos níveis de gastrina, no esvaziamento gástrico e na motilidade gástrica e, uma diminuição nos níveis de somatostatina antral sorológicas, quando comparados com o grupo controle (Duval-Araújo *et al.*, 2000). Konturek *et al.*, 1999, detectaram uma super expressão de gastrina em células tumorais gástricas, sugerindo que este hormônio é bem estabelecido como fator promotor de crescimento de células da mucosa oxíntica, podendo contribuir significativamente para a carcinogênese gástrica. Além disso, em um estudo subsequente, Konturek & Brzozowski (2006), demonstraram altos níveis plasmáticos de IL-8 e de gastrina em tecido tumoral gástrico.

Em camundongos, Zavros *et al.* (2002), demonstraram que o estômago responde à presença de inflamação através da redução dos níveis de somatostatina, e consequentemente, reduzindo a inibição das células G para a estimulação da secreção ácida gástrica pelas células parietais.

2.6 Infecção pelo *Helicobacter pylori* e alterações nas mucinas gástricas

A barreira protetora da mucosa gástrica é composta de uma camada constituída por muco e bicarbonato, uma barreira epitelial impermeável e a lâmina própria ricamente vascularizada. Próximo às células epiteliais existe uma camada de muco firmemente aderida e, da superfície luminal para essa camada, há uma outra camada frouxamente aderida, denominada de camada aderente. Alguns estudos têm mostrado que o pH na superfície epitelial (pH justamucosal) é neutro, em contraposição ao pH altamente ácido no lúmen gástrico, sendo a camada firmemente aderente a responsável pela manutenção desse pH neutro. Dessa maneira, a camada firmemente aderente, juntamente com o bicarbonato secretado pelas células epiteliais gástricas, formam um gradiente de pH neutro próximo às células epiteliais, mesmo ainda com um pH ácido luminal (Henriksna *et al.*, 2006).

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, sintetizadas por várias células epiteliais secretoras. Em uma mucosa gástrica normal, as mucinas produzidas incluem

as mucinas MUC1, MUC5AC e MUC6. A MUC1 associada à membrana é produzida pelas células foveolares e, em menor quantidade, pelas glândulas mucosas. A mucina MUC5AC é secretada principalmente pelas células do epitélio foveolar e é a principal constituinte da camada de gel da superfície. Já a secreção de MUC6 é limitada às glândulas mucosas, localizadas na lâmina própria. O *H. pylori* é encontrado principalmente nas camadas de muco gástricos, e raramente coloniza as porções inferiores da mucosa gástrica (Magalhães e Reis, 2010). Esses mesmos autores relatam que a mucina MUC1 associada a membrana, limita a ligação do *H. pylori* às células epiteliais gástricas pela inibição estérica de ligação a outros ligantes de superfície celular.

É bem documentado por alguns autores que pacientes infectados com *H. pylori*, apresentam uma diminuição na quantidade de mucinas poliméricas na superfície da mucosa gástrica com subsequente enfraquecimento da camada de muco firmemente aderida à superfície (Newton *et al.*, 1998). Também foi observado em camundongos infectados com linhagens de *H. pylori* isoladas de pacientes com gastrite, uma maior permeabilidade gástrica e uma diminuição na espessura da camada de muco firmemente aderente à superfície da mucosa (Henriksnas *et al.*, 2006). Os autores verificaram também uma inibição do transporte de bicarbonato através na superfície apical das células epiteliais gástricas, mediada provavelmente pela amônia resultante da atividade ureásica. Em ratos infectados pelo *Helicobacter felis*, Schmitz *et al.* (2009) verificaram uma perda de MUC5AC no corpo gástrico entre a 4ª e 16ª semanas após infecção. Essa perda correlacionou-se com gastrite e ocorreu antes das alterações celulares, como atrofia e a metaplasia intestinal. Babu *et al.* (2006) constataram uma diminuição das mucinas MUC5AC e MUC6 em casos de metaplasia intestinal, displasia e em carcinoma gástrico avançado de pacientes infectados pelo *H. pylori*. Além disso, observaram uma indução da expressão de MUC2 nos casos de metaplasia intestinal, e a partir desse achado, sugeriram MUC2 como marcador desse tipo de lesão. Radziejewska *et al.* (2011) demonstraram em humanos, um aumento nos níveis de MUC5AC e principalmente de MUC1 após a erradicação do *H. pylori*. Segundo esses mesmos autores, o *H. pylori* interfere com o processo de glicosilação das mucinas (MUC1 e MUC5AC), favorecendo a interação das adesinas bacterianas junto à superfície epitelial gástrica e a colonização pela bactéria. Além disso, o *H. pylori* libera urease, a qual degrada a uréia liberando amônia, que por sua vez eleva o pH gástrico.

Essa elevação de pH, resulta em uma diminuição da viscoelasticidade da camada de muco, tornando-a mais flúida, o que facilita a locomoção da bactéria por essa camada e posterior adesão às células epiteliais gástricas (Celli *et al.*, 2009).

2.7 Aspectos gerais das principais doenças gástricas provocadas pelo *H. pylori*

2.7.1 Gastrite crônica

Ao atravessar a camada de muco, o *H. pylori* adere às células epiteliais, secreta seus produtos tóxicos e desencadeia uma resposta inflamatória (Suzana *et al.*, 2009). Em contato com o epitélio, o *H. pylori* é capaz de induzir a síntese de citocinas pro-inflamatórias e de interferir com a integridade dos sistemas de adesão interepiteliais, o que leva a perda da função de barreira epitelial (Fiorentino *et al.*, 2013). Diferentes componentes do *H. pylori* são capazes de ativar ou inibir as funções de células epiteliais gástricas, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos T citotóxicos. Na infecção por essa bactéria, ocorre ativação de ambas as células Th1 e Th17, com consequente produção de IFN- γ , IL-17 e TNF- α . Além disso, o *H. pylori* secreta o peptidil proilil cis, o qual induz a liberação de IL-6 em macrófagos, dependente da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e MAPK (D’Elios & Czinn, 2014). Tal inflamação caracteriza-se inicialmente pela presença de infiltrado inflamatório agudo superficial composto por neutrófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos, sendo os neutrófilos indicadores muito sensíveis da presença do *H. pylori* (Dixon *et al.*, 1996; Yamaoka *et al.*, 2005;). A superfície do epitélio mostra mudanças degenerativas com perda de mucinas e exfoliação celular aumentada, ao passo que a lâmina própria torna-se edemaciada com a presença de células inflamatórias. A mucosa antral é atingida inicialmente, seguida pela mucosa oxíntica, aumentando de intensidade o infiltrado linfo-plasmocitário entre o 11º e 14º dia de infecção (Suzana *et al.*, 2009). Já a fase crônica da infecção caracteriza-se por infiltrado inflamatório constituído predominantemente por células mononucleares, com predileção pelas foveolas gástricas enquanto o infiltrado neutrofilico ativo, é observado nas regiões do colo glandular e epitélio foveolar. A gastrite crônica também é predominante no antro, e uma de suas características morfológicas marcantes é a presença de agregados linfóides com centros germinativos.

A patogênese da gastrite produzida pelo *H. pylori*, assim como suas doenças associadas, como mencionado anteriormente, está relacionada principalmente com o tipo de

linhagem dessa bactéria devido ao seu genótipo e ao grau de polimorfismo do mesmo (Jones *et al.*, 2009; Suzana *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2010). Linhagens de *H. pylori* que possuem o gene VacA predis põem o hospedeiro ao aparecimento de úlcera péptica, enquanto que as linhagens que possuem o gen Cag PAID, aumentam as chances de desenvolvimento de gastrite atrófica, carcinoma gástrico e úlcera péptica (Suzana *et al.*, 2009; Marie Mam, 2012).

O *H. pylori* também interfere com a migração inicial de células inflamatórias através da estimulação da produção de citocinas. Linhagens de *H. pylori* que possuem o gene cag PAID estimulam a produção de IL-8, uma quimiocina proinflamatória muito potente que está envolvida na gastrite induzida pela infecção por essa bactéria (Audibert *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2011; Papadakos *et al.*, 2013).

As principais doenças relacionadas com a gastrite *H. pylori* resultam de interações entre os fatores do hospedeiro, ambientais e fatores de virulência da bactéria que resultam em pólipos hiperplásicos, gastrite linfocítica, anemia, doença ulcerosa péptica, gastrite atrófica, duodenite e carcinoma gástrico (Kuipers & Malfertheiner, 2004).

Como resultado da evolução do processo inflamatório crônico e da própria interferência do *H. pylori*, diferentes tipos de alterações podem modificar o aspecto morfológico da gastrite, permitindo então fazer classificações baseado no padrão topográfico e na atividade da mesma, na presença ou ausência de metaplasia intestinal e atrofia (Stolte e Meining, 2001).

2.7.2 Gastrite crônica atrófica

A gastrite atrófica crônica (GCA) é um processo inflamatório caracterizado pela perda de tecido glandular decorrente de produtos da inflamação. Neu *et al.* (2003), demonstraram que o TNF α liberado durante a infecção pelo *H. pylori*, induz apoptose de células parietais contribuindo para o desenvolvimento de atrofia e hipocloridria e, a perda dessas células por sua vez, reduz a secreção de peptídios sinal, os quais modulam o crescimento e a diferenciação das células progenitoras gástricas, resultando em uma proliferação aumentada de células indiferenciadas. Posteriormente, esses tecidos perdidos são substituídos por tecido conjuntivo fibroso (atrofia não-metaplásica) ou por estruturas glandulares inapropriadas para o local (atrofia metaplásica). Mais

frequentemente, a transformação metaplásica assume o fenótipo das glândulas delimitadas pelo epitélio intestinal (metaplasia intestinal). Em gerbils, infectados pelo *H. pylori*, Murakami *et al.* (2013) demonstraram uma redução no conteúdo de caderina intercelular com posterior perda de células parietais, e substituição dessas por células mucosas.

Na mucosa oxíntica contudo, a metaplasia pode também adquirir a forma das glândulas antrais secretoras de mucinas (metaplasia pseudopilórica) (Rugge e Genta, 2005; Vannella, Lahner & Annibale, 2012).

Dados epidemiológicos sugerem que a GCA está associada com dois tipos diferentes de tumores, o câncer gástrico tipo intestinal e o carcinóide gástrico tipo I. É bem documentado por alguns autores que a inflamação causada pelo *H. pylori* pode progredir para a GCA, metaplasia intestinal, displasia e finalmente para o desenvolvimento do câncer gástrico (Vannella, Lahner & Annibale, 2012).

A metaplasia intestinal (MI) é comum na gastrite crônica de todas as causas e aumenta em prevalência com a duração da doença. O epitélio metaplásico pode ser reconhecido morfológicamente pela presença de células caliciformes, células absortivas, e células semelhantes às do cólon, pelo conteúdo de mucinas. Esse tipo de metaplasia tem sido classificada em três tipos principais de acordo com a sua morfologia e o conteúdo de glicoproteínas identificadas através da reação histoquímica de PAS/Alcian Blue em pH 2,1 a 2,5, a qual cora glicoproteínas ácidas, e reação de PAS, a qual marca mucinas neutras presentes na superfície e epitélio foveolar e glândulas mucosas de mucosa gástrica não metaplásica (Dixon *et al.*, 1996).

a) Tipo I – completa – células caliciformes contendo sialomucinas são entremeadas por células absortivas não secretoras com bordas em escova bem delineada.

b) Tipo II – células caliciformes contendo sialomucinas são espalhadas entre células do tipo gástricas contendo mucinas neutras ou sialomucinas.

c) Tipo III – é caracterizada por criptas tortuosas e ramificadas lineadas por células colunares altas contendo sulfomucinas abundantes com menor número de células caliciformes contendo sialomucinas ou sulfomucinas. Pacientes com MI do tipo III tem de 2,7 a 5,8 vezes mais risco de desenvolver o câncer gástrico (Dixon *et al.*, 1996).

2.7.3 Doença ulcerosa péptica (DUP)

A úlcera péptica é uma lesão escavada e de bordas bem definidas, resultante da destruição da camada mucosa e que se estende até a submucosa ou a regiões mais profundas, em consequência da digestão pelo suco gástrico. Embora possa ocorrer também em outras porções do tubo gastrointestinal, as úlceras pépticas duodenais e as gástricas são as mais frequentes.

Durante muitos anos, a fisiopatologia da DUP fundamentou-se somente no desequilíbrio entre os fatores defensivos e agressivos da mucosa gástrica e/ou duodenal (DeCross & Marshall, 1993). Em 1985, Marshall, McGeehie e Rogers, verificaram que o *H. pylori* era o responsável pela colonização da mucosa antral no bulbo duodenal, dando origem a inflamação crônica. Entretanto, esses autores consideraram a presença do epitélio gástrico na mucosa duodenal como primário ou congênito, e posteriormente, verificaram que era de origem metaplásica. A patogênese dessa metaplasia é controversa; Shaoul *et al.* (2000), sugeriram que a transformação de células caliciformes locais para células com fenótipo de células epiteliais gástricas, era devido a resposta inflamatória. Entretanto, é comum a presença de metaplasia gástrica sem inflamação, o que pode ser atribuído a uma resposta adaptativa à secreção ácida aumentada (Gaskin *et al.*, 1975; Tatsuta *et al.*, 1989). Pacientes com DUP apresentam secreção ácida gástrica aumentada quando comparados com indivíduos saudáveis, e quando são *H. pylori* positivos, apresentam hipergastrinemia e sensibilidade aumentada a gastrina (Walker e Dixon, 1996). Em humanos, existe correlação positiva entre a presença e extensão de metaplasia com a secreção ácida máxima (Kreuning e Wal, 1989).

2.7.4 Gastrite crônica atrófica e o câncer gástrico

Desde 1994 o *H. pylori* é considerado carcinógeno do grupo I pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) da Organização Mundial de Saúde (IARC, 1994; Asaka *et al.*, 1998). Além disso, a gastrite crônica tem sido epidemiologicamente e biologicamente correlacionada com o desenvolvimento do câncer gástrico (Correa, 1988; Rugge & Genta, 2005).

Dados epidemiológicos sugerem que a extensão, intensidade e padrões de distribuição da inflamação gástrica e da atrofia correlacionam-se significativamente com a incidência do câncer gástrico (Rugge & Genta, 2005). Em geral, a inflamação induzida pela infecção *H. pylori* é uma gastrite crônica ativa, caracterizada por infiltrado linfocítico e neutrofílico na mucosa gástrica. A partir do infiltrado inflamatório, focos de metaplasia intestinal e atrofia da mucosa, agregados e folículos linfoides, ocorrem concomitantemente, e o epitélio foveolar é substituído por um epitélio regenerativo com reduzida secreção de mucinas (Stolte & Meining, 2001).

Embora tenha ocorrido uma redução global em sua incidência, o carcinoma gástrico do tipo intestinal permanece como a segunda causa de morte relacionada ao câncer. Devido ao fato de seu diagnóstico ser frequentemente tardio e, no seu estágio avançado, as opções terapêuticas serem escassas e com alta taxa de mortalidade, o conhecimento das lesões precursoras dessa neoplasia maligna contribui para antecipar o seu diagnóstico em um estágio precoce, quando a cirurgia e a quimioterapia oferecem um melhor prognóstico (Vannella, Lahner & Annibale, 2012). Alguns estudos apontam para uma maior frequência das lesões gástricas malignas em indivíduos com mais de 50 anos de idade, portadores de gastrite crônica atrófica (Vannella *et al.*, 2010). A metaplasia intestinal do corpo gástrico e a pangastrite são fatores de risco importantes para a progressão da GCA para o CG (Vannella *et al.*, 2010).

2.7.5 Gastrite crônica atrófica e o tumor neuroendócrino do tipo I

O tumor neuroendócrino do tipo I (TI GC) deriva de células ECL as quais estão localizadas no fundo e corpo gástricos. Esse tipo de tumor é classificado nos tipos I, II e III. O tipo I está associado com a gastrite crônica atrófica e constitui cerca de 80% de todos os carcinóides gástricos. O tipo II está associado com a gastropatia hipertrófica e o tipo III não está relacionado a alguma entidade patológica específica (Rindi *et al.*, 1996). A gastrina liberada pelas células G no antro, estimula a liberação de histamina pelas células ECL e produz efeito trófico sobre as mesmas. Na GCA, a perda de tecido glandular no corpo induz acloridria e hipergastrinemia crônica, a qual causa hiperplasia das células ECL e, às vezes, o desenvolvimento do TI GC (Bordi *et al.*, 1995, Vannella, Lahner & Annibale, 2012).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do TI GC tipo I, destaca-se a presença de displasia das células ECL, a qual está frequentemente associada com o TI GC. Esta lesão é considerada como o precursor verdadeiro do carcinóide gástrico e pode representar o sinal de uma lesão carcinóide concomitante (Annibale *et al.*, 2001).

2.7.6 Linfoma de tecido linfóide associado a mucosa gástrica – linfoma MALT

O linfoma de células B de tecido linfóide associado a mucosa gástrica (MALT) é um linfoma que se origina do tecido linfóide da mucosa, normalmente adquirido como uma reação à infecção pelo *H. pylori* (Eck *et al.*, 1997). Esses mesmos autores verificaram em um grupo de pacientes com este tipo de linfoma, 98,5% de positividade para *H. pylori* e 95,5% de positividade para a proteína CagA. O desenvolvimento deste linfoma necessita de várias etapas, iniciando pela infecção *H. pylori*, a qual induz alterações genéticas e subseqüentes transformações malignas. Dentre as alterações genéticas, destacam-se a translocação dos cromossomos t(11;18)(q21;q21) associada com a expressão da proteína nuclear BCL10, as quais estão relacionadas com a resistência à terapia pela erradicação do *H. pylori* (Yepes *et al.*, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, não existem estudos experimentais que utilizaram linhagens de *H. pylori* contendo diferentes níveis de fosforilação de CagA para avaliar se, assim como observado em humanos, o maior número de sítios fosforilados aumenta a frequência e a intensidade das lesões gástricas. Utilizando o modelo experimental proposto neste estudo, também parece não existir estudos quantitativos sobre o número de células G e D e, a expressão imuno-histoquímica de mucinas gástricas. Além disso, ainda não há um padrão universal para a quantificação de células inflamatórias presentes em uma mucosa gástrica normal e inflamada, análise esta que é fundamental para a graduação das gastrites e para a predição da progressão da doença. Diante do exposto, propusemos nesse trabalho, estudar a interferência da infecção por linhagens de *H. pylori* com diferentes níveis de fosforilação de CagA, com a intensidade da gastrite, através de um método semi-quantitativo (classificação de Sydney) e de um método morfométrico digital, e as lesões pré-cancerosas, bem como sobre o número de células G e D e a expressão das mucinas MUC1 e MUC5AC na mucosa gástrica, em um modelo experimental que mais se assemelha à infecção humana.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da infecção com linhagens de *H. pylori* contendo diferentes números de sítios de fosforilação de CagA sobre a mucosa gástrica de gerbils Mongolian, após quarenta e cinco dias e, seis meses de infecção.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Realizar análise macroscópica e histopatológica de acordo com o protocolo de Sydney;

4.2.2 Realizar análise quantitativa do infiltrado inflamatório e da área de lâmina própria;

4.2.3 Realizar análise quantitativa das células G e D imunomarcadas;

4.2.4 Realizar análise quantitativa da expressão imuno-histoquímica das mucinas MUC1 e MUC5AC;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Linhagens de *H. pylori* usadas para inoculação

As técnicas de isolamento das amostras, extração de DNA, sequenciamento e teste da urease rápida (RUT) realizados são as mesmas descritas por Batista (2014).

5.2 Grupos de Animais e Inoculação

Quarenta e oito gerbils fêmeas com três meses de idade, foram divididos em três grupos experimentais: um grupo controle consistindo de animais não infectados (CTRL), os quais receberam apenas caldo Brucella, animais tratados com linhagem de *H. pylori* CagA-positiva contendo um segmento EPIYA-C (CagA1Ep), e animais inoculados com linhagem de *H. pylori* com três segmentos EPIYA-C (CagA3Ep). Cada grupo foi constituído de 16 animais; oito animais de cada grupo foram sacrificados 45 dias após a infecção, e os oito animais restantes foram sacrificados seis meses após a infecção.

Previamente a inoculação, os animais foram mantidos em jejum por oito horas e ligeiramente sedados com isoflurano. O inóculo de 0,8 ml das suspensões bacterianas contendo 10^9 CFU/ml em caldo Brucella estéril ou apenas caldo Brucella (grupo CTRL) foi administrado por gavagem intragástrica três vezes em intervalos de 48 horas. Quatro horas após a inoculação, os animais receberam ração padrão para ratos (Labina®, Purina, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA – UFMG), protocolo 27/2009.

5.3 Necropsia, processamento e análise histopatológica do estômago

Foi feita uma incisão abdominal, o estômago foi removido, aberto pela grande curvatura, sendo expostas as mucosas do corpo e antro gástricos. Em seguida, o estômago foi distendido sobre um recipiente de plástico contendo solução salina, lavado e procedida a coleta de fragmentos de mucosa, de aproximadamente 2,0 x 0,5 centímetros, ao longo da pequena e grande curvatura, abrangendo as regiões do corpo e antro gástricos, para o processamento dos fragmentos para análise histopatológica, DNA e RUT. Para o processamento histológico, esses fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% por um período de 48hs. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e obtidos cortes

com 4 micrômetros de espessura para coloração pela Hematoxilina & Eosina (H&E) para análise histológica, coloração pela prata para avaliação semi-quantitativa da bactéria espiral em escala (0-3) nas glândulas gástricas e para as reações imuno-histoquímicas (identificação das células G e D e, das mucinas MUC1 e MUC5AC). Na análise da coloração pela prata, um único microorganismo ou não mais que dois pequenos grupos de microorganismos corados pela prata foram classificados como da escala 1; três a seis grupos de microorganismos foram classificados como da escala 2; e mais de seis, como da escala 3 (Wirth Hans-Pete *et al.*, 1998). Os cortes corados pela H&E foram utilizados para análise histopatológica e classificação da gastrite através do sistema Sydney (Dixon *et al.*, 1996), bem como para a análise morfométrica do infiltrado inflamatório e para o cálculo da área de lâmina própria antral. Em alguns fragmentos, para confirmar a presença de metaplasia intestinal, foi empregada a técnica PAS-Alcian Blue, pH 2,1 a 2,5, a qual cora mucinas ácidas.

5.4 Classificação e graduação da gastrite pelo sistema Sydney

A inflamação foi graduada de acordo com o sistema Sydney em: ausente (ausência de células inflamatórias), discreta (inflamação restrita ao terço basal da mucosa), moderada (inflamação presente nos dois terços basal e médio da mucosa) e intensa (inflamação presente em toda a espessura da mucosa) (Figura 3b). Já a atividade inflamatória foi classificada de acordo com a presença de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) na mucosa em: ausente (ausência de PMN), discreta (PMN restritos ao terço basal da mucosa), moderada (PMN presentes nos dois terços basal e médio da mucosa) e intensa (PMN presentes em toda a espessura da mucosa) (Figura 3a). Além do processo e atividade inflamatórias, foram classificadas também outras lesões histopatológicas como a atrofia, metaplasia intestinal e a displasia, obedecendo o mesmo padrão de classificação descrita acima (Figuras 6d e (e)) (Dixon *et al.*, 1996). Além das demais lesões mencionadas, foram quantificados também os folículos linfóides.

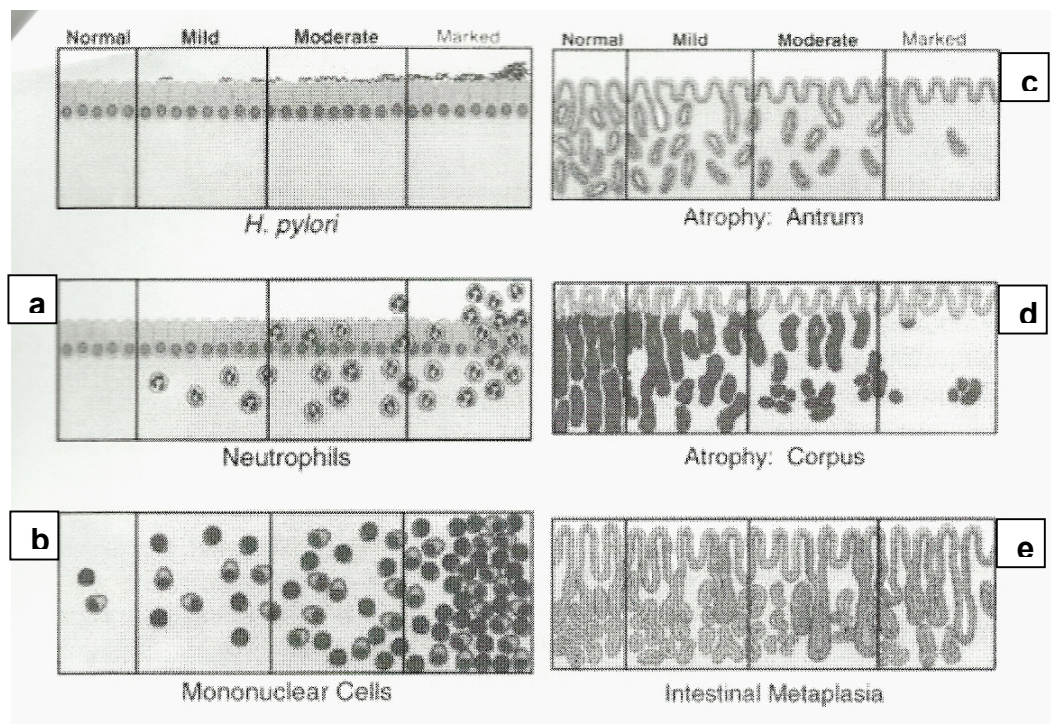


Figura. 3 - Padrão de classificação da gastrite e de sua atividade de acordo com o sistema Sydney. DIXON MF et al., Classification and grading of gastritis: The Updated Sydney System. The American Journal of Surgical Pathology, 20:1161-1181, 1996.

A classificação e a graduação da gastrite pelo sistema Sydney foram realizadas por um único observador.

5.5 Reações imuno-histoquímicas para células G e D

Foram utilizados os mesmos fragmentos de mucosa gástrica para a obtenção de outros cortes para as reações imuno-histoquímicas. Os cortes foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em tampão fosfato (PBS) pH 7,2. Foi realizado o reaproveitamento antigênico com a solução Dako Retrieval (Dako, USA) à 100°C por vinte minutos. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 30vv a 3,5% em 200 mL de PBS por vinte minutos e os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando os cortes com soro de cabra diluído em solução de BSA a 0,1% na concentração de 1:40, por quarenta minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados por um período de 16 a 18 hs à 4 °C, com os seguintes anticorpos policlonais de coelho: anti-gastrina NCL-GASP (diluído em solução de BSA a 0,1% na concentração de 1:150; Novacasta

Laboratories, Newcastle, UK) e anti-somatostatina (diluído em solução de BSA a 0,1% na concentração de 1:500; Abcam, Cambridge, USA). Em seguida, os cortes foram lavados em PBS; incubados com IgG biotinizada de cabra anti-coelho (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA), diluídos a 1:50 e 1:100, respectivamente, ambos por 1 hora cada à temperatura ambiente. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2% por três minutos. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS em alguns cortes de antro normal de gerbils. Como controles positivos, também foram utilizados cortes histológicos de antro normal de gerbils. Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris diluída em água destilada a 60% e montados em entelan.

5.6 Reações imuno-histoquímicas para mucinas MUC1 e MUC5AC

Para identificação das mucinas MUC1 e MUC5AC, foram utilizados anticorpos primários anti-MUC 1 e anti-MUC5AC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), diluídos em solução de BSA a 0,1% na concentração de 1:80. Posteriormente, foram utilizados anticorpos secundários de cabra anti-camundongo e cabra anti-coelho para MUC1 e MUC5AC, respectivamente, diluídos a 1:50, por uma hora à temperatura ambiente. Todos os procedimentos subsequentes destas reações foram semelhantes aos já descritos para a identificação da gastrina e somatostatina.

5.7 Análise morfométrica do infiltrado inflamatório e da área de lâmina própria antral

Foram utilizadas nesta análise, cortes histológicos corados pela H&E de todos os animais dos grupos CTRL, CagA1EP e CagA3EP, nos dois períodos de infecção. Todos os cortes histológicos foram visualizados pela objetiva de 40X para digitalização de 15 imagens da mucosa gástrica antral através da microcâmera Q-Color3 (Olympus, Toquio, Japão), perfazendo uma área total de $1,37 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ de mucosa analisada em cada caso. Uma seqüência de algoritmos do programa KS300 acoplado ao analisador de imagem Carl Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) foi elaborada para o processamento das imagens, segmentação, definição das condições de morfometria, contagem das células e cálculo da área de lâmina própria (Caliari, 1997). As técnicas de processamento de imagens foram aplicadas para evidenciar os núcleos das células. Através da

segmentação, foram selecionados os pixels dos núcleos de todos os tipos celulares presentes na lâmina própria da mucosa antral e excluídos aqueles do citoplasma celular e de outras estruturas do corte histológico. Mediante este processo, foi criada uma imagem binária e contados os núcleos de todos os tipos celulares presentes na mucosa antral. A contagem obtida nos animais controles foi considerada como o padrão normal de celularidade da mucosa antral, sem infiltrado inflamatório. Já nos animais infectados, foram contados os núcleos dos tipos celulares normalmente presentes na lâmina própria da mucosa antral e os núcleos dos leucócitos recrutados no processo inflamatório, permitindo a avaliação quantitativa da inflamação através de metodologia já utilizada em outros trabalhos (Maltos *et al.*, 2004, Pacheco *et al.*, 2008, Mendes *et al.*, 2010). Em seqüência, foram selecionados todos os pixels da lâmina própria para a obtenção de outra imagem binária e o cálculo da área em μm^2 .

5.8 Análise quantitativa das células G e D e, das mucinas MUC1 e MUC5AC

Todas as células G e D positivas de todos os animais dos grupos CTRL, CagA1EP e CagA3EP, nos dois períodos de infecção, foram contadas através do mesmo programa de morfometria citado no item anterior. Uma área total de $4,77 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ da mucosa gástrica antral de cada animal foi digitalizada através da objetiva de 20X, utilizando a microcâmera Q-Color3 (Olympus; Tokyo, Japan). O número de células G e D nos animais controles foi considerado como padrão normal quantitativo destas células na mucosa antral de gerbils mongolian sadios.

Para a avaliação da expressão de MUC1 e MUC5AC foi medida a área da marcação imuno-histoquímica na mucosa antral de todos os animais de todos os grupos, nos dois períodos de infecção. Todos os cortes histológicos foram observados através da objetiva de 20X, sendo digitalizados $9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de mucosa antral de cada animal por meio da microcâmera Q-Color3 (Olympus, Toquio, Japão). Para o cálculo da área, foi utilizada uma seqüência de algoritmos construída no mesmo programa de morfometria, utilizando metodologia semelhante ao descrito por Oliveira *et al.* (2012). Através da segmentação de imagens, foram selecionados todos os pixels com tons de marron, referentes às marcações imuno-histoquímicas, para a criação de imagens binárias e o subsequente cálculo da área em μm^2 . A área positiva de MUC1 e MUC5AC nos animais controles foi considerada como o padrão normal de expressão destas mucinas em gerbils mongolian sadios.

5.9 Análise Estatística

A comparação entre o grau de inflamação e atividade da gastrite entre os grupos foi avaliada pelo teste bicaudal Mann-Whitney U. Uma vez que o número de células inflamatórias e a área da lâmina própria antral não foram normalmente distribuídas, mesmo após a transformação log, os dados morfométricos foram comparados entre os diferentes grupos e períodos de infecção pelo teste bicaudal Mann-Whitney U. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

Também para a análise das células G e D e para as áreas imunopositivas de MUC1 e MUC5AC, os dados foram comparados entre os diferentes grupos e períodos de infecção pelo teste bicaudal Mann-Whitney U. Além disso, o teste de correlação de Pearson foi usado para comparar o número de células inflamatórias e de células G e D, e as áreas de MUC1 e MUC5AC.

6. RESULTADOS

6.1 Identificação do *H. pylori*

O teste RUT foi positivo em 84,4% dos animais infectados e negativo em todos os animais controle. Os genes *ureA* assim como também o *cagA* foram presentes na mucosa gástrica de 29 (90.6%) dos animais infectados, mas não na mucosa gástrica dos animais controle. A reação de PCR para detectar o número de segmentos EPIYA-C foi positiva tanto nos animais com 45 dias, quanto nos animais com seis meses de infecção. Os resultados da PCR foram confirmados pelo sequenciamento, sem diferenças antes e após a inoculação (Figuras 4c e 4d). Os genes de virulência permaneceram presentes como detectados pela PCR.

Nos animais inoculados, o grau de microorganismos espiralados corados pela prata variou de 1 a 3 (mediana =2), sem diferenças entre os grupos infectados com linhagens contendo um ou três segmentos EPIYA-C. A carga bacteriana foi mais alta na mucosa antral do que na mucosa oxíntica gástricas, mas nenhuma associação entre as alterações histológicas gástricas e o grau de carga bacteriana foi observada, aos 45 dias ou aos seis meses após a infecção.

6.2 Análise macroscópica da mucosa gástrica

Aos 45 dias de infecção, nenhum animal apresentou qualquer alteração macroscópica da mucosa oxíntica e ou antral ao compararmos com a mucosa gástrica dos animais do grupo CTRL (Figura 5a). Aos seis meses de infecção, um animal do grupo CagA1Ep apresentou lesão plana, não ulcerada, de coloração vinhosa de aspecto hemorrágico sobre a mucosa oxíntica (Figura 5b). Em um animal do grupo CagA1Ep e em quatro animais do grupo CagA3Ep, houve expansão da área da mucosa antral com consequente diminuição da mucosa oxíntica, sendo que em um animal do grupo CagA3Ep, a extensão da mucosa antral foi de intensidade bem maior, com desaparecimento quase total da mucosa oxíntica (Figura 5c).

6.3 Classificação e graduação da gastrite pelo sistema Sydney

Em todos os animais dos grupos CagA1Ep e CagA3Ep com 45 dias de infecção, foi observada a presença de inflamação principalmente na lâmina própria antral, bem como no epitélio, com infiltrado inflamatório constituído principalmente de

polimorfonucleares neutrófilos (PMN) e também por linfócitos, macrófagos e plasmócitos, sendo mais intensa na base da mucosa e estendendo-se até o seu terço médio (Figura 6a,b). Na mucosa antral de todos os animais do grupo CTRL foram encontradas escassas células inflamatórias, que foi considerado como padrão esperado de celularidade da lâmina própria antral de gerbils dessa faixa etária. A inflamação foi discreta na maioria dos animais do grupo CagA1Ep, enquanto que no grupo CagA 3Ep, a inflamação aumentou de intensidade, com cinco animais apresentando inflamação moderada. Um maior grau de atividade da gastrite ($p=0,03$) foi observado no grupo CagA3Ep quando comparado com o grupo CagA1Ep, e uma tendência de maior intensidade de gastrite, foi observada nos animais do grupo CagA3Ep ($p=0,1$). Este grupo também mostrou maior número de folículos linfóides na mucosa gástrica (Tabela 1).

Após seis meses de infecção, o processo inflamatório também foi mais frequente na mucosa antral. Entretanto, nos grupos CagA1Ep e CagA3Ep, a inflamação atingiu de forma discreta, também o corpo gástrico em três e dois animais, respectivamente (Figura 6c,d,e,f). O número de células mononucleares ($p=0,01$) e de células PMN ($p=0,04$) foi mais pronunciado nos animais com seis meses de infecção do que nos animais com 45 dias (Tabela1). O infiltrado inflamatório foi presente na lâmina própria e epitélio das mucosas oxíntica e antral, sendo mais intenso na base e estendendo até o seu terço médio na maioria dos animais, principalmente naqueles do grupo CagA3Ep. O infiltrado inflamatório também alcançou o terço apical da mucosa em um animal do grupo CagA3Ep (Figura 6e,f). Na mucosa antral de todos os animais do grupo CTRL, semelhante ao observado nos animais controles do grupo de 45 dias de infecção, foram encontradas também escassas células inflamatórias, que foi considerado como padrão esperado de celularidade da lâmina própria antral de gerbils dessa faixa etária.

Diferenças significativas foram observadas em relação a todos os parâmetros quando os animais do grupo CTRL foram comparados com os animais do grupo CagA3Ep em todos as análises ($p<0,001$) e com os animais do grupo CagA1Ep com relação às células mononucleares ($p<0,001$) após 45 dias e seis meses de infecção, células PMN ($p=0,003$) com 45 dias após a infecção e células PMN ($p=0,001$) seis meses após a infecção (Tabela 1).

Tabela 1 Inflamação Gástrica, atividade inflamatória e o número de folículos linfóides em gerbils infectados com *Helicobacter pylori* aos 45 dias e aos seis meses pós-inoculação.

Grupos	Inflamação (células MN)				Atividade (células PMN)				FL
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	
45 dias									
CTRL	8	0	0	0	8	0	0	0	0
CagA1Ep	0	6	2	0	2	6	0	0	3
CagA3Ep	0	3	5	0	0	5	3	0	12
Seis meses									
CTRL	8	0	0	0	8	0	0	0	0
CagA1Ep	0	2	6	0	1	4	3	0	13
CagA3Ep	0	1	4	3	0	2	3	3	15

MN, células mononucleares; PMN, células polimorfonucleares; CTRL, grupo controle consistindo de animais não infectados; CagA1Ep, grupo CagA-positivo com um EPIYA C; CagA3Ep, grupo CagA-positivo com três EPIYA C; 0, ausente; +, discreta; ++ moderada; +++, intensa; FL, folículos linfóides. ($p < 0,001$ para células mononucleares com 45 dias e seis meses de infecção e $p = 0,003$ para células PMN com 45 dias e $p = 0,001$ para células PMN com seis meses de infecção, e CagA3Ep ($p < 0,001$ para todos os análises. Diferenças significantes foram observadas em relação a todos os parâmetros quando os controles foram comparados com os animais CagA3Ep em todos os análises ($p < 0,001$) e com os animais CagA1Ep em relação às células mononucleares ($p < 0,001$) após 45 dias e seis meses de infecção. Células PMN ($p = 0,003$) com 45 dias pós-infecção e células PMN ($p = 0,001$) seis meses pós-infecção.

Ao contrário do observado nos animais com 45 dias de infecção, a inflamação foi moderada na maioria dos animais dos grupos CagA1Ep e CagA3Ep; entretanto, no grupo CagA3Ep, a inflamação ocorreu de forma intensa em dois animais. A atividade inflamatória foi predominantemente moderada no grupo CagA1Ep e chegou a ser intensa em três animais do grupo CagA3EP. Os folículos linfóides foram numerosos em todos os grupos de animais infectados, não havendo diferença significativa entre eles

(Tabela 2). Além disso, houve aumento significativo de células PMN ($p=0,05$) na mucosa gástrica dos animais do grupo CagA3Ep quando comparados com o grupo CagA1Ep, e uma tendência de aumento no número de células mononucleares no grupo CagA3Ep comparado com o grupo CagA1Ep ($p=0,1$) (Tabela 1).

Outras lesões tais como atrofia, metaplasia intestinal e displasia foram também observadas, mas não nos animais do grupo CTRL (Figura 7a,b,c,d). Quando foi analisada a soma de todas as lesões, uma diferença significativa foi observada entre os grupos CTRL e CagA3Ep ($p<0,001$) assim como também no grupo CagA1Ep ($p=0,003$) (Tabela 2) e uma tendência de associação ($p=0,08$) quando o grupo CagA3Ep (14 de 24 – 58.3%) foi comparado com o grupo CagA1Ep (8 de 24 – 33.3%) (Tabela 2).

Tabela 2 Lesões na mucosa gástrica de gerbils do grupo controle e dos grupos com seis meses de infecção pela *Helicobacter pylori*

Grupos	Metaplasia Intestinal				Atrofia				Displasia			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
CTRL	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0
CagA1Ep	6	2	0	0	4	3	1	0	6	2	0	0
CagA3Ep	4	4	0	0	1	4	3	0	5	3	0	0

CTRL, grupo controle consistindo de animais não infectados; CagA1Ep, grupo CagA-positivo com uma EPIYA C; CagA3Ep, grupo CagA-positivo com três EPIYA C ; 0, ausente; +, discreta; ++ moderada; +++, intensa.

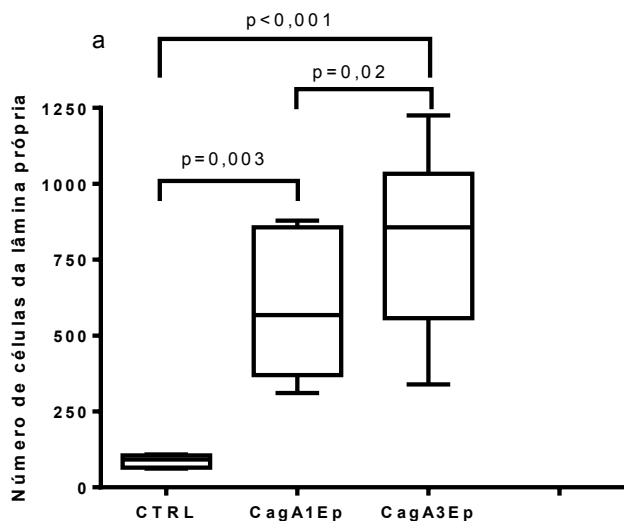
6.4 Análise morfométrica do infiltrado inflamatório e da área de lâmina própria

Aos 45 dias após a infecção, houve um significativo aumento no número de células inflamatórias quando comparados os grupos de animais infectados com os animais não infectados ($87,17 \pm 7,82$) ($p=0,003$). O número de células inflamatórias foi significativamente mais alto no grupo CagA3Ep ($816,5 \pm 103,0$) do que no grupo CagA1Ep ($606,8 \pm 81,59$) ($p=0,03$) (Gráfico 1a). Confirmando esses resultados, a área da lâmina própria ocupada pelo infiltrado inflamatório após o mesmo período de infecção, foi também significativamente maior em ambos os grupos de animais infectados do que no grupo CTRL ($9.594 \pm 780,2 \mu\text{m}^2$) ($p=0,003$) (Gráfico 1b). Os

animais do grupo CagA3Ep mostraram uma maior área de lâmina própria ($94.770 \pm 9.487 \mu\text{m}^2$) do que os animais do grupo CagA1Ep ($62.450 \pm 7.319 \mu\text{m}^2$) ($p=0,01$).

Aos seis meses após a infecção, houve número significativamente maior de células inflamatórias e maior área da lâmina própria antral em ambos os grupos de animais infectados quando comparados com o grupo CTRL ($166,4 \pm 36,85$) ($14590 \pm 1384 \mu\text{m}^2$) ($p=0,004$) (Gráfico 1c,d). Adicionalmente, foi observado infiltrado inflamatório significativamente maior ($1.853 \pm 333,8$) ($p=0,03$) e uma maior área de lâmina própria ($122900 \pm 32070 \mu\text{m}^2$) ($p=0,05$) no grupo CagA3Ep do que no grupo CagA1EP (1227 ± 2186) ($102200 \pm 13620 \mu\text{m}^2$).

Um elevado número de células ($p=0,007$) e uma maior área de lâmina própria foram também observados na mucosa gástrica dos animais com seis meses após a infecção quando comparados com os animais 45 dias após a infecção ($p = 0,05$).



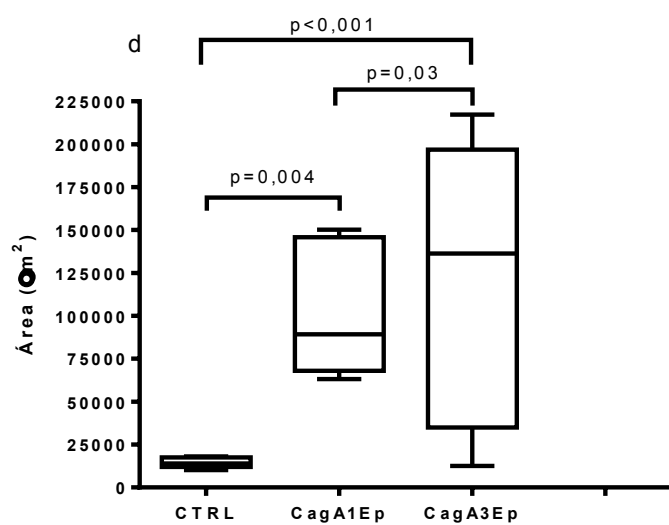
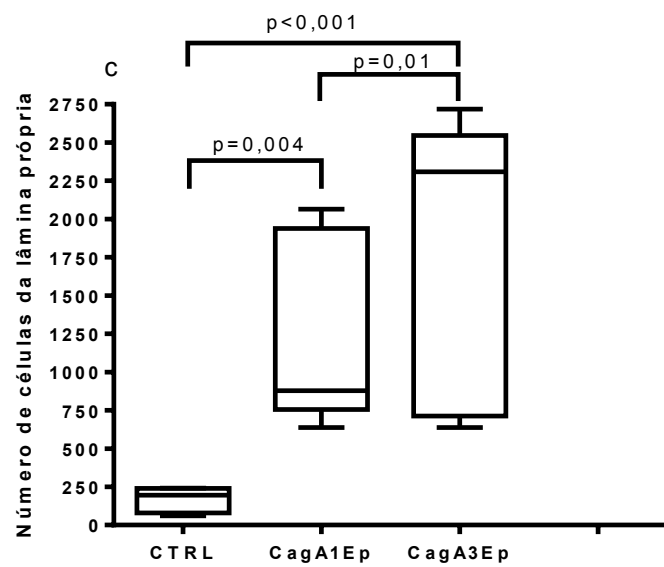
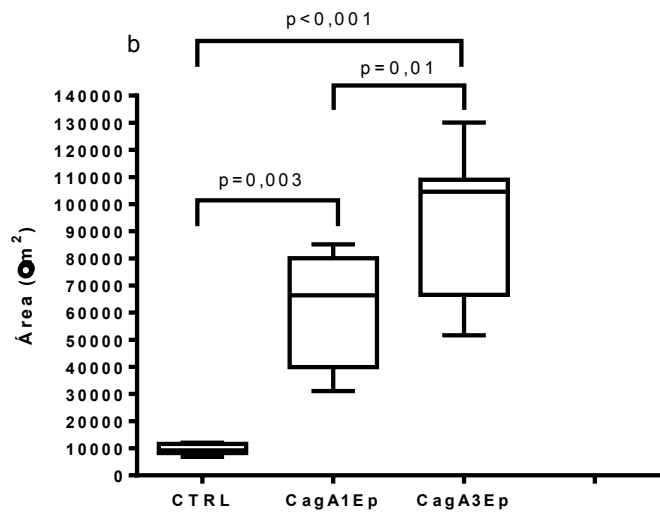


Gráfico 1 - Número total de células e da área de lâmina própria da mucosa gástrica antral de gerbils infectados com linhagens de *H. pylori* produtora de proteína CagA, contendo um ou três sítios de fosforilação C, e de animais não infectados aos 45 dias (a,b) ou seis meses após a infecção (c,d). Cada grupo é composto por oito animais. Os limites superiores e inferiores das caixas representam os percentuais 75% e 25%, respectivamente. A barra horizontal em toda a caixa indica as barras de mediana, e as preenchidas, indicam os valores máximo e mínimo de dados. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney U.

6.5 Imuno-histoquímica

6.5.1 Análise quantitativa das células G e D

A imunorreatividade positiva para as células G e D foi identificada pela coloração citoplasmática marrom-escuro. A maioria das células G e D estavam localizadas nos terços basal e médio das glândulas gástricas.

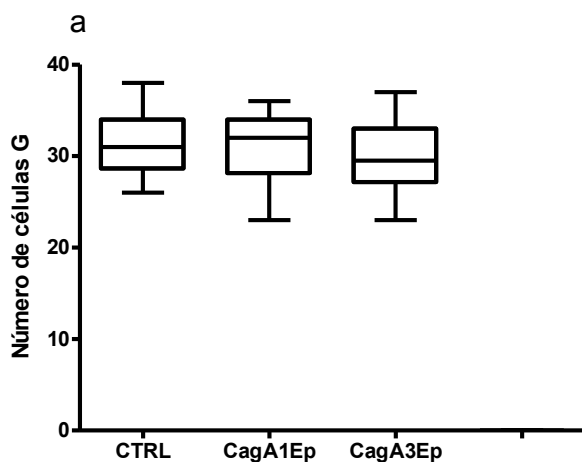
Os resultados da análise quantitativa das células G e D marcadas pela imuno-histoquímica, bem como a relação células G/D, estão apresentados no gráfico 2.

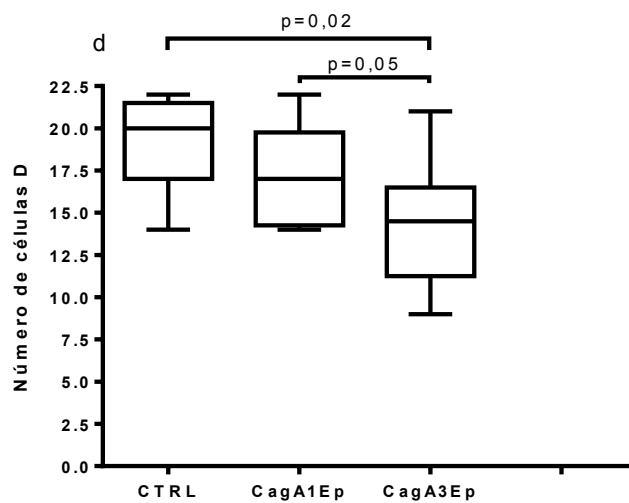
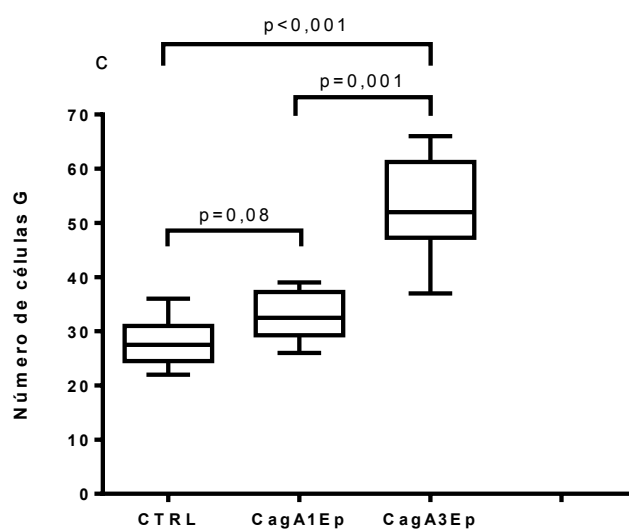
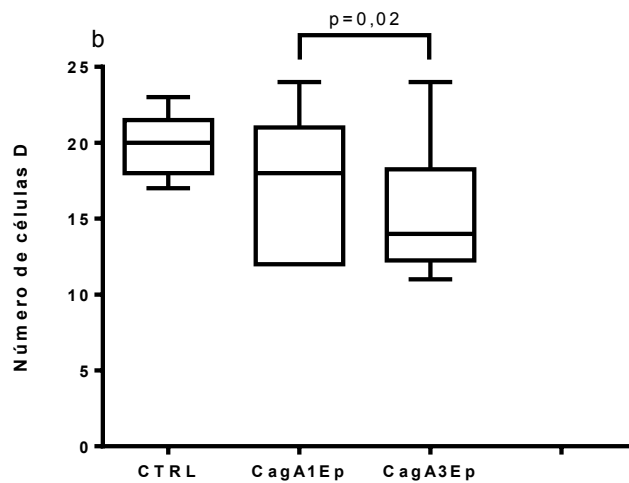
Após 45 dias de infecção, o número de células G no antro gástrico foi $31,38 \pm 1,42$ no grupo CTRL, $30,71 \pm 1,61$ no grupo CagA1EP e, $29,88 \pm 1,56$ no grupo CagA3EP, não havendo diferenças significativas entre os três grupos. No mesmo período de infecção, o número de células D foi de $19,75 \pm 0,72$ no grupo CTRL, $17,29 \pm 1,67$ no grupo CagA1EP e, $15,38 \pm 1,51$ no grupo CagA3EP, sendo significativamente mais baixo no grupo CagA3EP quando comparado com o grupo CTRL ($p=0,02$). A relação células G/D foi igual a $1,59 \pm 0,07$ no grupo CTRL, $1,83 \pm 0,12$ no grupo CagA1EP e $2,03 \pm 0,17$ no grupo CagA3EP, com uma proporção significativamente maior de células G/D no grupo CagA3EP do que no grupo CTRL ($p=0,04$). Nenhuma outra diferença entre os grupos foi observada.

Após seis meses de infecção, o número de células G foi significativamente maior no grupo CagA3Ep comparado com o grupo CTRL ($p<0,001$) e com o grupo CagA1Ep ($p=0,001$). Uma tendência de diferença foi observada entre os grupos CagA1Ep e CTRL ($p=0,08$) (Gráfico 2 -1B). A contagem média foi de $27,88 \pm 1,56$ no grupo CTRL, $32,75 \pm 1,57$ no grupo CagA1Ep, e $52,63 \pm 3,28$ no grupo CagA3Ep. Foi observado também, um número significativamente mais baixo de células D no grupo CagA3Ep, quando comparado com o grupo CagA1Ep. A contagem média foi $19,25 \pm 0,99$ no

grupo CTRL, $17,25 \pm 1,03$ no grupo CagA1Ep, e $14,25 \pm 1,31$ no grupo CagA3Ep (Gráfico 2 -1B). Como esperado, o aumento na contagem de células G concomitante com a diminuição na contagem de células D, levou para uma proporção aumentada de células G/D nos animais infectados com linhagens contendo uma EPIYA-C ($1,91 \pm 0,09$; $p=0,02$) e três EPIYAS-C ($3,84 \pm 0,34$; $p<0,001$) comparados com o grupo CTRL ($1,45 \pm 0,06$). Uma diferença significativa foi também observada entre os grupos com um e três segmentos EPIYA-C ($p=0,001$).

Devido ao fato de ter sido observado um número significativamente maior de células inflamatórias e maior área da lâmina própria antral nos animais infectados com linhagens de *H. pylori* contendo um ou três segmentos EPIYA-C comparados com o grupo CTRL seis meses após a infecção, foram então correlacionados esses parâmetros com o número de células G e D. Uma correlação positiva foi observada entre o número de células G e o número de núcleos ($r=7$, $p<0,001$) (Gráfico 3a) e a área da lâmina própria ($r=6$, $p=0,001$) (Gráfico 3b).





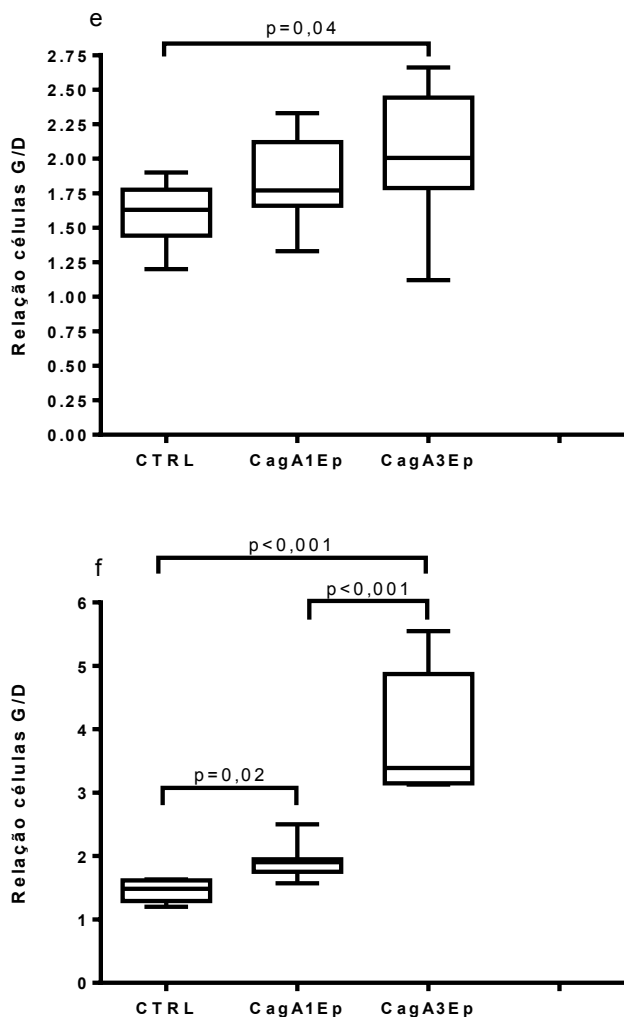


Gráfico 2 - Números de células G e D da mucosa gástrica antral de gerbils infectados com linhagens de *H. pylori* produtora de proteína CagA, contendo um ou três sítios de fosforilação C, e de animais não infectados aos 45 dias (a,b) ou seis meses após a infecção (c,d). Cada grupo é composto por oito animais. (e) e (f) representam a relação células G/D aos 45 dias e aos seis meses de infecção. Os limites superiores e inferiores das caixas representam os percentuais 75% e 25%, respectivamente. A barra horizontal em toda a caixa indica as barras de mediana, e as preenchidas, indicam os valores máximo e mínimo de dados. Os dados foram analisados pelo teste de teste bicaudal Mann-Whitney U.

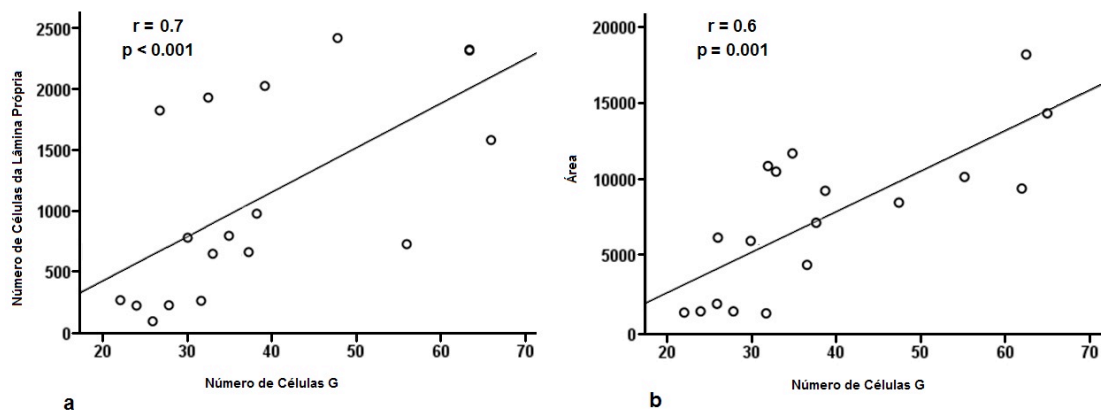


Gráfico 3 - (a) correlação positiva entre o número de células G e o número de núcleos das células da lâmina própria e (b) entre o número de células G e a área total de lâmina própria da mucosa gástrica antral de gerbils infectados com linhagens de *H. pylori* produtora de proteína CagA, aos seis meses de infecção. Os dados foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

6.5.2 Análise quantitativa das áreas de mucinas MUC1 e MUC5AC

A expressão imuno-histoquímica positiva das mucinas foi detectada através da coloração marrom presente no citoplasma das células epiteliais gástricas, tanto para MUC1 quanto para MUC5AC. As células imunorreativas positivas para MUC5AC foram localizadas predominantemente na porção apical do epitélio foveolar e na porção basal das glândulas, mostrando uma marcação geralmente menos intensa entre as duas, com regiões de marcação negativa. Já as células produtoras de MUC1 foram encontradas ao longo de toda a espessura da mucosa, contudo, com uma intensidade de marcação geralmente menor do que a mucina MUC5AC (Figuras 9a,b). A omissão dos dois anticorpos primários não produziu reação imuno-histoquímica positiva (Figura 9c,d).

Aos 45 dias após a infecção, houve uma redução significativa na expressão tanto de MUC1 quanto de MUC5AC, nos grupos CagA1Ep (MUC1: $209.761 \pm 13.740 \mu\text{m}^2$; MUC5AC: $326.888 \pm 11.298 \mu\text{m}^2$) ($p=0,003$) e CagA3EP (MUC1: $76.599 \pm 16.709 \mu\text{m}^2$; MUC5AC: $97.358 \pm 18.724 \mu\text{m}^2$) ($p=0,003$) comparados com o grupo controle

(MUC1: $322.024 \pm 15.137 \mu\text{m}^2$; MUC5AC: $424.140 \pm 13.423 \mu\text{m}^2$), sendo essa redução mais proeminente no grupo CagA3Ep ($p=0,003$) (Figuras 10 a,b,c,d) (Gráfico 4a).

Aos seis meses após a infecção, houve também uma diminuição significativa nas expressões de MUC1 e MUC5AC, nos grupos CagA1Ep (MUC1: $110.296 \pm 9.667 \mu\text{m}^2$; MUC5AC: $164.447 \pm 8.111 \mu\text{m}^2$) ($p=0,001$) e CagA 3Ep (MUC1: $30.153 \pm 7.972 \mu\text{m}^2$; MUC5AC: $38.844 \pm 8.714 \mu\text{m}^2$) ($p=0,001$) comparados com o grupo controle (MUC1: $288.529 \pm 16.137 \mu\text{m}^2$; MUC5AC: $441.149 \pm 36.353 \mu\text{m}^2$). A diminuição foi mais acentuada no grupo CagA3Ep do que no grupo CagA1Ep ($p=0,001$) (Figuras 10 e 11) (Figuras 10e,f,g,h) (Gráfico 4b).

Quando os animais infectados, sacrificados com 45 dias de infecção foram comparados com os animais infectados e sacrificados com seis meses, foi observada uma redução da expressão tanto de MUC1 ($p=0,001$, para os dois grupos) quanto de MUC5AC ($p=0,03$ e $p=0,02$ para os grupos CagA1Ep e CagA3Ep, respectivamente). Não foram observadas alterações significativas entre os grupos CTRL nos dois períodos analisados ($p=0,20$ e $p=0,33$, para MUC1 e MUC5AC, respectivamente). No grupo de animais infectados, foi observada uma correlação negativa entre a expressão de MUC1 ($r=-52$, $p=0,005$ e $r=-53$, $p=0,08$) e MUC5AC ($r=-48$, $p=0,01$ e $r=-54$, $p=0,006$) entre o número de células inflamatórias e a área de lâmina própria, respectivamente. Não houve diferenças no grupo controle ($p=0,38$ e $p=0,16$).

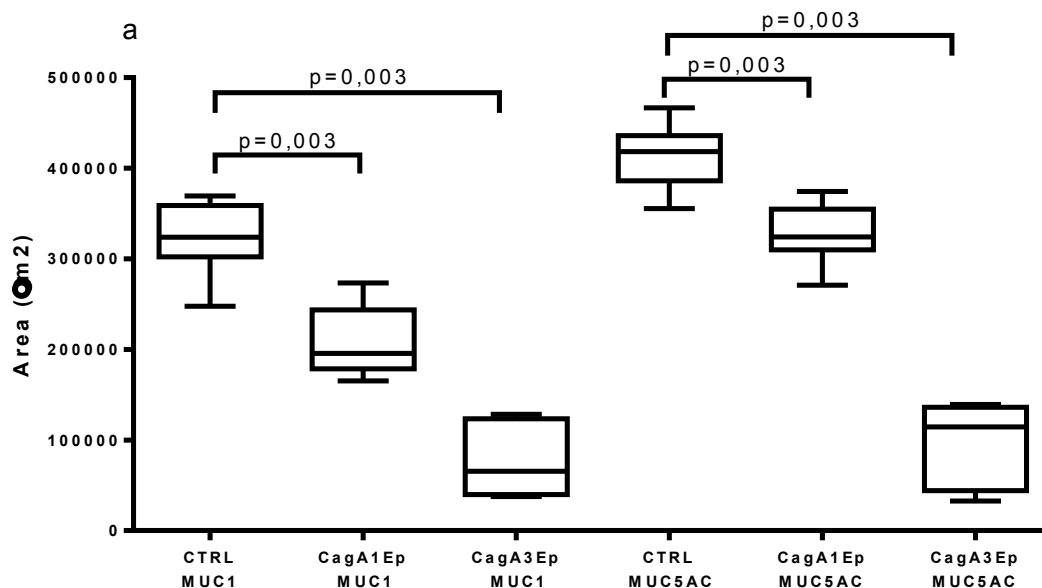
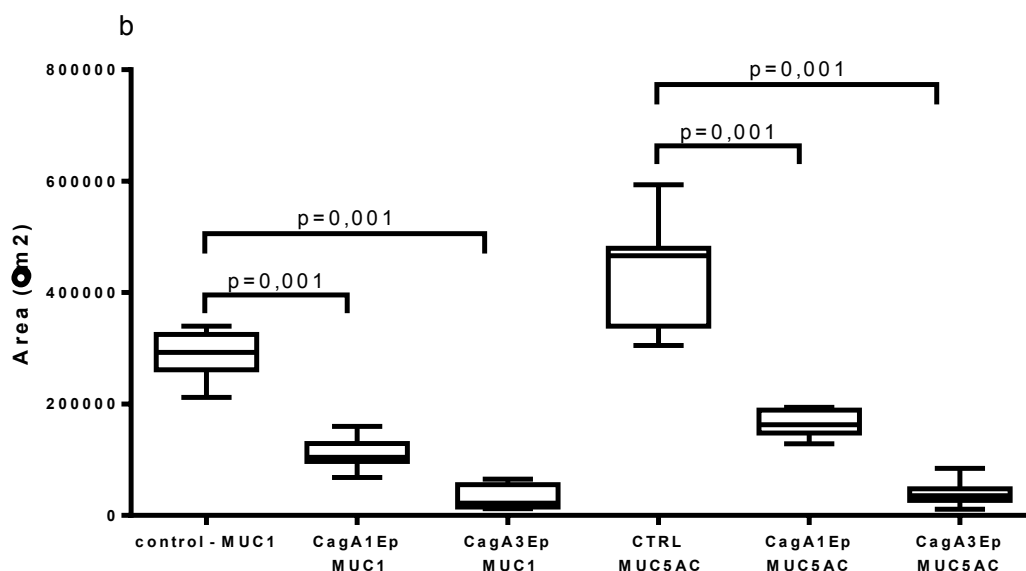


Gráfico 4 – Área das mucinas MUC1 e MUC5AC da mucosa gástrica antral de gerbils infectados com linhagens de *H. pylori* produtora de proteína CagA, contendo um ou três sítios de fosforilação C, e de animais não infectados aos 45 dias (a) ou aos seis meses (b) após a infecção. Cada grupo é composto por oito animais. Os limites superiores e inferiores das caixas representam os percentuais 75% e 25%, respectivamente. A barra horizontal em toda a caixa indica as barras de mediana, e as preenchidas, indicam os valores máximo e mínimo de dados. Os dados foram analisados pelo teste de teste bicaudal Mann-Whitney U.



7. DISCUSSÃO

Foi demonstrado que a infecção com linhagens de *H. pylori* contendo mais de um sítio de fosforilação de CagA está associada com gastrite, lesões gástricas pré-cancerosas e câncer gástrico (Backert & Selbach, 2008; Batista *et al.*, 2011; Yamaoka *et al.*, 1998). Entretanto, as associações observadas em seres humanos não foram confirmadas experimentalmente em modelos animais. Nesse sentido, também não existem estudos experimentais e nem em humanos sobre alterações nas células G e D, bem como na expressão das mucinas MUC1 e MUC5AC, em mucosa gástrica infectada por linhagens com mais de um sítio de fosforilação de CagA. Nesse estudo, foi mostrado a presença de lesões gástricas mais severas, assim como também um aumento no número de células G, diminuição tanto no número de células D quanto na área de mucinas MUC1 e MUC5AC, na mucosa gástrica de gerbils Mongolian experimentalmente infectados com linhagens de *H. pylori* carregando três segmentos de EPIYA-C na proteína CagA e um *cagPAI* funcional.

Os resultados histopatológicos avaliados pelos métodos sistema semi-quantitativo Sydney e o morfométrico quantitativo foram de acordo; entretanto, a última abordagem permitiu uma melhor discriminação entre linhagens contendo um ou três segmentos EPIYA-C na proteína CagA em relação ao número de células inflamatórias.

Aos 45 dias após a inoculação, um infiltrado inflamatório predominantemente antral, um aumento na área da lâmina própria e a presença de folículos linfoides, que são marcadores característicos da gastrite causada pelo *H. pylori*, foram observados nos animais infectados, principalmente naqueles transportando o isolado com CagA contendo três segmentos EPIYA-C (Dixon *et al.*, 1996). Os folículos também foram mais abundantes na mucosa gástrica dos animais CagA3Ep. O infiltrado inflamatório aumentado e expandido para a mucosa oxíntica aos seis meses de infecção, apresentou-se de forma semelhante à observada na mucosa gástrica dos gerbils experimentalmente infectados com linhagens de *H. pylori* virulentas (Ohnita *et al.*, 2005). Notavelmente, uma resposta inflamatória mais intensa e lesões pré-cancerosas foram observadas nos animais infectados com linhagens CagA3Ep do que naqueles infectados por CagA1Ep.

Nossos resultados podem ser explicados pela maior atividade da proteína SHP-2 induzida pelo isolado com três sítios de fosforilação EPIYA-C. Tem sido demonstrado que a proteína CagA fosforilada, forma um complexo físico com a fosfatase SHP-2, que ativa os padrões sinalizantes MAPK/ERK ½. ERK, os quais regulam a inflamação por estimular a adesão de neutrófilos e a geração de superóxido, e medeia a secreção de citocina pró-inflamatória (Higashi *et al.*, 2002). Além disso, ERK induz à ativação de genes que codificam proteínas anti-apoptóticas e que desregulam o crescimento e a diferenciação celular, contato célula-célula e migração celular, aumentando o volume total de células epiteliais, que aumentam o risco de células danificadas para adquirir alterações genéticas pré-cancerosas. Dessa maneira, linhagens de *H. pylori* transportando o segmento EPIYA com múltiplas repetições C, induz uma maior atividade da proteína SHP-2 e conseqüentemente maior grau de inflamação gástrica, gastrite atrófica, metaplasia gástrica e risco aumentado de câncer gástrico.

Embora vários autores tenham demonstrado mudanças no número de células G e D em resposta à infecção pelo *H. pylori* em humanos (Liu *et al.*, 2005) e animais (Wiedemann *et al.*, 2009), este é o primeiro estudo a analisar diferenças na população de células G e D de acordo com o número de segmentos EPIYA-C da proteína CagA do *H.pylori*. Uma redução na população de células D com um concomitante aumento na proporção de células G/D foi observado inicialmente no grupo CagA3Ep.

As diferenças entre animais infectados e não infectados tornou-se mais elevada após seis meses de infecção, com um aumento progressivo e significativo no número de células G e na proporção células G/D, notavelmente no grupo CagA3Ep. Alterações similares tem sido demonstradas por vários autores em estudos prévios avaliando pacientes infectados pelo *H. pylori*, mudanças estas que desaparecem após a erradicação da bactéria como demonstrado em adultos e crianças infectados (Queiroz *et al.*, 1993; Queiroz *et al.*, 1994). Os mecanismos envolvidos não são completamente elucidados; entretanto, tem sido sugerido que o estômago responde à presença de inflamação pela redução dos níveis de somatostatina, com conseqüente aumento da população de células G e da secreção de gastrina. Além disso, presume-se que a infecção com linhagens de *H. pylori* com um grande número de sítios de fosforilação, estão associadas com gastrite crônica mais intensa e um risco aumentado para desenvolver metaplasia intestinal e atrofia gástricas (Batista *et al.*, 2011; Chuang Chiao-Hsiung, 2011). No presente

trabalho, ficou demonstrado em gerbils infectados por linhagens contendo três sítios de fosforilação EPIYA-C, uma inflamação gástrica mais intensa do que aquela observada nos animais infectados com linhagens contendo apenas um sítio EPIYA-C. Em outro estudo (Wiedemann *et al.*, 2009), demonstraram em gerbils Mongolian infectados com linhagens de *H. pylori* capazes de translocar CagA em células gástricas, uma gastrite ativa e crônica grave, com um significativo aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL-6, IFN γ e TNF α), metaplasia intestinal e atrofia de células parietais, ao passo que nos animais com uma linhagem mutante, isogênica e incapaz de translocar CagA, não houve nenhuma alteração. Posteriormente, os animais desenvolveram hipocloridria e hipergastrinemia. Segundo os autores, a resposta imune pró-inflamatória dependente do *cag*-PAI, o qual desencadeia alterações histopatológicas tardias com consequente perturbação na fisiologia gástrica que predispõe à carcinogênese.

De acordo com os resultados de Wiedemann *et al.* 2009, neste estudo, as alterações no número de células G e D foram mais pronunciadas na fase tardia da infecção. Além disso, ficou demonstrado também que as alterações foram mais acentuadas nos animais infectados com linhagens com maior número de sítios EPIYA-C, apontando para uma participação dos sítios de fosforilação EPIYA-C na indução de inflamação e alteração mais graves da fisiologia gástrica. Como mencionado anteriormente, linhagens de *H. pylori* transportando EPIYA com múltiplas repetições C induzem uma maior atividade da proteína SHP-2 e conseqüentemente maior grau de inflamação gástrica, e essa por sua vez induz alterações no número de células G e D. Além disso, independentemente de sua propriedade pró-inflamatória, a IL1 β é um potente inibidor da secreção ácida; e o TNF α induz apoptose de células parietais contribuindo para o desenvolvimento de atrofia e hipocloridria, as quais estimulam as células produtoras de gastrina (El-Omar *et al.*, 2000; Neu *et al.*, 2003).

Ainda quando o *H. pylori* era chamado de *Campylobacter pyloridis* foi verificado que a infecção por esta bactéria era capaz de interferir sobre a camada de muco gástrico, levando a sua redução (Slomiany *et al.*, 2003). Contudo, até o momento não são completamente compreendidos os mecanismos envolvidos nestas alterações e não há consenso sobre os resultados obtidos quanto às prováveis alterações na composição das mucinas gástricas (Teixeira *et al.*, 2002).

Nesse trabalho, foi observada uma redução da expressão de duas mucinas gástricas em diferentes períodos da infecção. Aos 45 dias pós-infecção, houve uma redução progressiva e significativa na expressão tanto de MUC1 quanto de MUC5AC, do grupo CTRL para os grupos CagA1Ep e CagA3EP, sendo essa redução mais proeminente no grupo CagA3Ep. Aos seis meses pós-infecção, os resultados foram semelhantes aos de 45 dias pós-infecção, porém as reduções das expressões de MUC1 e MUC5AC foram mais intensas. Esses achados sobre a redução de mucinas associados à infecção pelo *H. pylori*, estão de acordo com os de alguns autores (Suzana *et al.*, 2009; Babu *et al.*, 2006; Radziejewska *et al.*, 2011; Navabi *et al.*, 2013). Navabi *et al.* (2013) verificaram uma redução na produção de MUC1 e uma tendência à diminuição na produção de MUC5AC no antro gástrico de camundongos infectados pelo *H. pylori*. A redução da expressão de MUC5AC também foi progressivamente maior no carcinoma gástrico humano avançado, quando comparado com a displasia e a metaplasia, sugerindo que as alterações nas mucinas poderiam ser consideradas como marcadores de transformação maligna da mucosa gástrica (Babu *et al.*, 2006). Também a infecção em ratos infectados pelo *Helicobacter felis*, foi observada uma perda de MUC5AC, a qual correlacionou-se com a gastrite, ocorrendo antes do surgimento da atrofia e da metaplasia intestinal (Beil *et al.*, 2000).

O *H. pylori* parece interferir no processo de glicosilação de MUC1 e MUC5AC, favorecendo a interação das adesinas bacterianas junto à superfície epitelial gástrica e a colonização pela bactéria (Radziejewska *et al.*, 2011). Além disso, o *H. pylori* libera urease, a qual degrada a uréia liberando amônia, que por sua vez eleva o pH gástrico. Essa elevação de pH, resulta em uma diminuição da viscoelasticidade da camada de muco, tornando-a mais fluida, o que facilita a locomoção da bactéria por essa camada e a adesão às células epiteliais gástricas (Celli *et al.*, 2009). A citotoxina VacA é outro produto do *H. pylori* envolvido na redução das mucinas. Beil *et al.*, (2000) demonstraram que linhagens de *H. pylori* cagA positivas produtoras da citotoxina vacA, causaram inibição significativa na síntese de mucinas quando comparadas com linhagens CagA positivas não produtoras de tal toxina, enquanto que as linhagens CagA negativas não interferiram na síntese.

Além de fatores inerentes à bactéria, fenômenos inflamatórios parecem estar envolvidos de forma significativa na redução das mucinas gástricas. Na gastrite crônica causada

pelo *H. pylori*, a superfície do epitélio mostra mudanças degenerativas com perda de mucinas e exfoliação celular aumentada, às vezes acompanhada de atrofia, ao passo que a lâmina própria torna-se edemaciada e com a presença de células inflamatórias (Suzana *et al.*, 2009). Proteases neutrofílicas liberadas durante a gastrite causada pelo *H. pylori* talvez possam contribuir para o colapso da estrutura das mucinas (Newton *et al.*, 1998). Em alguns trabalhos foi avaliada a possibilidade dos diferentes perfis de citocinas produzidas durante a infecção pelo *H. pylori* poderem interferir na expressão de mucinas. Especialmente a IL-1 β , bem como a IL-6 foram capazes de aumentar a expressão de mucinas em células epiteliais gástricas *in vitro*, enquanto o IFN- γ potencializou o efeito inibitório exercido pelo lisado de *H. pylori* (Takahashi *et al.*, 1998). Diferentes autores já observaram que a infecção por *H. pylori* induz a uma proeminente síntese de IFN- γ , com aumento significativo do número de linfócitos T positivos para esta citocina (Ren *et al.*, 2000; Bamford *et al.*, 1998). Aliado a fatores inerentes à bactéria, a maior concentração de IFN- γ poderia estar atuando como fator auxiliar na redução das mucinas.

Foi observada também uma correlação negativa existente entre o número de células inflamatórias e a expressão imuno-histoquímica de MUC1 e MUC5AC nos animais infectados, mostrando que a intensidade do processo inflamatório foi um fator decisivo na redução da expressão das mucinas.

Nesse estudo foi possível demonstrar uma redução significativa e progressiva, nos conteúdos de MUC1 e MUC5AC dos grupos CTRL para os grupos CagA1Ep e CagA3Ep, em ambos os períodos de infecção. Tal fato pode ser atribuído à influência dos fatores de toxicidade bacterianos que interferem na síntese de MUC1 e MUC5AC e, especialmente, ao processo inflamatório. Esses achados são de grande relevância científica e clínica, uma vez que demonstramos que cepas de *H. pylori* contendo maior número de sítios de fosforilação de CagA, reduzem com maior intensidade e significativamente uma das principais barreiras de defesa da mucosa gástrica, predispondo essa a um maior contato com patógenos, substâncias tóxicas e como pela própria redução da proteção contra o suco gástrico, favorecendo o agravamento da gastrite, o aparecimento de lesões pré-cancerosas e até mesmo o câncer gástrico.

8. CONCLUSÕES

A infecção experimental de gerbils, com cepa de *Helicobacter pylori* carreando três sítios de fosforilação EPIYA C na região carboxila terminal da proteína CagA, foi capaz de produzir lesões gástricas mais intensas do que a infecção com cepa contendo apenas um sítio de fosforilação. Incluem-se entre as lesões: a inflamação da mucosa gástrica, atrofia, metaplasia, displasia, a redução do número de células D e o aumento das células G, bem como a redução da expressão das mucinas MUC-1 e MUC-5AC.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, R. A.; LING, L.S.; MOIR, D.T.; KING, B.L.; BROWN, E.D.; DOIG, P.C.; SMITH, D.R.; NOONAN, B.; GUILD, B.C.; DEJONGE, B.L.; CARMEL, G.; TUMMINO, P.J.; CARUSO, A.; URIA-NICKELSEN, M.; MILLS, D.M.; IVES, C.; GIBSON, R.; MERBERG, D.; MILLS, S.D.; JIANG, Q.; TAYLOR, D.E.; VOVIS, G.F.; TRUST, T.J. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 397, p.176-80,1999.

ÁLVARES, M. M. D.; MARINO, M.; OLIVEIRA, C. A.; MENDES, C. C.; COSTA, A. C. F.; GUERRA, J.; QUEIROZ, D. M.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Características da gastrite crônica associada a *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o *status cagA*. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n.1, p. 51-59, 2006.

ANNIBALE, B.; AZZONI, C.; CORLETO, V.D.; DI GIULIO, E.; CARUANA, P.; D'AMBRA, G.; BORDI, C.; DELLE FAVE, G. Atrophic body gastritis patients with enterochromaffin-like cell dysplasia are at increased risk for the development of type I gastric carcinoid. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.13, p.1449-1456, 2001.

ARAS, R.A.; LEE, Y.; KIM, S.K.; ISRAEL D.; PEEK, R.M.; BLASER, M.J. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affects human host cell phenotype. **J Infect Dis**, 188, p. 486-96, 2003

ARGENT, R. H.; ZHANG, Y.; ATHERTON, J.C. Simple Method for Determination of the Number of *Helicobacter pylori* CagA Variable-Region EPIYA Tyrosine Phosphorylation Motifs by PCR. **J Clin Microbiol**, v.43, n. 2, p.791-795, 2005.

ASAKA, M.; KUDO, M.; KATO, M.; SUGIYAMA, T.; TAKEDA, H. Review article: Long-term *Helicobacter pylori* infection - from gastritis to gastric cancer. **Aliment Pharmacol Ther**, Oxford, v. 12, n.1, p. 9-15, 1998.

ASHOUR, A. R.; MAGALHÃES, P. P.; MENDES, E. N.; COLLARES, G. B.; GUSMÃO, V.R.; QUEIROZ, D.M.M.; NOGUEIRA, A.M.M.F.; ROCHA, G. A.; OLIVEIRA, C. A. O. 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, p.173-178, 2002.

AUDIBERT, C.; BURUCOA, C.; JANVIER, B.; FAUCHE`RE, J. L. Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. **Infect Immun**, v.69, p.1625–1629, 2001.

AVILÉS-JIMÉNEZ, F.; REYES-LEON, A.; NIETO-PATLÁN, E.; HANSEN, L. M.; BURGUEÑO, J.; RAMOS, I. P.; CAMORLINGA-PONCE, M.; BERMÚDEZ, H.; BLANCAS, J. M.; CABRERA, L.; RIBAS-APARICIO, R. M.; SOLNICK, J. V.; TORRES-LÓPEZA, J. *In Vivo* Expression of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Patients with Gastritis, Ulcer, and Gastric Cancer. **Infect Immun**, p.594-601, 2012.

BABU, S.D.; JAYANTHI, V.; DEVARAJ, N.; REIS, C.A.; DEVARAJ, H. Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in *Helicobacter pylori* infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. **Mol Cancer**, v.5, p.1-7, 2006.

BACKERT, S.; SELBACH, M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Cell Microbiol**, v.10, n.8, p.1573–1581, 2008.

BAMFORD, K.B.; FAN, X.; CROWE, S.E.; LEARY, J.F.; GOURLEY, W.K.; LUTHRA, G.K.; BROOKS, E.G.; GRAHAM, D.Y.; REYES, V.E.; ERNST, P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterol**, v.114, n.3, p.482-92, 1998.

BARBUTO, R.C. Gastrinemia e densidade das células G e D no estômago de gerbils infectados com *helicobacter pylori* submetidos a vagotomia com piloroplastia. **Tese de doutorado**, 72 páginas, 2008.

BARBOSA, J.A.; SCHINONNI, M.I. *Helicobacter pylori*: Association with gastric cancer and new insights into the virulence factors. **R Ci Med Biol**, Salvador, v.10, n.3, p.254-262, 2011.

BATISTA, S. A.; ROCHA, A. G.; ROCHA, A. M.C.; SARAIVA, I. E.B.; CABRAL, M.M.D.A.; OLIVEIRA, R.C. QUEIROZ, D. M.M. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. **BMC Microbiol**, v.11, n.6, p.1:1-7, 2011.

BATISTA S.A. Efeito do número de sítios EPIYA C da proteína CagA de *Helicobacter pylori* na produção *in vitro* de citocinas associadas à carcinogênese gástrica e avaliação das vias de sinalização. **Tese de doutorado**, 120 páginas, 2014.

BEIL, W.; ENSS, M.L.; MÜLLER, S.; OBST, B.; SEWING KARL-FRIEDRICH, SIEGFRIED W. Role of *vacA* and *cagA* in *Helicobacter pylori* Inhibition of Mucin Synthesis in Gastric Mucous Cells. **J Clin Microbiol**, v.38, n.6, p.2215, 2000.

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. **BMJ**, v.6, p.7–1510, 1998.

BORDI, C.; D'ADDA, T.; AZZONI, C.; PILATO, F.P.; CARUANA, P. Hypergastrinemia and gastric enterochromaffin-like cells. **Am J Surg Pathol**, v.19, n.1, p. 8-19, 1995.

BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 283-29, 2000.

BUTI, L.; SPOONERA, E.; VAN DER VEENA, A. G.; RAPPUOLIB, R.; COVACCIB, A.; PLOEGHA, H. L. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. **PNAS**, v.108, n.22, p. 9238–9243, 2011.

CALAM, J. *Helicobacter Pyloni* and Hormones. **Yale J Biol Med**, v.69, p. 39-49,1996.

CALAM, J. *Helicobacter pylori* modulation of gastric secretion. **Yale J Biol Med**, v.72, p.195-202, 1999.

CALIARI, M.V. Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes. Ed. UFMG, p. 149, 1997.

CAVALCANTE, M. Q. F.; SILVA, C. I. S.; BRAGA-NETO, M. B.; FIALHO, A. B. C.; FIALHO, A. N.; BARBOSA, A. M. C.; CRUZ, F. W. S.; ROCHA, G. A.; QUEIROZ, D. M. M.; BRAGA, L. L. B. C. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107, n.4, p. 561-563, 2012.

CELLI, J.P.; TURNERB, B. S.; AFDHALB, N. H.; KEATESB, S.; GHIRANB, I.; KELLYB, C.P.; EWOLDTC, R.H.; MCKINLEYC, G.H.; SOD, P.; ERRAMILLIA, S.; BANSILA, R. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. **PNAS**, v.106, p.14321–14326, 2009.

CHIOZZI, V.; MAZZINI, G.; OLDANI, A.; SCIULLO, A.; VENTURA, U.; ROMANO, M.; BOQUET, P.; RICCI, V. Relationship between vac A toxin and ammonia in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in human gastric epithelial cells. **J Phys Pharm**, v.60, n.3, p. 23-30, 2009.

CHUANG, CHIAO-HSIUNG.; YANG, HSIAO-BAI.; SHEU, SHEW-MEEI.; HUNG, KUEI-HSIANG.; WU, JIUNN-JONG.; CHENG, HSIU-CHI.; CHANG, WEI-LUN.; SHEU, BOR-SHYANG. *Helicobacter pylori* with stronger intensity of CagA phosphorylation lead to an increased risk of gastric intestinal metaplasia and cancer. **BMC Microbiol**, v.11, n.121, p.1-7, 2011.

CORREA P. A human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Res**, v.48, p.3554-60, 1988.

COVACCI, A. J. L.; TELFORD, G.; DEL GIUDICE, J.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. . *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**,v.284, p.1328–1333, 1999.

DeCROSS, A. J.; MARSHALL, B. J. The role of *Helicobacter pylori* in acid-peptic disease. **Am J Med Sci**, v.306, p.381-92, 1993.

D'ELIOS, M.M.; CZINN, S.J. Immunity, Inflammation, and Vaccines for *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.19, p. 19–26, 2014.

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.1161-81, 1996.

DOOLEY, C.P.; COHEN, H. The clinical significance of *Campylobacter pylory*. **An Int Med**, v.108, p.70-9, 1988.

DUVAL-ARAUJO, I.; QUEIROZ, D. M. M.; MAGNANO, A. G.; SIMAL, C. J.; MARINO, V. S.; CARVALHO, S. D.; SILVA-MACHADO, L. A.; MIRANDA, D. Increased gastric emptying induced by *Helicobacter heilmannii* type 1 infection in rats. **J Med Microbiol**, v.49, p.627-34, 2000.

ECK, M.; SCHMAUSSER, B.; HAAS, R.; GREINER, A.; CZUB, S.; MÜLLER-HERMELINK, H.K. MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. **Gastroenterol**, V.112:, p.1482-1486,1997.

EL-OMAR, E.M.; CARRINGTON, M.; CHOW, W.H.; MCCOLL, K.E.; BREM, J.H.; YOUNG, H.A.; HERRERA, J.; LISSOWSKA, J.; YUAN, C.C.; ROTHMAN, N.; LANYON, G.; MARTIN, M.; FRAUMENI, J.F. J.R.; RABKIN, C.S. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v.6776, p.398-402. 2000.

EUSEBI, L.H.; ZAGARI, R. M.; BAZZOLI, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 19, p.1-5, 2014.

FUJIOKA, N.; FAHEY, M. T.; HAMADA, G. S.; NISHIMOTO, I. N.; KOWALSKI, L. P.; IRIYA, K.; RODRIGUES, J. J.; TAJIRI, H.; TSUGANE, S. Serological immunoglobulin G antibody titers to *Helicobacter pylori* in Japanese Brazilian and non-Japanese Brazilian gastric cancer patients and controls in Sao Paulo. **Jpn J Cancer Res**, v.92, p. 829–835, 2001.

FIorentino, M.; DING, H.; BLANCHARD, T.G.; CZINN, S.J.; SZTEIN, M.B.; FASANO, A. *Helicobacter pylori*-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. **Infect Immun**, v.81, n.3, p.876-83, 2013.

FOX, J.G.; WANG, T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **J Clin Invest**, v.117, p.60–69, 2007.

FOX, J.G.; WANG, T.C.; ROGERS, A.B.; POUTAHIDIS, T.; GE, Z. Host and microbial constituents influence *Helicobacter pylori*-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia. **Gastroenterol**, v.124, p.1879–1890, 2003.

GASKIN, R. J.; GAD, A.; BARROS, A. A. J.; D'SA, A. D.; JOFFE, S. N.; BARON, J. H. Natural history and morphology of secretagogue-induced ulcers in rats. **Gastroenterol**, v.69, p.903–910, 1975.

GOO, T.; AKIBA, Y.; KAUNITZ, J. D. Mechanisms of Intra-gastric pH Sensing. **Curr Gastroenterol**, v.1, p.465–470, 2010.

GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG J. A.; CHILVERS, T.; PETERS, M.; COLINS, D.; SLY, L.; McCONNELL, W.; HARPER, W. E. S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. **Int J Syst Bacteriol**, v.39, p.397–405, 1989.

GRAHAM, D. Y. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. **Gastroenterol**, v.96, p.615-25, 1989.

HENRIKSNAS, J.; PHILLIPSON, M.; STORM, M.; ENGSTRAND, L.; SOLEIMANI, M.; HOLM, L. Impaired mucus-bicarbonate barrier in *Helicobacter pylori*-infected mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.291, p.396–403, 2006.

HIGASHI, H.; TSUTSUMI, R.; MUTO, S.; SUGIYAMA, T.; AZUMA, T.; ASAKA, M.; HATAKEYAMA, M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. **Science**, v.295, p.683-6, 2002.

HINDER, R.A.; BREMMER, C.G.; HORN, B.K.P. A radio-isotope method of measuring gastric emptying, reflux and secretion. **Br J Surg**, v.59, p.903, 1972.

HSU, P.I.; HWANG, I.; CITTELLY, D.; LAI, K.H.; EL-ZIMAITY, H. M.; GUTIERREZ, O.; KIM, J. G.; OSATO, M. S.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **Am J Gastroenterol**, v.97, p.2231–2238, 2002.

ILKENO, T.; OTA, H.; SUGIYAMA, A.; ISHIDA, K.; KATSUYAMA, T.; GENTA, M. R.; KAWASAKI, S. *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Active Gastritis, Intestinal Metaplasia, and Gastric Ulcer in Mongolian Gerbils. **Am J Pathology**, v.154, n.3, p.951-960, 1999.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Infection with *Helicobacter pylori*. In: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, Lion, França, v. 61, p. 177-240, 7-14 jun. 1994.

JANG, S.; JONES, K.R.; OLSEN, C. H.; JOO, Y.M.; YOO, YUN-JUNG.; CHUNG, IN-SIK.; CHA, JEONG-HEON.; MERRELL, D. S. Epidemiological Link between Gastric Disease and Polymorphisms in VacA and CagA. **J Clin Microbiol**, v.48, n.2, p.559-567, 2010.

JONES, K. R.; JOU, Y. M.; JANG, S.; YOO, YUN-JUNG.; LEE, H. S.; CHUNG, IN-SIK.; OLSEN, C. H.; WHITMIRE, J. M.; MERRELL, S. D.; CHA, JEONG-HEON.

Polymorphism in the CagA EPIYA Motif Impacts Development of Gastric Cancer. **J Clin Microbiol**, v.47, n.4, p.959-968, 2009.

JOSEPH, I. P.; ZAVROS, Y.; MERCHANT, J.L.; KIRSCHNER, D. A model for integrative study of human gastric acid secretion. **J Appl Physiol**, v.4, p.1602–1618, 2003.

19 – KATHLEEN, R. J.; YOUNG, M.I.N. J.; SUNGIL, J.A.N.G.; YUN-JUNG, Y.; HAK, S. L.; IN-SIK, C.; CARA, H. O.; JEANNETTE, M.; WHITMIRE, D.; SCOTT, M.; JEONG-HEON, C. Polymorphism in the CagA EPIYA Motif Impacts Development of Gastric Cancer. **J Clin Microbiol**, v.47, p.959-67, 2009.

KIM, J. H.; PARK, H. J.; CHO, J. S.; LEE, K. S.; LEE, S. I.; PARK, I. S.; KIM, C. K. Relationship of CagA to Serum Gastrin Concentrations and Antral G, D Cell Densities in *Helicobacter pylori* Infection. **Yonsei Med J**, v.40, n.4, p.301-306, 1999.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T. Gastric Cancer and *Helicobacter pylori* Infection. **J Physiol Pharmacol**, v.57, n.3, p.51-65, 2006.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BIELANSKI, W.; KARCZEWSKA, E.; PIERZCHALSKI, P.; DUDA, A.; STARZYNSKA, T.; MARLICZ, K.; POPIELA, T.; HARTWICH, A.; HAHN, E.G. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected humans. **J Physiol Pharmacol**, v.50, n.5, p. 857-873, 1999.

KREUNING, J.; WAL, A. M. V. D.; KUIPER, G.; LINDEMAN, J. Chronic nonspecific duodenitis: a multiple biopsy study of the duodenal bulb in health and disease. **Scand J Gastroenterol**, v.24, n.167, p.16–20, 1989.

KUIPERS, E.J.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* and Nonmalignant Diseases. **Helicobacter**, v.9, n.1, p. 29–34, 2004.

KUIPERS, E.J.; PÉREZ-PÉREZ, G.I.; MEUWISSEN, S.G.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. **J Natl Cancer Inst**, v.87, n.23, p.1777-80, 1995.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M.A.M. *Biopathology of Helicobacter pylori*. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, 2003.

LEHY, T. Trophic Effect of Some Regulatory Peptides on Gastric Exocrine and Endocrine Cells of the Rat. **Scand J Gastroenterol**, v.19, p.27-30, 1984.

LIU, Y.; VOSMAER, G.D.; TYTGAT, G.N.; XIAO, S.D.; TEN KATE, F.J. Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: *Helicobacter pylori* associated and non-associated gastritis. **J Clin Pathol**, v.9, p.927-31, 2005.

MALTOS, K.L.; MENEZES, G.B.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; SANTOS, J.M.; ALVES, D.L.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. **Arch Oral Biol** V.49, n.6, p.443-50, 2004.

MCCLAIN, M.S.; SHAFFER, C. L.; ISRAEL, D. A.; PEEK, J.R.R. M.; COVER, T. L. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. **BMC Genomics**, v.10, n.3, p.1-14, 2009.

MARIE, M.A.M.M. A. Relationship between *Helicobacter pylori* Virulence Genes and Clinical Outcomes in Saudi Patients. **J Korean Med Sci**, v.27, p.190-193, 2012.

MARSHALL, B. J.; MCGEEHIE, D. B.; ROGERS, P. A.; GLANCY, R. J. Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. **Med J Austr**, v.142, p.439-444, 1985.

MAGALHÃES, A.; REIS, C.A. *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells is mediated by glycan receptors. **Braz J Med Biol Res**, v.43,n. 7, p.611-618, 2010.

MARK, S. M.; CARRIE, L. S.; DAWN, A. I.; RICHARD, M. P. JR.; TIMOTHY, L. C. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. **BMC Genomics**, v.10, p.1-14, 2009.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.13, p.11–1315, 1984.

MATTAR, R.; MARQUES, S. B.; MONTEIRO, MARIA DO SOCORRO.; SANTOS, A. F.; IRIYA, K.; CARRILHO, F. J. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. **J Med Microbiol**, v.56, p. 9–14, 2007.

MENDES, R. M.; SILVA, G.A.B.; CALIARI, M. V. ; SILVA, E. E. ; LADEIRA, L. O.; FERREIRA, A.J. . Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. **Life Sci**, v. 87, p. 215-222, 2010.

MURAKAMI, M.; FUKUZAWA, M.; YAMAMOTO, M.; HAMAYA, K.; TAMURA, Y.; SUGIYAMA, A.; TAKAHASHI, R.; MURAKAMI, T.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K.I. Effects of *Helicobacter pylori* Infection on Gastric Parietal Cells and E-cadherin in Mongolian Gerbils. **J Pharmacol Sci**, v.121, p. 000 – 000, 2013.

NAVABI, N.; JOHANSSON, M.E.; RAGHAVAN ,S.; LINDÉN, S.K. *Helicobacter pylori* Infection Impairs the Mucin Production Rate and Turnover in the Murine Gastric Mucosa. **Infect Immun** v.81, n.3, p.829, 2013.

NEU, B.; PUSCHMANN, A.J.; MAYERHOFER, A.; HUTZLER, P.; GROSSMANN, J. TNF-alpha induces apoptosis of parietal cells. **Biochem Pharmacol**, v.65, p.1755–1760, 2003.

NEWTON, J. L.; JORDAN, N.; OLIVER, L.; STRUGALA, V.; PEARSON, J.; JAMES, O. F. W.; ALLEN, A. *Helicobacter pylori* in vivo causes structural changes in the adherent gastric mucus layer but barrier thickness is not compromised. **Gut**, v.43, p.470–475, 1998.

OHNITA, K.; ISOMOTO, H.; HONDA, S.; WADA, A.; WEN, CHUN-YANG.; NISHI, Y.; MIZUTA, Y.; HIRAYAMA, T.; KOHNO, S. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric inflammation in Mongolian gerbils. **World J Gastroenterol**, v.11, n.10, p.1549-1553, 2005.

OHNISHI, N.; YUASA, H.; TANAKA, S.; SAWA, H.; MIURA, M.; MATSUI, A.; HIGASHI, H.; MUSASHI, M.; IWABUCHI, K.; SUZUKI, M.; YAMADA, G.; AZUMA, T.; HATAKEYAMA, M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. **PNAS**, v.105, n.3, p.1003-1008, 2008.

OLIVEIRA, F.M.S.; HORTA, B.C.; PRATA, L.O.; SANTIAGO, A.F.; ALVES, A.C.; FARIA, A.M.C.; GOMES, M.A.; CALIARI, M.V. Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. **Curr Infect Dis Rep**, v.4, p.106-113, 2012.

OLSON, J. W.; MAIER, R. J. Molecular Hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. **Science**, v. 298, n.5599, p. 1788-1790, 2002.

PACHECO, C.M.; QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; MALTOS, K.L.; CALIARI, M.V.; PACHECO, D.F.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. Crucial role of peripheral kappa-opioid receptors in a model of periodontal disease in rats. **J Periodontal Res** 2008.

PARSONNET, J. G. D.; FRIEDMAN, D. P.; VANDERSTEEN, Y.; CHANG, J. H.; VOGELMAN, N.; ORENTREICH.; SIBLEY, R. K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v.325, p.1127–1131, 1991.

PAPADAKOS, K.S.; SOUGLERI, I.S.; MENTIS, A.F.; HATZILOUKAS, E.; SGOURAS, D.N. Presence of Terminal EPIYA Phosphorylation Motifs in *Helicobacter*

pylori CagA Contributes to IL-8 Secretion, Irrespective of the Number of Repeats. **PLoS ONE**, v.8, n.2, p.56291, 2013.

PARENTE, J. M. L.; PARENTE, M. P. P. D. P. Contexto epidemiológico atual da infecção por *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Endosc Dig**, v. 29, n. 3, p. 86-89, 2010.

POUNDER, R.E.; Ng, D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Different Countries. **Aliment Pharm Therap** V.9, p.33-39, 1995.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; MOURA, S.B.; RESENDE, L.M.H.; BARBOSA, A.J.A.; COELHO, L.G.V.; PASSOS, M.C.F.; CASTRO, L.P.; OLIVEIRA, C.A.; LIMA, J.R.G.F. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on antral gastrin- and somatostatin-immunoreactive cell density and gastrin and somatostatin concentrations. **Scand J Gastroenterol** v.28, p.858-864, 1993.

QUEIROZ, D. M. M.; MOURA, S. B.; MENDES, E. N.; ROCHA, G. A.; BARBOSA, A. J. A.; CARVALHO, A.S.T. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on G-cell and D-cell density in children. **Lancet**, v.343, p.1191-3, 1994.

RADZIEJEWSKA, I.; BORZYM-KLUCZYK, M.; NAMIOT, Z.; STEFAN'SKA, E. Glycosylation of mucins present in gastric juice: the effect of *Helicobacter pylori* eradication treatment. **Clin Exp Med**, v.11, p.81–88, 2011.

REN, Z.; PANG, G.; LEE, R.; BATEY, R.; DUNKLEY, M.; BORODY, T.; CLANCY, R. Circulating T-cell response to *Helicobacter pylori* infection in chronic gastritis. **Helicobacter**, v.5, n.3, p.135-41, 2000.

REYES-LEON, A.; ATHERTON, J. C.; ARGENT, H.R.; PUENTE, J. L.; TORRES, J. Heterogeneity in the Activity of Mexican *Helicobacter pylori* Strains in Gastric Epithelial Cells and Its Association with Diversity in the *cagA* Gene. **Infect Immun**, v.75, n.7, p. 3445–3454, 2007.

RINDI, G.; BORDI, C.; RAPPEL, S.; LA ROSA, S.; STOLTE, M.; SOLCIA, E. Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology, and behavior. **World J Surg**, v.20, p. 168-172, 1996.

ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D. M.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, p.1004–1005, 1989.

RUGGE, M.; GENTA, R.M. Staging and grading of chronic gastritis. **Hum Pathol**, v.36, p.228– 233., 2005.

SALES, A.O.; RODRIGUES, S.J.P.; BACCHI, C.E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB®+ e Herceptest® para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 4, p. 265-71, 2004.

SAITO, H.; YAMAOKA, Y.; ISHIZONE, S.; MARUTA, F.; SUGIYAMA, A.; GRAHAM, D. Y.; YAMAUCHI, K.; OTA, H.; MIYAGAWA, S. Roles of virD4 and cagG genes in the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* using a Mongolian gerbil model. **Gut**, v.54, p.584–590, 2005.

SHAOUL, R.; MARCON, P.; OKADA, Y.; CUTZ, E.; FORSTNER, G. The pathogenesis of duodenal gastric metaplasia: the role of local goblet cell transformation. **Gut**, v.46, p.632–638, 2000.

SCHMITZ, J. M.; DURHAM, C. G.; HO, S. B.; LORENZ, R. G. Gastric Mucus Alterations Associated With Murine Helicobacter Infection. **J Histochem Cytochem**, v.57, n.5, p. 457– 467, 2009.

SILVA, F.M.; NAVARRO-RODRIGUEZ, T.; BARBUTI, R.C.; MATTAR, R.; HASHIMOTO, C.L.; EISIG, J.N. *Helicobacter pylori* reinfection in Brazilian patients with peptic ulcer disease: a 5-year follow-up. **Helicobacter**, v.15, n.1, p.46-52, 2010.

SLOMIANY, B.L.; BILSKI, J.; SAROSIEK, J.; MURTY, V.L.; DWORKIN, B.; VANHORN, K.; ZIELENSKI, J.; SLOMIANY A. *Campylobacter pyloridis* degrades

mucin and undermines gastric mucosal integrity. **Biochem Biophys Res Commun**, v.144, n.1, p.307-14, 1987.

STOLTE, M.; MEINING, A. The updated Sydney system: Classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. **Can J Gastroenterol**, v.15, n.9, p. 591-598, 2001.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* Infection. **N Engl J Med** V.347:1175-1186, 2002.

SUNGIL, J.; KATHLEEN, R. J.; CARA, H.; YOUNG, O.; JOO, M.I.N.; YUN-JUNG, Y.; IN-SIK, C.; JEONG-HEON, C.; SCOTT, D. M.. Epidemiological Link between Gastric Disease and Polymorphisms in VacA and CagA. **J Clin Microbiol**, v.48, p.559-67, 2010.

SUZANA, MANXHUKA-KERLIU.; SKENDER, T.; EMINE, D.; HALIL, A.; VJOLLCA, S.; AGRON, K.; SADUSHE, L.; LABINOT, S.; GONETA, G.; ARIJETA, P. *Helicobacter pylori* gastritis updated sydney classification applied in our material. **Sec Biol Med Sci**, v. XXX, n. 1, p. 45–60, 2009.

TAKAHASHI, S.; NAKAMURA, E.; OKABE, S. Effects of Cytokines, Without and with *Helicobacter pylori* Components, on Muçus Secretion by Cultured Gastric Epithelial Cells. **Dig Dis Sci**, v.10, p.2301-2308, 1998.

TATSUTA, M.; ISHII, H.; YAMAMURA, H.; YAMAMOTO, R.; TANIGUCHI, H. Enhancement by tetragastrin of experimental induction of gastric epithelium in the duodenum. **Gut**, v.30, p.311–315, 1989.

TEIXEIRA, A.; DAVID, L.; REIS, C.A.; COSTA, J.; SOBRINHO-SIMÕES, M. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and type 1 Lewis antigens in cases with and without *Helicobacter pylori* colonization in metaplastic glands of the human stomach. **J Pathol** v.197, n.1, p.37-43, 2002.

VANNELLA, L.; LAHNER, E.; OSBORN, J.; BORDI, C.; MIGLIONE, M.; DELLE, F. G.; ANNIBALE, B. Risk factors for progression to gastric neoplastic lesions in patients with atrophic gastritis. **Aliment Pharmacol Ther**, v.31, p.1042-1050, 2010.

VANNELLA, L.; LAHNER, E.; ANNIBALE, B. Risk for gastric neoplasias in patients with chronic atrophic gastritis: A critical reappraisal. **World J Gastroentero**, v.18, n.12, p.1279-1285, 2012.

WALKER, M. M.; DIXON, M. F. Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 10, n.1, p.119–128,1996.

WARREN, R.J.; MARSHALL, B.J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v.1, p. 1273-1275, 1983.

WIEDEMANN, T.; LOELL, E.; STOECKELHUBER, M.; STOLTE, M.; HAAS, R.; RIEDER, G. *Helicobacter Pylori* cag-Pathogenicity Island-Dependent Early Immunological Response Triggers Later Precancerous Gastric Changes in Mongolian Gerbils. **PloS ONE**. V.4, p.1-13, 2009.

WIRTH, HANS-PETE.; BEINS, M.H.; YANG, M.; THAM, K.T.; BLASER, M.J. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and *Helicobacter pylori* strains. **Infect Immun**, v.66, p.4856-66, 1998.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D.Y.; SEPULVEDA, A.R. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. **J Clin Microbiol**, v. 8, p.2258-63, 1998.

YAMAOKA, Y.; YAMAUCHI, K.; OTA, H.; SUGIYAMA, A.; ISHIZONE, S.; GRAHAM, D. Y.; MARUTA, F.; MURAKAMI, M.; KATSUYAMA, T. Natural History of Gastric Mucosal Cytokine Expression in *Helicobacter pylori* Gastritis in Mongolian Gerbils. **Infect Immun**, v.73, n. 4, p.2205–2212, 2005.

YEPES, S.; TORRES, M. M.; SAAVEDRA, C.; ANDRADE, R. Gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphomas and *Helicobacter pylori* infection: A Colombian perspective. **World J Gastroenterol**, v.18, n.7, p. 685-691, 2012.

ZAVROS, Y.; RIEDER, G.; FERGUSON, A.; SAMUELSON, L. C.; MERCHANT, J. L. Hypergastrinemia in response to gastric inflammation suppresses somatostatin. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.282, p.175–183, 2002.

10. ANEXOS

10.1 Figuras

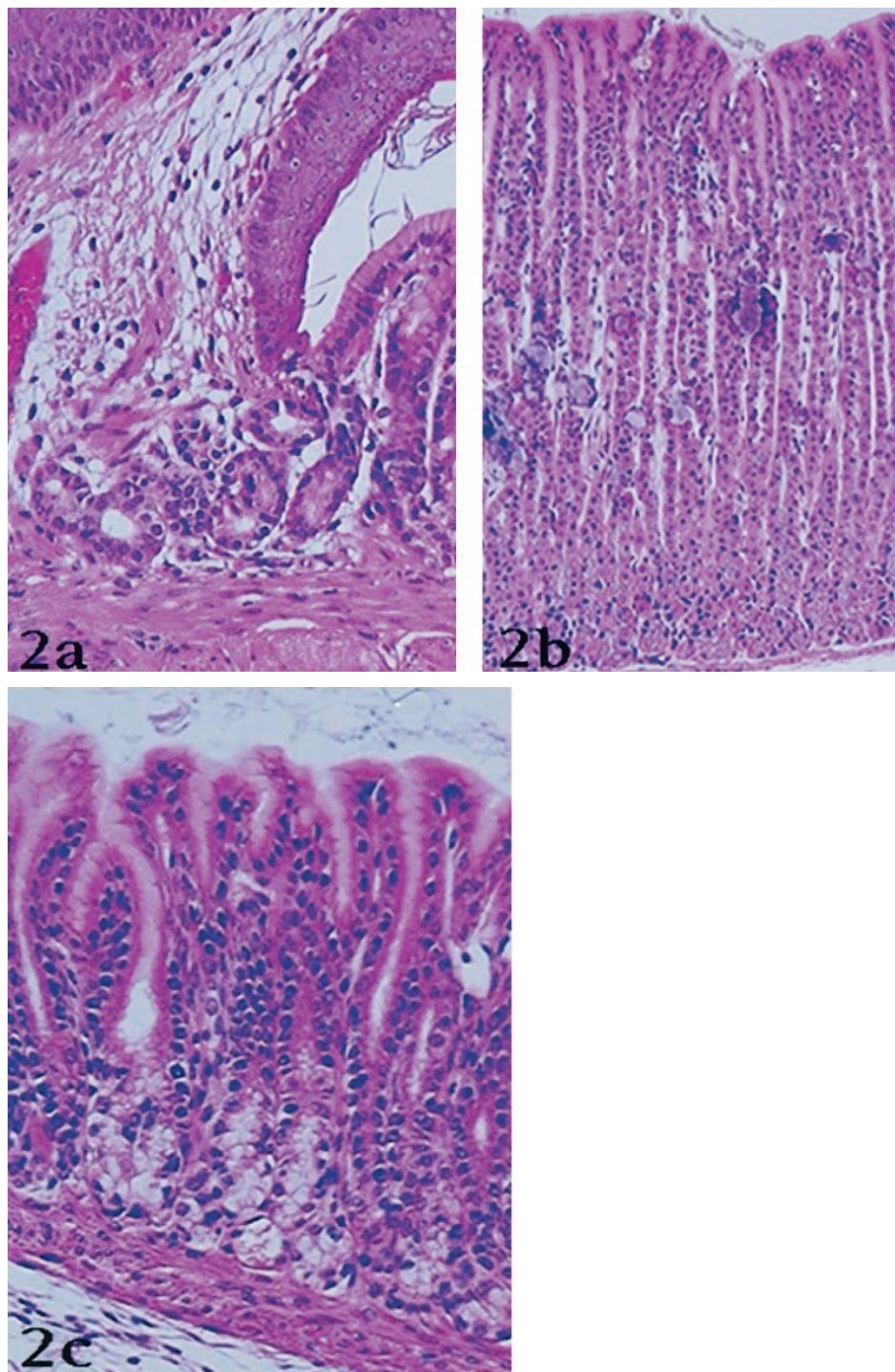


Figura 2- Aspectos Morfológicos da Mucosa Gástrica Normal do Gerbil. (a) mucosa cárdica; (b) mucosa fúndica; (c) mucosa pilórica.

FONTE: Ilkeno T *et al.* Intestinal Metaplasia, and Gastric Ulcer in Mongolian Gerbils. *Am. J. Pathology*, v.154, n.3, p.951-960, 1999.

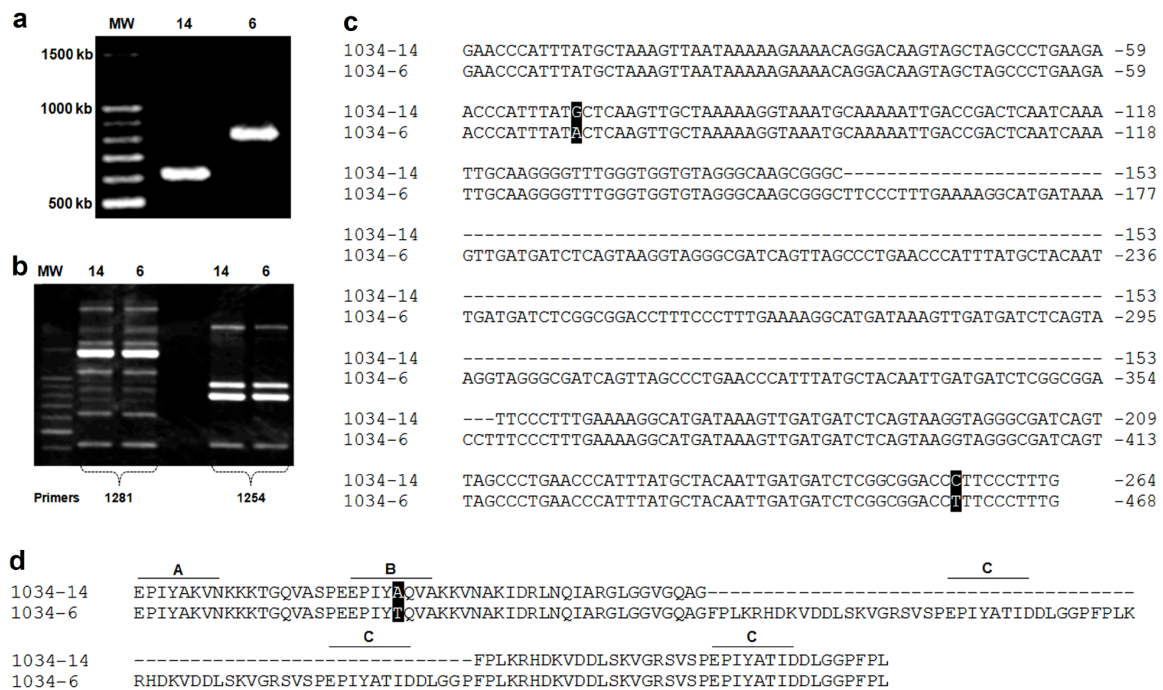


Figura 4 - Isolados de *H. pylori* pareados a partir de um único paciente que difere na região *cagA* 3'. (a) Reação em cadeia da polimerase mostrando o tamanho diferente do alelo *cagA* dos isolados 1034-14 e 1034-6. (b) Perfis Idênticos RAPD-PCR dos isolados 1034-14 e 1034-6 com dois conjuntos de primers, 1281 e 1254 (c) O sequenciamento dos produtos de PCR demonstrou uma inserção de 204 pb no isolado 1034-6 em comparação com o isolado com o isolado 1034-14. (d) A tradução das sequências de nucleótidos identificada em uma inserção que corresponde a dois motivos idênticos EPIYA-C e sites de multimerização no isolado 1034-6.

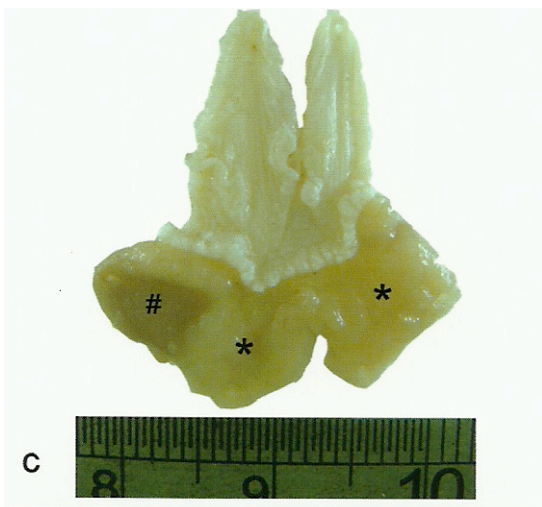
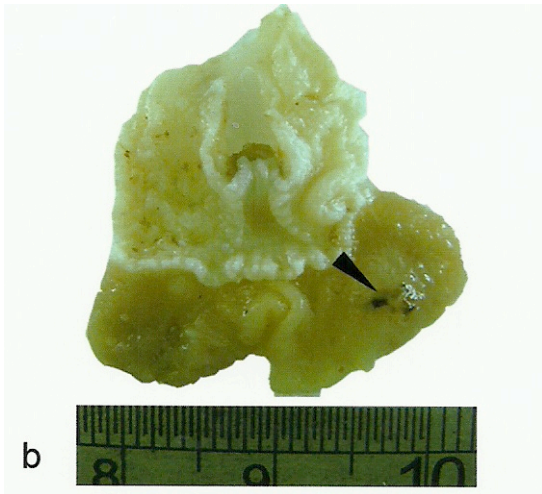
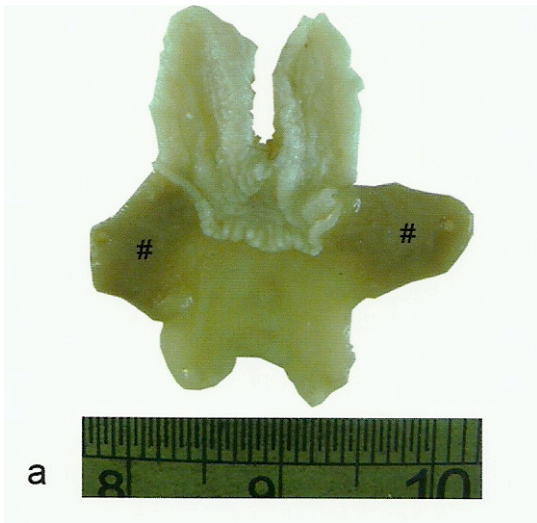


Figura 5 - Estômago de gerbils controles ou infectados com *H. pylori* CagA positiva, com um ou três segmentos EPYA-C, aos seis meses de infecção. (a) mucosa gástrica normal de um animal do grupo controle. (b) lesão plana, de coloração vinhosa e aspecto hemorrágico sobre a mucosa oxíntica de um animal do grupo CagA1Ep. (c) Expansão da mucosa antral (*) sobre a mucosa oxíntica (#) de um animal do grupo CagA3Ep.

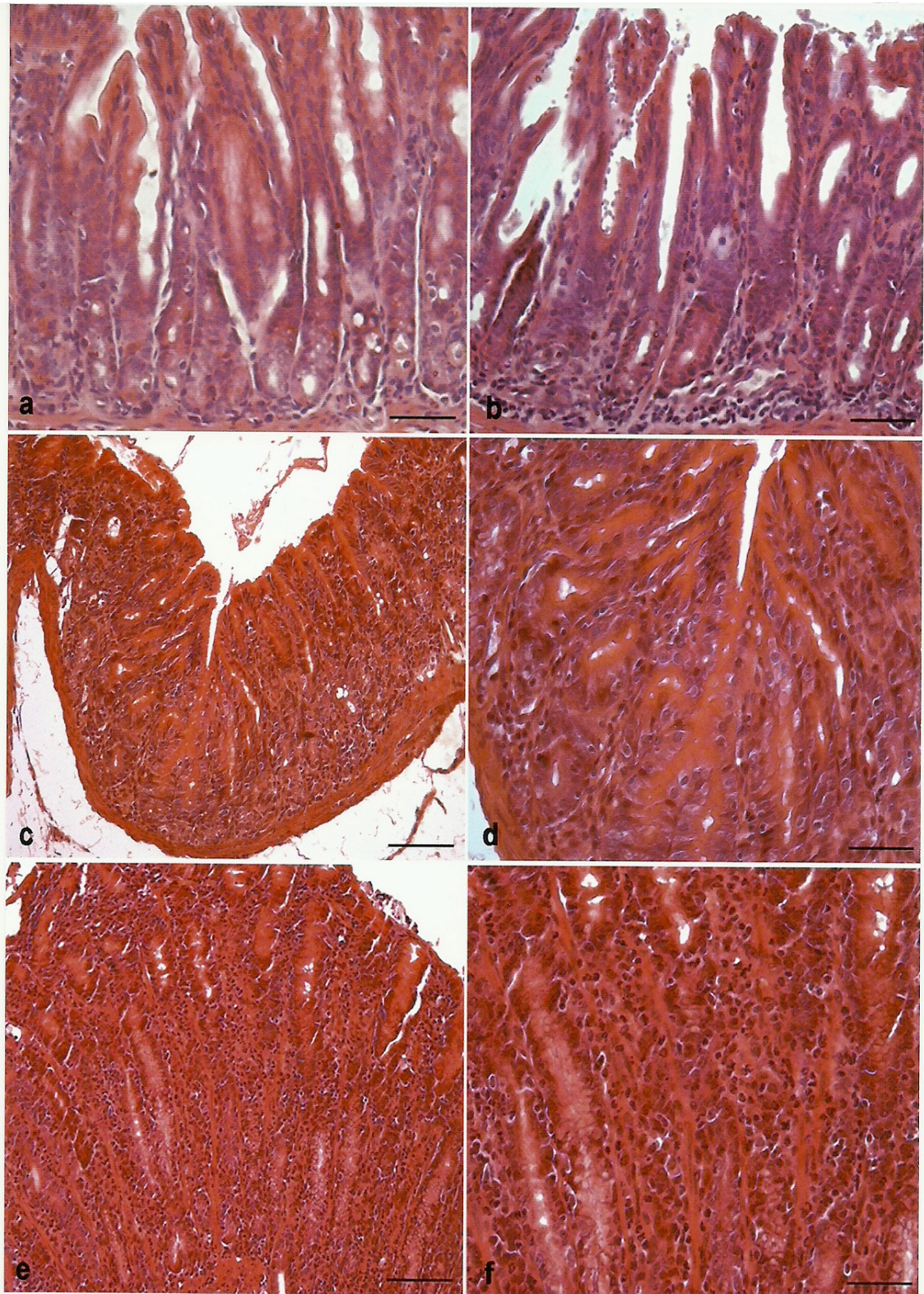


Figure 6 – Fotomicrografia da mucosa antral de gerbils infectados com *Helicobacter pylori* CagA positiva, com um ou três segmentos EPYA-C: (a) Mucosa antral de um animal do grupo CagA1Ep 45 dias após a infecção. Inflamação observada no terço basal da mucosa gástrica. (b) Mucosa antral de um animal do grupo CagA3Ep, 45 dias após a infecção. A inflamação foi mais intensa, também afetando o terço médio da mucosa. (c) Mucosa antral de um animal do grupo CagA 1Ep, seis meses após a inoculação. A intensidade da inflamação foi semelhante à observada em (a). (d) Maior aumento da imagem prévia. (e) Mucosa antral de um animal do grupo CagA3Ep seis meses após a infecção. Inflamação de maior intensidade foi observada com aumento na área da lâmina própria. (f) Maior aumento das imagem prévia; H&E. (a), (b), (d) e (f): bar 50µm. (c) e (e): bar 100µm.

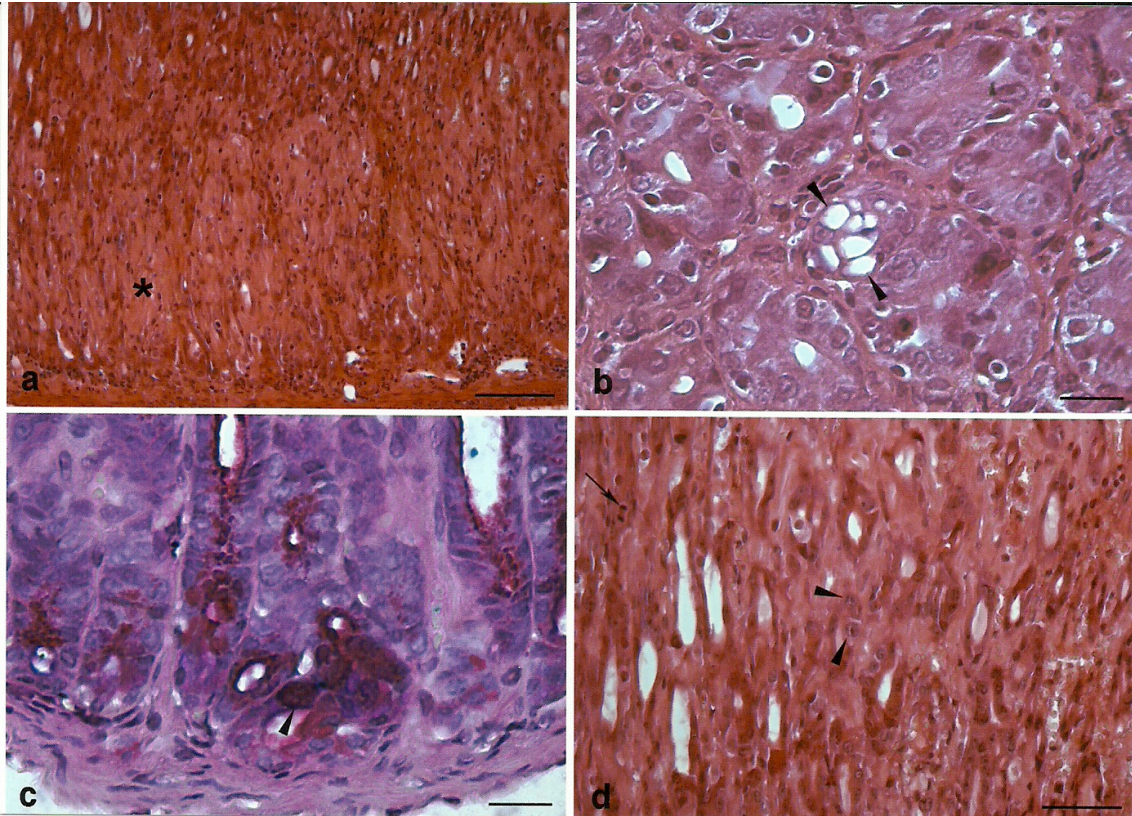


Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa gástrica de gerbils infectados com *H. pylori* aos seis meses de infecção: (a) Atrofia moderada da mucosa oxíntica gástrica, com as glândulas gástricas substituídas por tecido conjuntivo em um animal do grupo CagA3Ep (*), H&E, Bar 100µm; (b) Metaplasia intestinal discreta na mucosa oxíntica de um animal do grupo CagA3Ep. Observar a presença de células caliciformes na mucosa (setas), H&E, Bar 20µm; (c) Presença de células caliciformes na mucosa oxíntica de um animal do grupo CagA1Ep, PAS-Alcian Blue, pH 2.1 a 2,5, positivo (seta) (d) Presença de displasia na mucosa oxíntica gástrica com polimorfismo nuclear e nucléolo evidente (setas) assim como também figura mitótica (seta) em um animal do grupo CagA3Ep, H&E, Bar 50µm.

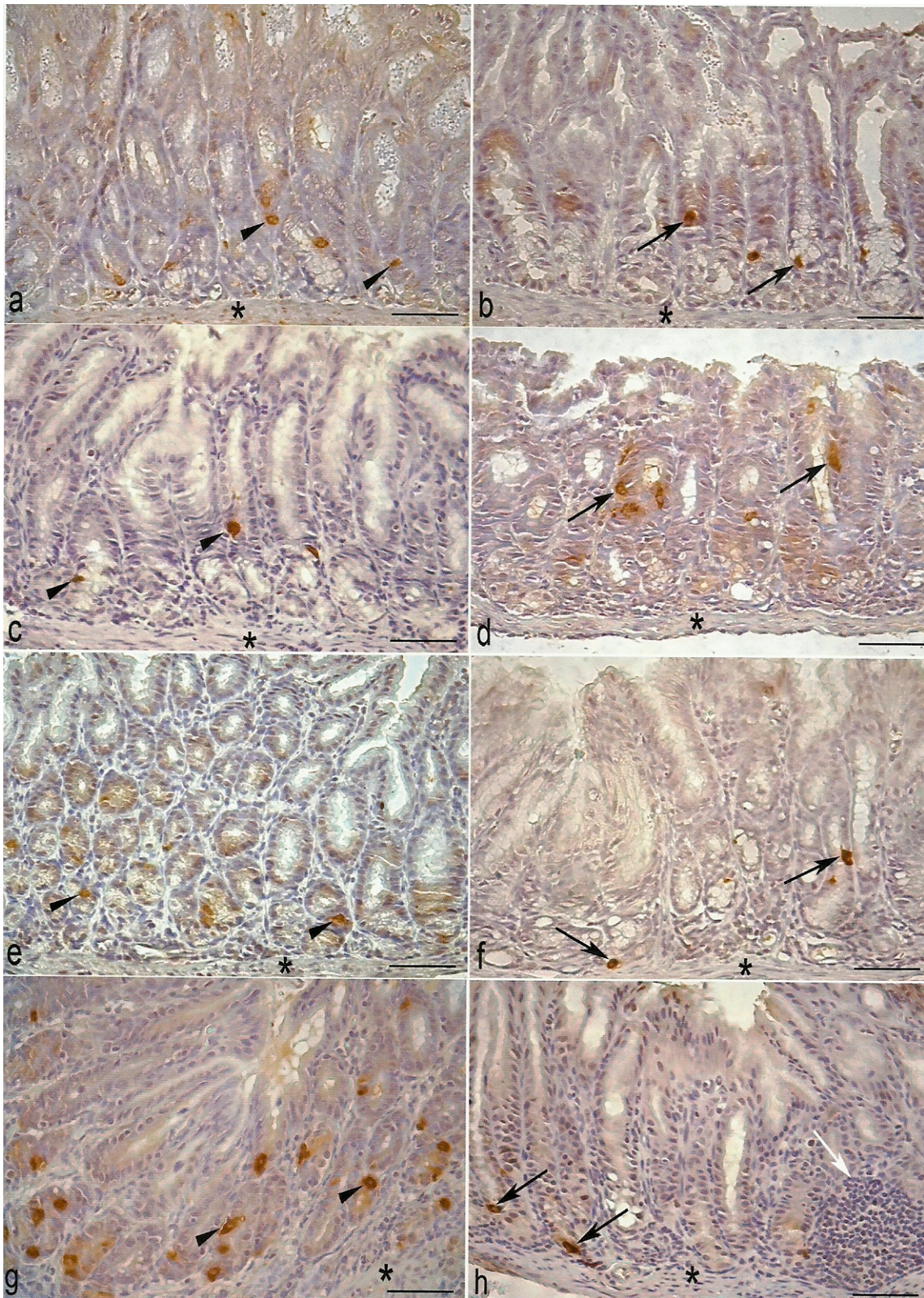


Figura 8 - Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica de células G e D na mucosa antral de gerbils infectados com *Helicobacter pylori* CagA positiva, com um ou três segmentos EPYA-C. Células G (pontas de seta), células D (setas), muscular da mucosa (*), folículo linfóide (seta branca). (a) Grupo Controle: células G⁺ ; (b) Grupo controle: células D⁺ ; (c) Grupo CagA1Ep - seis meses de infecção: células G⁺ ; (d) Grupo CagA1Ep - seis meses de infecção: células D⁺; (e) Grupo CagA3Ep - 45 dias: células G⁺; (f) Grupo CagA3Ep - 45 dias: células D⁺ ; (g) Grupo CagA3Ep - seis meses: células G⁺ ; (h) Grupo CagA3Ep - seis meses: células D⁺. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra: 50 µm.

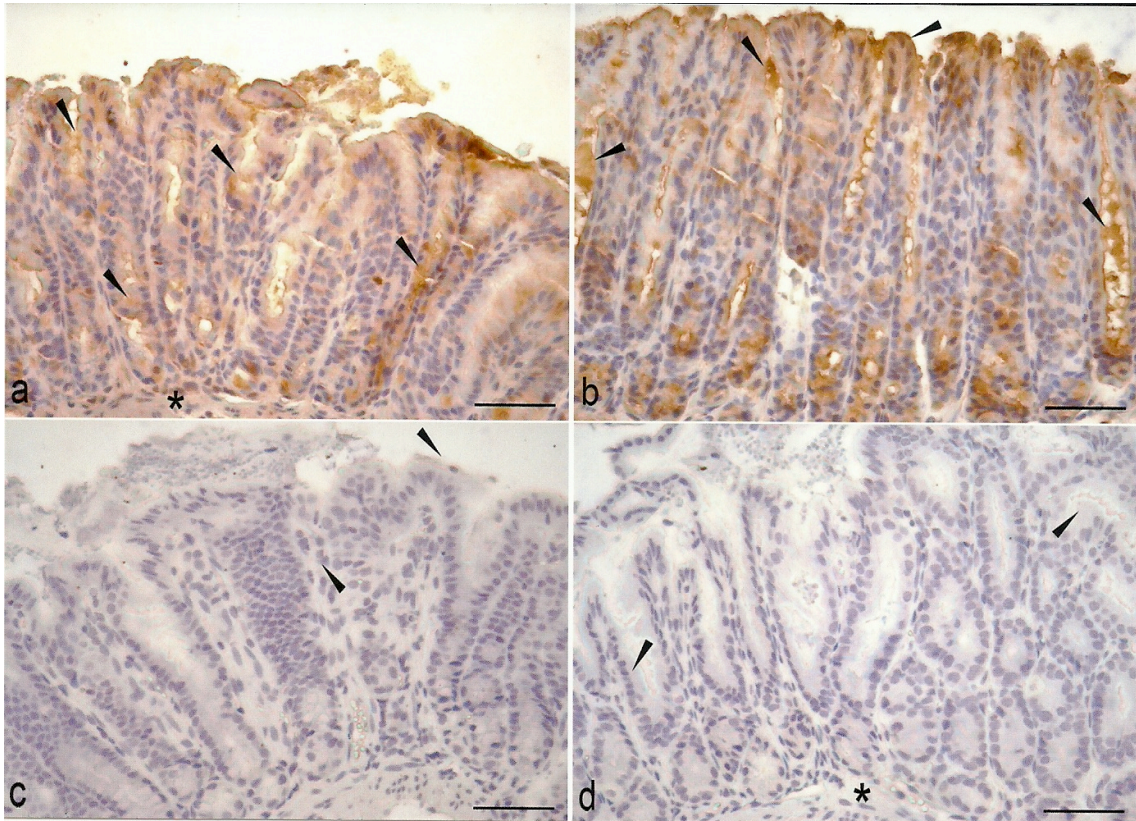


Figura 9 - Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica de mucinas MUC1 e MUC5AC na mucosa antral de gerbils do grupo controle. Muscular da mucosa (*). (a) Reação positiva para MUC1 (cabeças de seta); (b) Reação positiva para MUC5AC (cabeças de seta); (c) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para MUC1; (d) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para MUC5AC. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra: 50 μm .

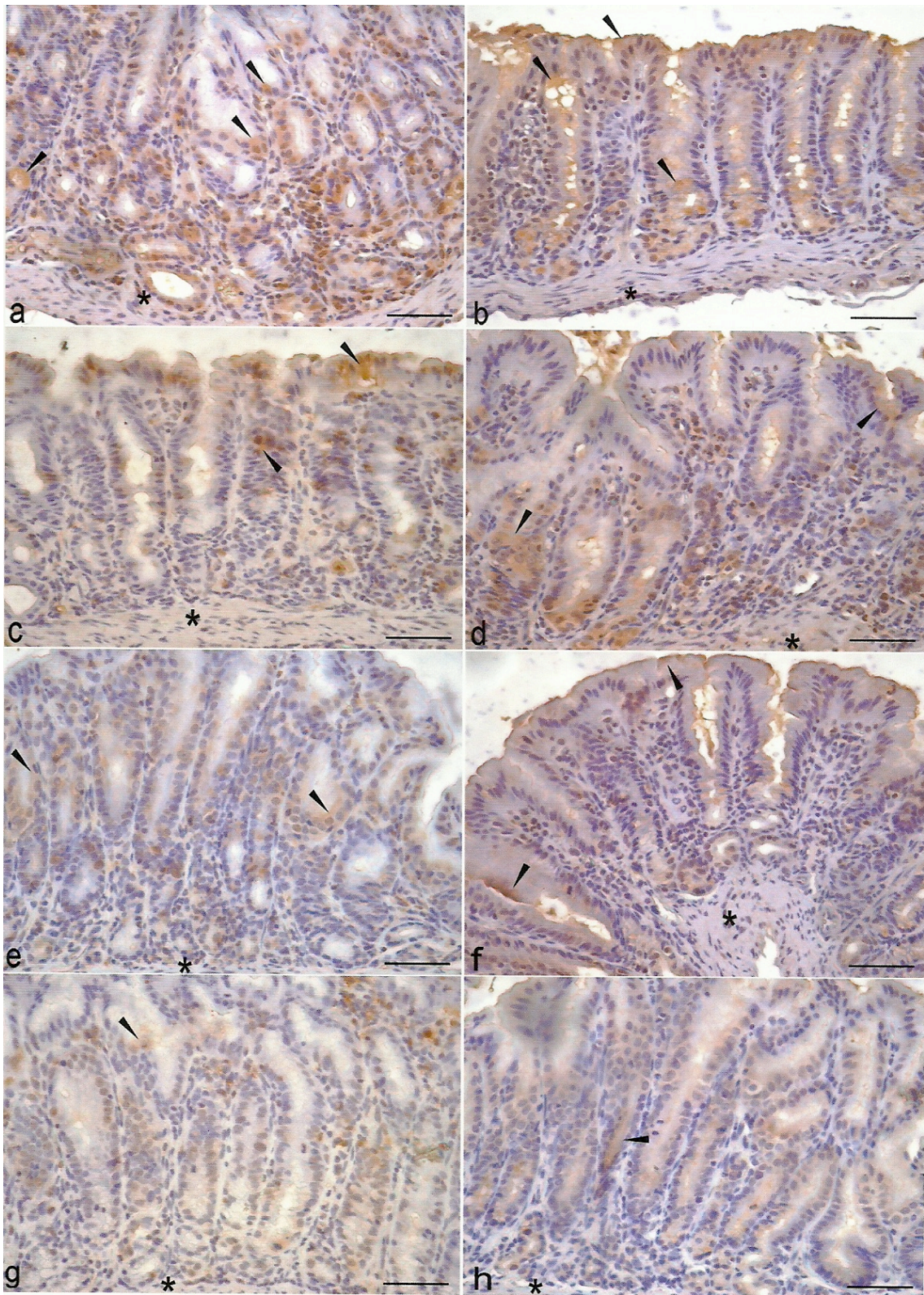


Figura 10 - Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica de mucinas MUC1 e MUC5AC na mucosa antral de Gerbils infectados por *Helicobacter pylori* CagA positiva, com um ou três segmentos EPYA-C. Muscular da mucosa (*). (a) Reação positiva para MUC1 (cabeças de seta) – grupo CagA1Ep – 45 dias de infecção; (b) Reação positiva para MUC5AC (cabeças de seta) – grupo CagA1Ep – 45 dias de infecção; (c) Reação positiva para MUC1 (cabeças de seta) – grupo CagA3Ep – 45 dias de infecção; (d) Reação positiva para MUC5AC (cabeças de seta) – grupo CagA3Ep – 45 dias de infecção; (e) Reação positiva para MUC1 (cabeças de seta) – grupo CagA1Ep – seis meses de infecção; (f) Reação positiva para MUC5AC (cabeças de seta) – grupo CagA1Ep – seis meses de infecção; (g) Reação positiva para MUC1 (cabeças de seta) – grupo CagA3Ep – seis meses de infecção; (h) Reação positiva para MUC5AC (cabeças de seta) – grupo CagA3Ep – seis meses de infecção. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra: 50 μ m.

Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)

M. Ferreira Júnior,¹ S.A. Batista,²
P.V.T Vidigal,³ A.A.C. Cordeiro,¹
F.M.S. Oliveira,¹ L.O. Prata,¹
A.E.T. Diniz,⁴ C.M. Barral,⁴
R.C. Barbuto,⁴ A.D. Gomes,²
I.D. Araújo,⁴ D.M.M. Queiroz,^{2*}
M.V. Caliari^{1*}

¹Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte

²Laboratory of Research in Bacteriology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte

³Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte

⁴Surgery Department, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

*Joint senior authors

region and of *oipA*. The other virulence markers were present in both isolates (*vacA* sli1d1m1, *iceA2*, and intact *dupA*). CagA of both isolates was translocated and phosphorylated in AGS cells. After 45 days of infection, there was a significant increase in the number of inflammatory cells and in the area of the *lamina propria* in the infected animals, notably in those infected by the CagA-positive strain with three EPIYA-C phosphorylation sites. After six months of infection, a high number of EPIYA-C phosphorylation sites was associated with progressive increase in the intensity of gastritis and in the area of the *lamina propria*. Atrophy, intestinal metaplasia, and dysplasia were also observed more frequently in animals infected with the CagA-positive isolate with three EPIYA-C sites. We conclude that infection with *H. pylori* strain carrying a high number of CagA EPIYA-C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in an animal model of *H. pylori* infection.

Introduction

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral bacterium that chronically infects the gastric mucosa of more than 50% of the world population.¹ The infection is associated with chronic gastritis, gastric and duodenal peptic ulcer, gastric adenocarcinoma and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma.² Inflammation, atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia, and gastric carcinoma are noteworthy³ among the histological changes in the gastric mucosa caused by the colonisation of *H. pylori*.

It is well demonstrated that there is a geographic variation among the *H. pylori* strains that exhibit a broad range of genetic diversity. A striking difference that characterises more virulent strains is the presence of the *cag* PAI (*cag* pathogenicity island) with approximately 40-Kb consisting of 27-31 genes.⁴ Among them, the *cagA* gene encodes the CagA protein that possesses carcinogenic properties. The island is responsible for coding a type IV secretion system (T4SS), which allows the entrance of CagA protein inside the gastric epithelial cells, followed by protein phosphorylation and the activation of proinflammatory and antiapoptotic genes that increase the risk of developing precancerous lesions.^{5,6} CagA phosphorylation occurs on tyrosine residues in a repeated five-amino-acid sequences located in the carboxyl terminus, denominated EPIYA (Glu, Pro, Ile, Tyr and Ala) A, B, C, and D according to different flanking amino acids. The D (Eastern) and C (Western) are the main sites for CagA phosphorylation by multiple members of the Src kinase family. Phosphorylated CagA forms a

Correspondence: Prof. Marcelo Vidigal Caliari, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, CEP 31 270-010, Brazil.
Tel. +55.31.34092892 -Fax: +55.31.34092879.
E-mail: caliari@icb.ufmg.br

Key words: Gastritis, atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia, Mongolian gerbil, *cagA* EPIYA C motif.

Contributions: SAB, ADG, DMMQ, DNA extraction, RUT, analysis of CagA translocation and DNA sequencing; PVT, IDA, classification and grading of gastritis by the Sydney system and macroscopic analysis of the gastric mucosa; MFJ, MVC, AETD, CMB, RCB, inoculation of the animals, necropsy and histopathological techniques; MFJ, FMSO, AACC, LOP, immunohistochemical techniques; MVC, AACC, MFJ, morphometric analysis of the inflammatory infiltrate and the area of the antral lamina propria; DMMQ, Data analysis; DMMQ, MVC, MFJ, wrote the paper; DMMQ, MVC, IDA, designed the study, supervised the laboratory works. All authors read and approved the manuscript.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: this work was financially supported by the Dean of Research of the Federal University of Minas Gerais (Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais-PRPq/UFMG), The Minas Gerais State Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG), and the National Council for Research and Development (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq).

Received for publication: 3 February 2015.

Accepted for publication: 4 April 2015.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright M.F. Júnior et al., 2015
Licensee PAGEPress, Italy
European Journal of Histochemistry 2015; 59:2489
doi:10.4081/ejh.2015.2489

complex with SHP-2 phosphatase triggering abnormal cellular signals that lead to deregulation of cell growth, cell to cell contact and cell migration, elongation of epithelial cells and increase of epithelial cell turnover, which enhance the risk of acquiring precancerous changes.^{5,7} Human infection with CagA-positive *H. pylori* strains containing high number of EPIYA-C phosphorylation sites is associated with a more severe chronic gastritis and an increased risk of developing intestinal metaplasia and gastric cancer.^{6,8} However, we are

Abstract

Infection with *Helicobacter pylori* strains containing high number of EPIYA-C phosphorylation sites in the CagA is associated with significant gastritis and increased risk of developing pre-malignant gastric lesions and gastric carcinoma. However, these findings have not been reproduced in animal models yet. Therefore, we investigated the effect on the gastric mucosa of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) infected with CagA-positive *H. pylori* strains exhibiting one or three EPIYA-C phosphorylation sites. Mongolian gerbils were inoculated with *H. pylori* clonal isolates containing one or three EPIYA-C phosphorylation sites. Control group was composed by uninfected animals challenged with Brucella broth alone. Gastric fragments were evaluated by the modified Sydney System and digital morphometry. Clonal relatedness between the isolates was considered by the identical RAPD-PCR profiles and sequencing of five housekeeping genes, *vacA* i/d

unaware of studies confirming, in animal models, the associations observed in human beings.

The aim of this study was therefore to evaluate qualitatively and through digital morphometry, the histological alterations induced by the infection with CagA-positive *H. pylori* strains with different numbers of EPIYA-C on the gastric mucosa of Mongolian gerbil.

Materials and Methods

H. pylori strains

Mongolian gerbil is more easily colonized by *H. pylori* strain that was recently isolated, without many subcultures. Thus, fragments of the antral mucosa of the stomach obtained at surgery from a 71-year-old patient with gastric carcinoma was smeared on BHM agar plates and incubated in microaerophilic conditions at 37°C.⁹ After 48 h of growth, the entire population of bacterial cells recovered from the plates was harvested and stored at -70°C (*H. pylori* stock collection from the Laboratory of Research in Bacteriology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais). Single-colonies of *H. pylori*, obtained from the original culture, were propagated as pools for less than 10 passages before freezing at -70°C. The growth of each colony was tested for EPIYA-C patterns by PCR according to Yamaoka *et al.*¹⁰ and the results were confirmed by sequencing.⁶ Two isolates, LPB 1034-14 and LPB 1034-6, containing one or three EPIYA-C phosphorylation sites, were used to inoculate the animals. Strains isolated from adifferent individuals show substantial genomic diversity, although isolates from single individual or family members are frequently clonal.¹¹ Clonal relatedness between the isolates was evaluated by Random-amplified DNA (RAPD)-PCR by using two sets of primers according to Akopyanz *et al.*¹² and sequencing of the house-

keeping genes *efp* (564 kb), *yphC* (724 kb), *atpA* (829 kb), *ureI* (670 kb) and *mutY* (652 kb)¹³ and the virulence genes involved in the inflammatory response to the infection; *vacA* i/d regions, CT dinucleotide repeated motif region of *oipA*^{14,15} and intact *dupA*.¹⁶ The presence of other *cag* PAI genes involved in the translocation of the *cagA* to the host cells (*cagI*, *cagL*, *cagX*, *cagY* and *cagT*) and *cagE*¹⁷ and the genotype of *vacA* and *iceA*¹⁸ were also evaluated. All primers and PCR conditions are listed in Supplementary Table 1. Two days culture of the isolates was prepared for the inocula. The cells were harvested in Brucella broth (difco). The concentration was adjusted according to OD at 550 nm and the cells were administered to the animals immediately after harvesting.

Analysis of CagA translocation

CagA translocation was confirmed by Western blotting and immunoprecipitation as proposed by Liang *et al.*¹⁹ *Cag* PAI functionality was evaluated by investigating the translocation followed by phosphorylation of the CagA EPIYA-C from the isolates into the human gastric epithelial AGS cells (ATCC® CRL1739™). The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen, São Paulo, Brazil), containing 10% FBS (Invitrogen), incubated at 37°C in a fully humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. On the day of the experiment, confluent cells were incubated overnight in fresh serum and antibiotic-free media. AGS cells were co-incubated with *H. pylori* up to multiplicities of infection of 100:1. After six hours the cells were washed four times with PBS and lysed with a lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors (Roche Applied Science). To confirm the CagA translocation, proteins in the whole cell extracts (30 µg) were separated by SDS-PAGE (4-12% gels) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Invitrogen). After, blotting was blocked in a

solution of 3% skim milk, 0.05% Tween 20, and TBS, the membrane-bound proteins were probed with primary monoclonal antibody against CagA (A-10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The membranes were washed and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 60 min. Antibody-bound protein bands were detected using enhanced chemiluminescence reagents (Millipore, Billerica, MA, USA) and captured with ImageQuant 350 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Immunoprecipitation was performed using 1 mg of the lysate protein obtained from the AGS cells co-incubated with the *H. pylori* isolates. Each sample was incubated overnight at 4°C with monoclonal anti-*H. pylori* CagA antibody (A-10, Santa Cruz Biotechnology) followed by four hours at 4°C with 30 µL aliquot of protein G Sepharose beads (Invitrogen). The beads were washed five times with cold lysis buffer, and proteins were eluted by boiling for 10 min in 2x electrophoresis sample buffer containing 5 mmol/L Tris, 10% sodium dodecyl sulfate, 12% 2-mercaptoethanol, 20% glycine, and 1% Bromophenol blue. Immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and incubated with monoclonal anti p-tyr antibody (pY-99, Santa Cruz Biotechnology). The bands were identified by using a chemiluminescence reagent (Millipore) and captured with ImageQuant 350 (GE Healthcare).

DNA extraction

DNA was extracted with the QIAamp kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with slight modifications.²⁰ The DNA concentration was determined by spectrophotometry using the Ultrospec® 2100 Pro apparatus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), and the extracted DNA was kept at -20°C until use.

Table 1. Gastric inflammation, inflammatory activity and the number of lymphoid follicles in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori* 45 days and six months post-inoculation.

Groups	Inflammation (MN cells)				Activity (PMN cells)				LF
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	
45 days									
CTRL	8	0	0	0	8	0	0	0	0
CagA1Ep	0	6	2	0	2	6	0	0	3
CagA3Ep	0	3	5	0	0	5	3	0	12
Six months									
CTRL	8	0	0	0	8	0	0	0	0
CagA1Ep	0	2	6	0	1	4	3	0	13
CagA3Ep	0	1	4	3	0	2	3	3	15

MN, mononuclear cells; PMN, polymorphonuclear cells; LF, lymphoid follicles; CTRL, control group consisting of uninfected animal; CagA1Ep, CagA-positive with one EPIYA-C group; CagA3Ep, CagA-positive with three EPIYA-C group; 0, absent; +, mild; ++ moderate; +++, severe. Significant differences were observed when the controls were compared with the CagA3Ep and with the CagA1Ep animals regarding the scores of MN (P<0.001) and of PMN (P≤0.003) cells after 45 days and six months of infection. Data were analysed by the two tailed Mann-Whitney U test.

H. pylori specific urea, cagA and cagA 3' variable region in the gastric mucosa

The primers and conditions used for the amplification of urea and cagA were previously described by Clayton *et al.*²¹ and Peek *et al.*²² and the cagA 3' region was amplified according to Yamaoka *et al.*¹⁰ (Supplementary Table 1).

Sequencing of the cagA 3' variable region, vacA i/d region, intact dupA, and CT dinucleotide repeat motif region of oipA

In general, PCR products were purified with the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, MI, USA) according to the manufacturer's recommendations and sequenced using an ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing kit in an ABI Prism 310 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences obtained were aligned using the CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Regarding the dupA, the primer walking methodology using five primer sets was employed (Supplementary Table 1).¹⁶ After alignment, nucleotide sequences of the cagA 3' variable region and vacA i/d region were transformed into aminoacid sequences using the Blastx program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The nucleotide sequences of the gene loci of the gene strains were deposited in GenBank under the following accession numbers: *efp* GenBank accession numbers KP723366, KP723367, KP723368; *yphC* GenBank accession numbers KP723369, KP723370, KP723371; *atpA* GenBank accession numbers KP723372, KP723373, KP723374; *ureI* GenBank accession numbers KP723375, KP723376, KP723377; *mutY* GenBank accession numbers KP723378, KP723379, KP723380.

Animals

Forty-eight three-month-old female Mongolian gerbils obtained from the animal house of the Institute of Biological Sciences/Universidade Federal de Minas Gerais were maintained with appropriate nutrition, ventilation and lighting conditions and handled in accordance with the ethical standards of the UFMG. They were divided into three experimental groups: a control group consisting of uninfected animals challenged with Brucella broth alone (CTRL), animals inoculated with *H. pylori* CagA-positive strain with one EPIYA-C segment (CagA1Ep), and animals inoculated with *H. pylori* CagA-positive strain with three EPIYA-C segments

(CagA3Ep). Each group consisted of 16 animals; eight animals from each group were sacrificed 45 days after the inoculation, and the remaining eight animals were sacrificed six months after the infection.

Prior to the inoculation, the animals were fasted for eight hours and slightly sedated with isoflurane. The inocula of 0.8 mL of the bacterial suspensions containing 10⁹ CFU/mL in sterile Brucella broth or Brucella broth alone (control group) were administered by intragastric gavage three times at intervals of 48 h. Four h after the inoculation, the animals received standard diet for rats (Labina[®], Purina, Brazil) and water *ad libitum*.

Rapid urease test

The rapid urease test (RUT) was performed by incubating one gastric antral fragment into a semi-solid agar containing phenol red 2% and urea 0.01M at 37°C for 24 h.

Histopathological analysis and semi-quantitative evaluation of spiral bacterium

After abdominal incision, the stomach was removed and opened along the greater curvature. Mucosa fragments were obtained along the lesser and greater curvatures, including the regions of the gastric body and gastric antrum for DNA, RUT and histology. For histological processing, the fragments were fixed in 10% buffered formalin for 48 h. Four µm thick tissue sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) for histological analyses and Silver staining confirmed by Carbofuchsin staining for the semi quantitative evaluation of the spiral bacteria load in scores (from 0 to 3) in the gastric glands.²³ Single organism or no more than two small clusters of stainable organisms were scored as 1, three to six clusters were scored as 2 and more than six as 3.²⁴ The H&E stained sections were used for the histopathological analysis and the classification of gastritis using the Sydney system,³ as well as for the morphometric analysis of the inflammatory infiltrate and calculation of the antral lamina propria area. The presence of intestinal metaplasia was confirmed by using the PAS-Alcian Blue technique, pH 2.5, which stains acid mucins.

Classification and grading of the gastritis by the modified Sydney system

The degree of gastric inflammation (mononuclear cells; MN) and activity (polymorphonuclear cells; PMN) was evaluated by the modified Sydney system³ and classified as follows: absent (no inflammatory cells), mild, moderate, and severe, according to the num-

ber of inflammatory cells. The presence of atrophy, intestinal metaplasia, and dysplasia as well as lymphoid follicles were also investigated.

Morphometric analysis of the inflammatory infiltrate and antral lamina propria area

All histological sections were analysed with a 40x objective, and 15 images of the gastric antral mucosa were captured using a Q-Color3 microcamera (Olympus, Tokyo, Japan). A total area of 1.37×10⁶ µm² of mucosa was analysed for each case. Algorithms from the KS300 software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) were used for image processing and segmentation, definition of the morphometric conditions, cell counting, and calculation of the area of the lamina propria. Segmentation allowed to select the nuclei of all cell types present in the lamina propria of the antral mucosa and to exclude the cell cytoplasm and other structures present in the histological sections. By this process, a binary image was created, and the nuclei of all cell types presented in the antral mucosa were counted. The result obtained in the control animals was considered the expected cellular pattern of the antral mucosa without inflammatory infiltration. In the infected animals, the nuclei of the cell types normally present in the lamina propria of the antral mucosa and nuclei of leukocytes recruited in the inflammatory process were counted, allowing a quantitative assessment of inflammation by a method that we previously used in other studies.²⁵ Subsequently, all pixels of the lamina propria were selected to obtain another binary image to calculate the area in µm².

Statistical analysis

The comparison between the degree of inflammation and activity of the gastritis as well as the scores of the spiral microorganism among the groups were evaluated by the two tailed Mann-Whitney U test. Because the number of inflammatory cells and the area of the antral lamina propria were not normally distributed, even after log transformation, the morphometric data were compared among the different groups and periods of infection by the two tailed Mann-Whitney U test. P values ≤0.05 were considered significant.

Results

Comparison of the two *H. pylori* isolates

The isolates yielded cagA PCR products with different size of 640 and 850 bp (Figure 1a). The sequence analyses demonstrated an inser-

tion of 204-bp in the isolate LPB1034-6 compared with the isolate LPB1034-14. The *cagA* sequences were 99.2% identical (Figure 1c). Translation of the nucleotide sequences identified an insertion that corresponds to two identical EPIYA-C motifs and multimerization sites in the LPB1034-6 isolate (Figure 1d).

The strains were considered closely related, by the identical RAPD-PCR profiles (Figure 1b) and identical *oipA*, with 9 CT (Supplementary Figure 1a), *vacA i/d* (Supplementary Figure 1b), and five housekeeping genes sequences (*efp* GenBank accession number 1794575; *ypbC* GenBank accession number 1794676; *atpA* GenBank accession number 1794697; *ureI* GenBank accession number 1794705; *mutY* GenBank accession number 1796141). Since the *cagE*, *cagI*, *cagL*, *cagX*, *cagY* and *cagT* genes are involved in the induction of IL-8 secretion and the lack of one of them may impair the CagA translocation, their presence was also evaluated and confirmed in both isolates. Furthermore, the genotypes of the other bacterium virulence markers involved in gastric inflammation (*vacA s1i1d1m1*, *iceA2*, and intact *dupA* with 1884 bp) were identical in both isolates.

Translocation of CagA into AGS cell

The lysates obtained after co-incubation of the isolates and AGS cells were subjected to immunoprecipitation and Western blot using anti-CagA and anti-pY99 monoclonal antibodies. The results in Figure 2 show that the precipitate protein reacted with both anti-CagA and anti-phosphotyrosine demonstrating that CagA is the tyrosine phosphorylated protein.

H. pylori status

The animals were considered *H. pylori* infected when two were positive among the tests. RUT was positive in 84.4% of the infected animals and negative in all control animals. The *ureA* as well *cagA* genes were present in the gastric mucosa of all infected animals, but not in the gastric mucosa of the control animals. PCR to detect the number of CagA EPIYA-C motifs was positive in 45 days and six months post-infection in all infected animals. The EPIYA-C PCR results were confirmed by sequencing without differences before and after inoculation (Figure 1 c,d). The virulence genes remained present as detected by PCR.

In the inoculated animals, the degree of

stainable spiral organism varied from 1 to 3 (median=2) in both groups infected with strains containing one or three EPIYA-C segments either 45 days or six months post-infection without differences between the groups ($P=0.53$). The bacterial load was higher in the antral (median=2) than in the oxyntic (median=1) gastric mucosa in both infected animal groups ($P=0.04$).

Macroscopic analysis of the gastric mucosa

Forty-five days after the infection, none of the control animals exhibited macroscopic alterations in the gastric mucosa. Six months post-infection, macroscopic lesion continued to be absent in the control group (Figure 3a). Among the eight animals from the CagA1Ep group, one exhibited a non-ulcerative flat red/purple haemorrhagic lesion in the oxyntic mucosa (Figure 3b). A reduction of the oxyntic mucosa as a consequence of an expansion of the antral mucosa area was observed in the stomach of another animal from the CagA1Ep group and of four animals from the CagA3Ep group. In one animal from the CagA3Ep group, the expansion of the antral mucosa was more

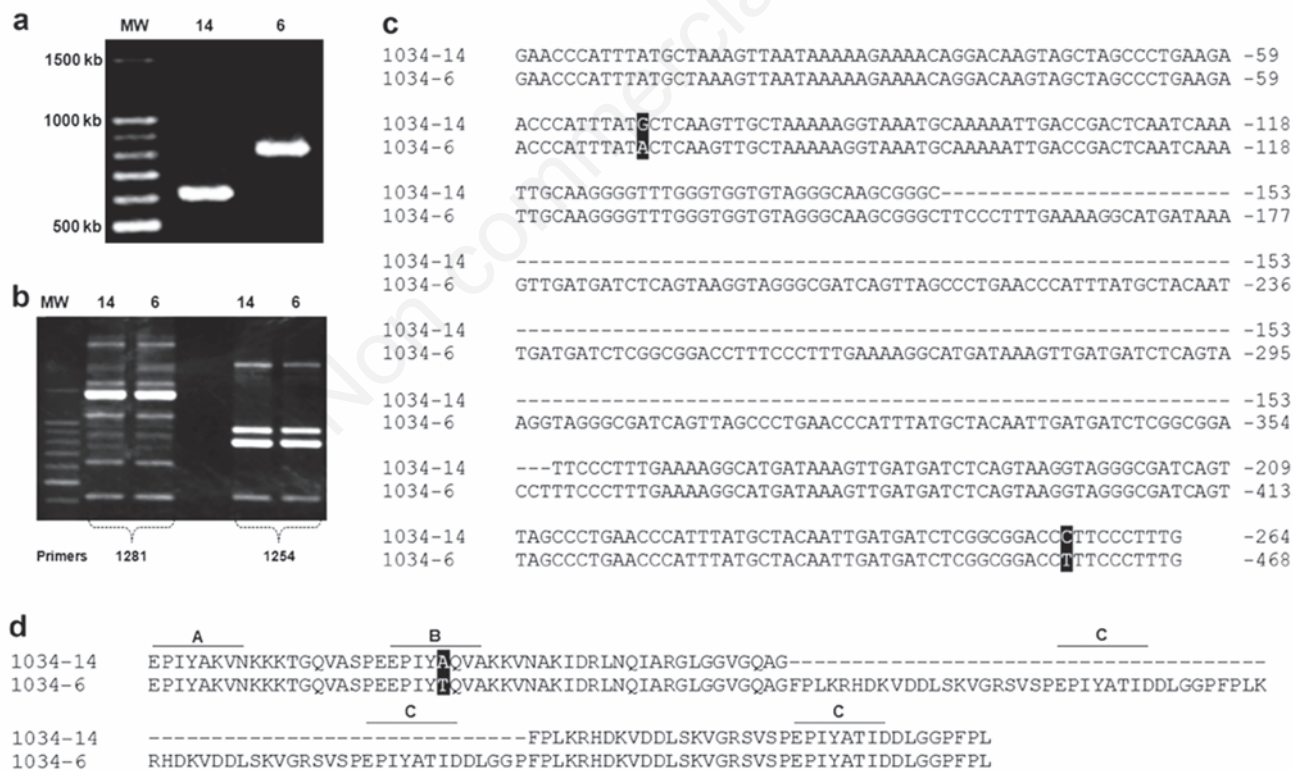


Figure 1. Paired *H. pylori* isolates from a single patient that differ in the *cagA* 3' region. a) Polymerase chain reaction showing different *cagA* allele size of the isolate 1034-14 and 1034-6. b) Identical RAPD-PCR profiles of the isolates 1034-14 and 1034-6 with two sets of primers, 1281 and 1254. c) The sequencing of the PCR products demonstrated an insertion of 204-bp in the isolate 1034-6 compared with the isolate 1034-14. d) Translation of the nucleotide sequences identified an insertion that corresponds to two identical multimerization sites and EPIYA-C motifs in the 1034-6 isolate.

marked, resulting in almost complete loss of the oxyntic mucosa (Figure 3c).

Classification and grading of gastritis by the Sydney system

The results regarding the classification and grading of the gastritis according to the Sydney system are shown in Table 1. Only few sparsely distributed MN cells were observed in the antral mucosa of the control animals either 45 days or six months after the inoculation, which was considered the expected cellularity pattern of the antral *lamina propria* of gerbil in the age ranges studied.

Forty-five days post-inoculation, all animals from the CagA1Ep and CagA3Ep groups exhibited gastric inflammatory infiltrate composed by lymphocytes, macrophages, plasmocytes, and neutrophils, predominantly in the basal mucosa (Figure 4a). These cells were also

found in the middle third of the gastric mucosa and in the glandular epithelium in some animals from the CagA3Ep group (Figure 4b). The inflammation was mild in the stomach of most animals of the CagA1Ep group, whereas, moderate degree of gastric inflammation was observed in five gerbils of the CagA3Ep group. A higher degree of gastritis activity ($P=0.03$) and a tendency of higher degree of MN cells ($P=0.1$) were observed in the CagA3Ep group when compared with the CagA1Ep group (Table 1). Significant differences were observed in respect to all parameters when the controls were compared with the CagA3Ep animals in relation to the scores of MN and PMN cells ($P<0.001$) and with the CagA1Ep animals regarding to MN ($P<0.001$) and PMN ($P=0.003$) cells (Table 1).

Six months post-inoculation, the degree of gastric mucosa MN ($P=0.01$) and PMN

($P=0.04$) cells was more pronounced in the animals at six months of infection than in the 45 days post-infection animals (Figure 4 c-f, Table 1). The inflammatory infiltrate was more intense at the base, but expanding to the middle third of the mucosa in most animals, especially in those from the CagA3Ep group. The inflammatory infiltrate also reached the apical third of the mucosa in animals from the CagA3Ep group (Figure 4 e,f). There was a significant higher degree of neutrophils ($P=0.05$) in the gastric mucosa of the CagA3Ep when compared to CagA1Ep group. There was also a trend towards an increase score of MN cells in the CagA3Ep group compared with the CagA1Ep group ($P=0.06$) (Table 1). The lymphoid follicles were abundant in both groups of infected animals, with no difference between them. Other lesions such as atrophy, intestinal metaplasia and dysplasia were also observed in

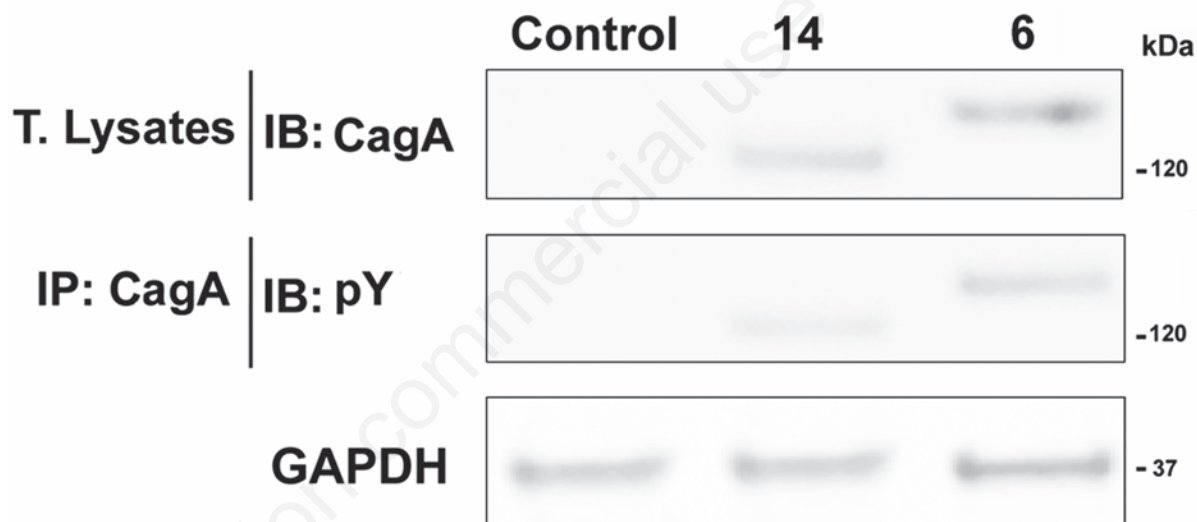


Figure 2. Immunoblotting analysis of CagA protein and tyrosine phosphorylation of *H. pylori* isolates with CagA possessing one or three EPIYA-C segments in human gastric epithelial cells (AGS). Total lysates of AGS cells after co-incubation with *H. pylori* harbouring CagA with one or three EPIYA-C segments (MOI: 100; for 6 h) were immunoblotted (IB) with anti-CagA (A-10) monoclonal antibody. To assess tyrosine phosphorylation, the total lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-CagA antibody and then immunoblotted (IB) with the anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (PY99). Uninfected AGS cells were used as control. The GAPDH blot served as loading control in each sample.

Table 2. Lesions in the gastric mucosa of Mongolian gerbils of the control group and the groups with six months of infection with *Helicobacter pylori*.

Groups	Intestinal metaplasia				Atrophy				Displasia			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
CTRL	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0	0	0
CagA1Ep	6	2	0	0	4	3	1	0	6	2	0	0
CagA3Ep	4	4	0	0	1	4	3	0	5	3	0	0

CTRL, control group consisting of uninfected animal; CagA1Ep, CagA-positive with 1 EPIYA-C group; CagA3Ep, CagA-positive with 3 EPIYA-C group; 0, absent; +, mild; ++ moderate; +++, severe. Significant differences were observed between the control group and the CagA3Ep group with respect to atrophy ($P<0.001$) and intestinal metaplasia ($P<0.03$) and a trend toward dysplasia ($P=0.06$). The degree of atrophy was also significantly higher ($P=0.03$) in the group of animals infected by the strain containing one EPIYA-C motif when compared with the controls. Data were analysed by the two tailed Mann-Whitney U test.

the infected animals (Figure 5), but not in the control group. Significant differences were observed between the control group and the CagA3Ep group with respect to atrophy ($p < 0.001$), intestinal metaplasia ($P < 0.03$) and a trend toward dysplasia ($P = 0.06$). The degree of atrophy was also significantly higher ($P = 0.03$) in the group of animals infected by the strain containing one EPIYA-C motif when compared with the controls. The scores of atrophy were higher ($P = 0.05$) in the CagA3Ep than in the CagA1Ep group (Table 2).

Morphometric analysis of the inflammatory infiltrate

Forty-five days post-infection, there was a significant increase in the number of inflammatory cells when compared both infected groups with the non-infected animals ($P \leq 0.003$). The number of inflammatory cells was significantly higher in the CagA3Ep than in the CagA1Ep group, ($P = 0.02$) (Figure 6a). Confirming these results, the area of the lamina propria occupied by the inflammatory infil-

trate after the same period of infection was also significantly larger in both infected groups than in the control group ($P \leq 0.003$). CagA3Ep animals showed a larger area than the CagA1Ep animals ($P = 0.01$) (Figure 6b). Six months post-infection, there were significantly higher number of inflammatory cells and larger area of the antral lamina propria in both infected groups compared with the CTRL group ($P \leq 0.004$). Additionally, there was a statistically significant higher inflammatory infiltrate ($P = 0.01$) and a larger area of lamina pro-

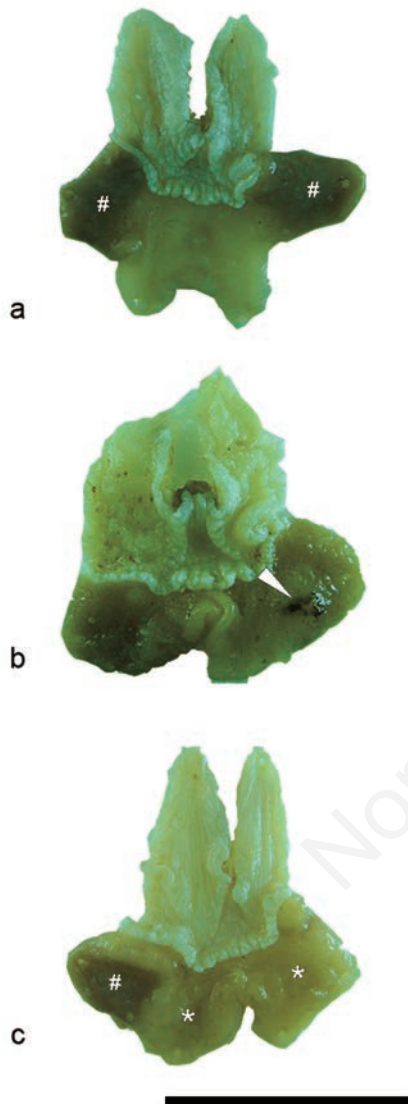


Figure 3. Stomach of Mongolian gerbils infected with *H. pylori* 6 months after the inoculation. a) Normal gastric mucosa of an animal from the control group. b) a flat area with a haemorrhagic aspect (arrowhead) in the antral mucosa of an animal from the CagA1Ep group. c) Expansion of the antral mucosa (*) on the oxyntic mucosa (#) of an animal from the CagA3Ep group. Scale bars: 2 cm.

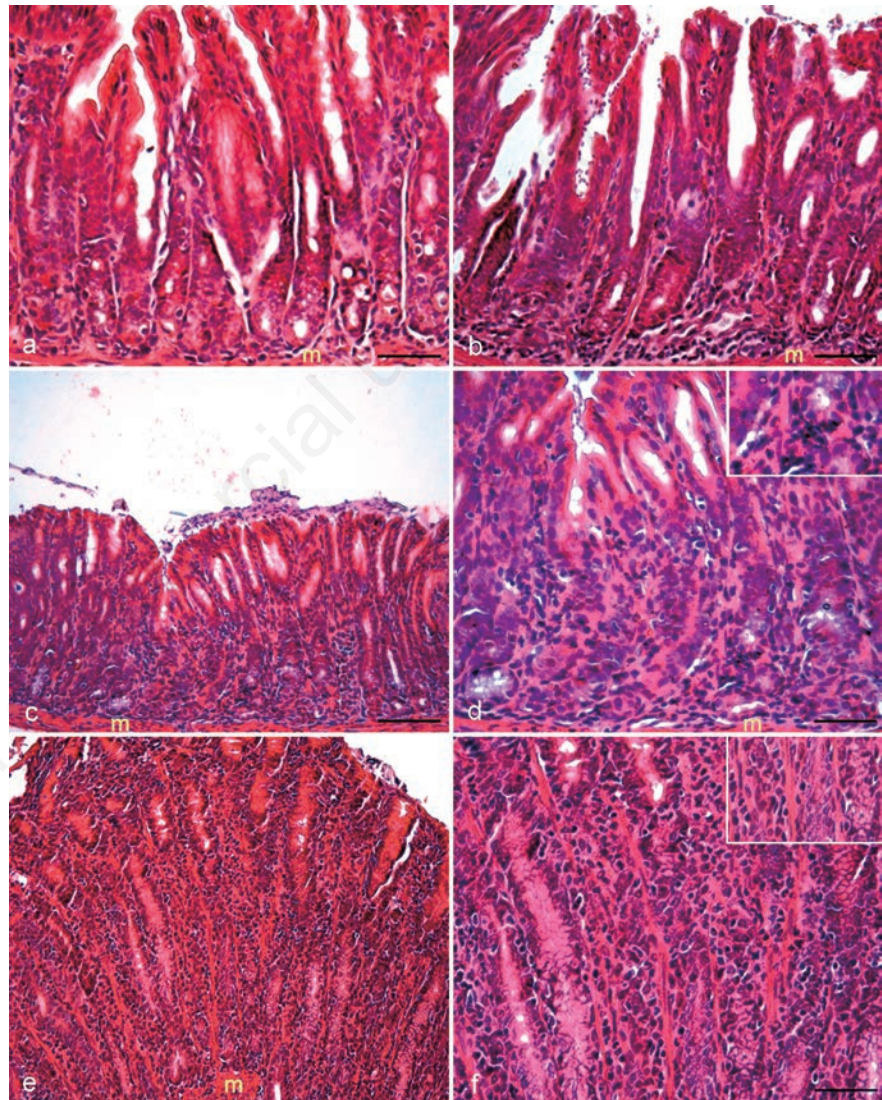


Figure 4. Antral mucosa of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori: muscularis mucosae* (m). a) Antral mucosa of an animal from the CagA1Ep 45 days after the infection; discreet inflammation observed on the basal third of the gastric mucosa. b) Antral mucosa of an animal from the CagA3Ep group 45 days after the infection; inflammation was more severe, also affecting the middle third. c) Antral mucosa of an animal from the CagA1Ep group 6 months after the inoculation. d) Higher magnification of the previous image; insert: detail of the inflammatory infiltrate. e) Antral mucosa of an animal from the CagA3Ep group 6 months after the infection; severe inflammation was observed with increase in the area of the lamina propria. f) Magnification of panel e); insert: detail of the inflammatory infiltrate; H&E. Scale bars: a, b, d, f), 50 μm ; c, e), 100 μm .

pria ($P=0.03$) in the CagA3Ep than in the CagA1Ep group (Figure 6 c,d). A higher number of cells ($P_p=0.007$) and a larger area of *lamina propria* ($P=0.05$) were also observed in the gastric mucosa of infected animals at six months post-infection when compared with the gastric mucosa of animals at 45 days post-infection (Figure 6 e,f).

Discussion

There are studies demonstrating that infection with CagA-positive *H. pylori* strains containing more EPIYA-C phosphorylation sites is associated with more severe gastritis, pre-cancerous gastric lesions and gastric cancer.^{5,6,9,21} However, the associations observed in human beings have not been confirmed experimentally in animal models. The most important finding of this study was the presence of more severe lesions in the gastric mucosa of Mongolian gerbils experimentally infected with *H. pylori* strain carrying three EPIYA-C motifs in the CagA protein and a functional *cagPAI*. There are several studies in the literature that have evaluated both humans and experimental animals infected by *H. pylori* strains containing or lacking the Cag PAI gene in different parts of the world. However, to date, this is the only study investigating *H. pylori* infection of the gastric mucosa with *H. pylori* strains containing different CagA phosphorylation sites in a classic experimental model for studying this type of infection. It is worthy noticing that CagA from both isolates were translocated and tyrosine phosphorylated in AGS cells and that the results we observed did not depend on either the bacterium load or on great differences between the strains others than the EPIYA-C motif number. In fact, the strains, isolated from a single patient, are frequently clonal.^{11,26} In agreement, all sequenced genes were ~100% identical when the isolates were compared. Furthermore, both isolates have the same genotypes of *H. pylori* virulence genes involved in gastric inflammation.²⁷ Therefore, the difference in the number of EPIYA-C segments of the strains results from intragenomic rearrangement and not from horizontal acquisition from another *H. pylori* strain that would differ in nucleotide sequence by ~6% on average.²⁸ One advantage of this study was to use for inoculation isolates with few passages, which colonize the gastric mucosa of gerbil better than manipulated strains or collection strains. The histopathological results evaluated by the semi-quantitative Sydney system and the quantitative morphometric methods were in accordance; however, the last approach allowed a better discrimination between strains containing one or

three EPIYA-C segments in the CagA protein with respect to the number of the inflammatory cells. When crossing the gastric mucous layer, *H. pylori* adheres to epithelial cells, releases toxins, and triggers an inflammatory process characterised as gastritis, which starts in the antral mucosa. This inflammatory process leads to the accumulation of a superficial acute inflammatory infiltrate composed of

lymphocytes, monocytes, plasmocytes, and neutrophils which causes oedema in the *lamina propria*. Forty-five days after the inoculation, a predominantly antral inflammatory infiltrate, an increase in the area of the *lamina propria* and the presence of lymphoid follicles that are characteristic markers of the gastritis caused by *H. pylori*³ were observed in the infected animals, especially in those carrying

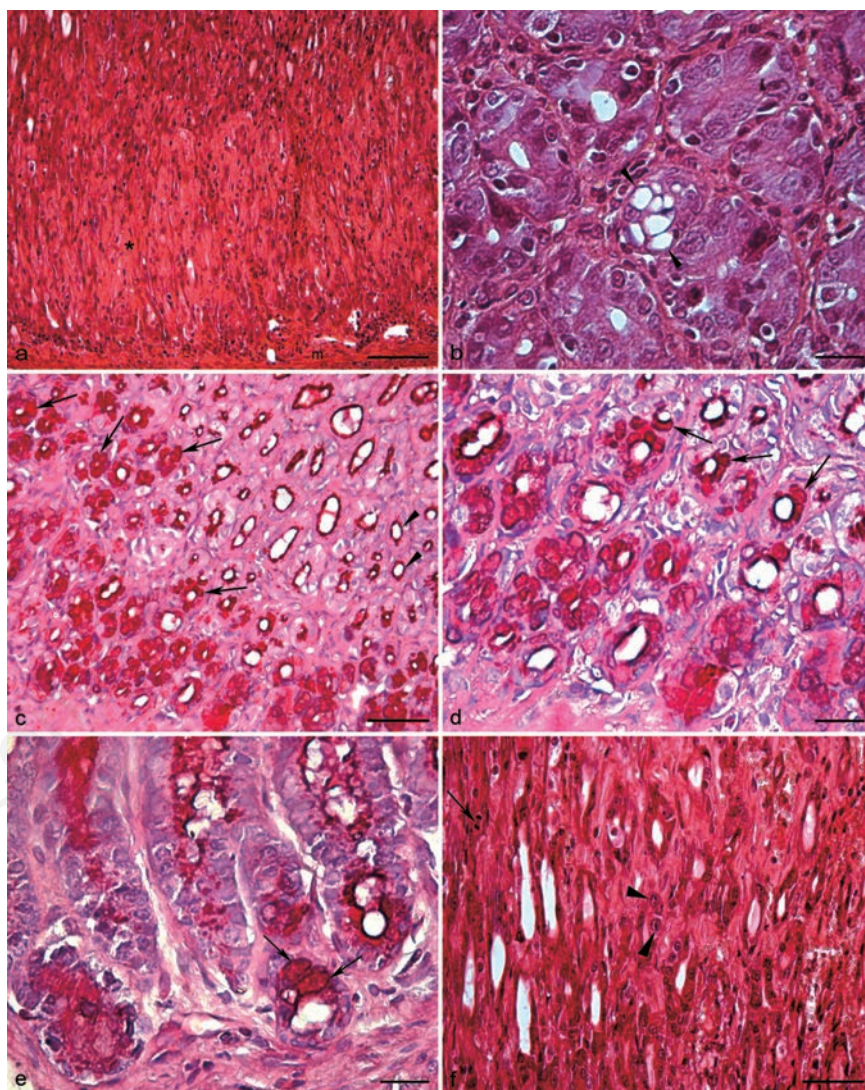


Figure 5. Gastric mucosa of Mongolian gerbils infected with *H. pylori* for six months: *muscularis mucosae* (*m*). a) Moderate atrophy of the gastric oxyntic mucosa with the gastric glands replaced by connective tissue in an animal from the CagA3Ep group (*); H&E; scale bar: 100 μ m. b) Mild intestinal metaplasia in the oxyntic mucosa of an animal from the CagA3Ep group; note the presence of goblet cells in the mucosa (arrowheads); H&E; scale bar: 20 μ m. c) Gastric mucosa of an animal from the CagA3Ep group with usual glandular epithelium (arrowheads) consisting of mucus producing cells and areas of incomplete intestinal metaplasia (arrows) stained by PAS-Alcian Blue; pH 2.5; scale bar: 50 μ m. d) Detail of the previous figure; Goblet cells positive for PAS-Alcian Blue (arrows); scale bar: 20 μ m. e) Gastric mucosa of an animal from CagA3Ep group with tubular glands containing well-formed goblet cells (arrows) stained by PAS-Alcian Blue; scale bar: 20 μ m. f) Presence of mild dysplasia in the gastric oxyntic mucosa with nuclear pleomorphism and evident nucleoli (arrowheads) as well as mitotic figure (arrow) in an animal from the CagA3Ep group; H&E; scale bar: 50 μ m.

the isolate with *cagA* containing three EPIYA-C segments. The follicles were also more abundant in the gastric mucosa of the CagA3Ep animals. Six months after infection, the inflammatory infiltrate was more intense and composed predominantly of mononuclear cells and neutrophils, characterised as active chronic gastritis. The inflammatory infiltrate was more frequent in the antral mucosa and expanded to the oxyntic mucosa. These results are in agreement with other authors, who demonstrated in gerbils infected with *H. pylori* that the intensity of the parasitism and gastritis are initially greater in the antral mucosa, expanding later to the oxyntic mucosa.²⁸ In addition, we observed a significant and progressive increase in the number of inflammatory cells in the groups infected with *H. pylori* (CagA1Ep and CagA3Ep), and this increase was most pronounced in the CagA3Ep group, as demonstrated by the quantitative digital morphometric analysis. A direct relationship between the presence of the CagA protein and more severe forms of the gastric diseases caused by *H. pylori* infection is reported by other authors.^{5,6,7,29} Álvares *et al.* found in patients infected with different *H. pylori* strains that the inflammation, activity, atrophy, and IM were significantly more severe in patients infected with *cagA*-positive samples compared with the negative ones.³⁰ Moreover, *H. pylori* strains with higher numbers of EPIYAs exhibit higher levels of CagA phosphorylation and, therefore, are associated with more severe forms of gastric diseases. In our experiment, in addition to increased inflammation, we also observed significant differences in the inflammatory activity between the CagA1Ep and CagA3Ep groups.

Intestinal metaplasia was also often observed in the animals from the CagA3Ep group 6 months after infection, and in some animals, its development was concomitant with the development of atrophy and dysplasia. This type of lesion is a characteristic finding of chronic atrophic gastritis in the human stomach and is considered the most important risk factor for the development of intestinal carcinoma. The development of intestinal metaplasia has not been observed in any other experimental model of *H. pylori* infection. In the gastric mucosa of gerbils infected with *H. pylori* strains CagA⁺, gastric mucosa lesions are reportedly more severe, including chronic atrophic gastritis, *incomplete-type IM* and/or an increased risk of gastric cancer compared with animals infected with CagA-negative *H. pylori* strains or with a mutant form of CagA.^{29,31} Thus, the gerbil was an ideal model to investigate the histogenesis of inflammation and metaplasia and its relationship with carcinogenesis. The morphometric analysis allowed us to quantify the level of inflamma-

tion, providing information that was impossible to obtain through semi-quantitative analysis. The inflammation induced by *H. pylori* infection is a chronic active gastritis, characterised by lymphocytic and neutrophilic infiltration in the gastric mucosa. From the inflammatory infiltrate, foci of intestinal metaplasia with subsequent atrophy of the mucosa, aggregates, and lymphoid follicles occur concurrently, and the foveolar epithelium is replaced by a regenerative epithelium with reduced mucin secretion.²¹ In the present study, the atrophy

of the gastric mucosa also occurred concurrently with the development of intestinal metaplasia and lymphoid follicles. Using gerbils infected with *H. pylori*, Murakami *et al.* demonstrated a reduction in the intercellular cadherin content with the subsequent loss of the parietal cells and its replacement by mucous cells.³² It is convincingly reported in different articles that some proinflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor alpha (TNF- α), induce apoptosis of parietal cells;³³ the loss of these cells reduces the secre-

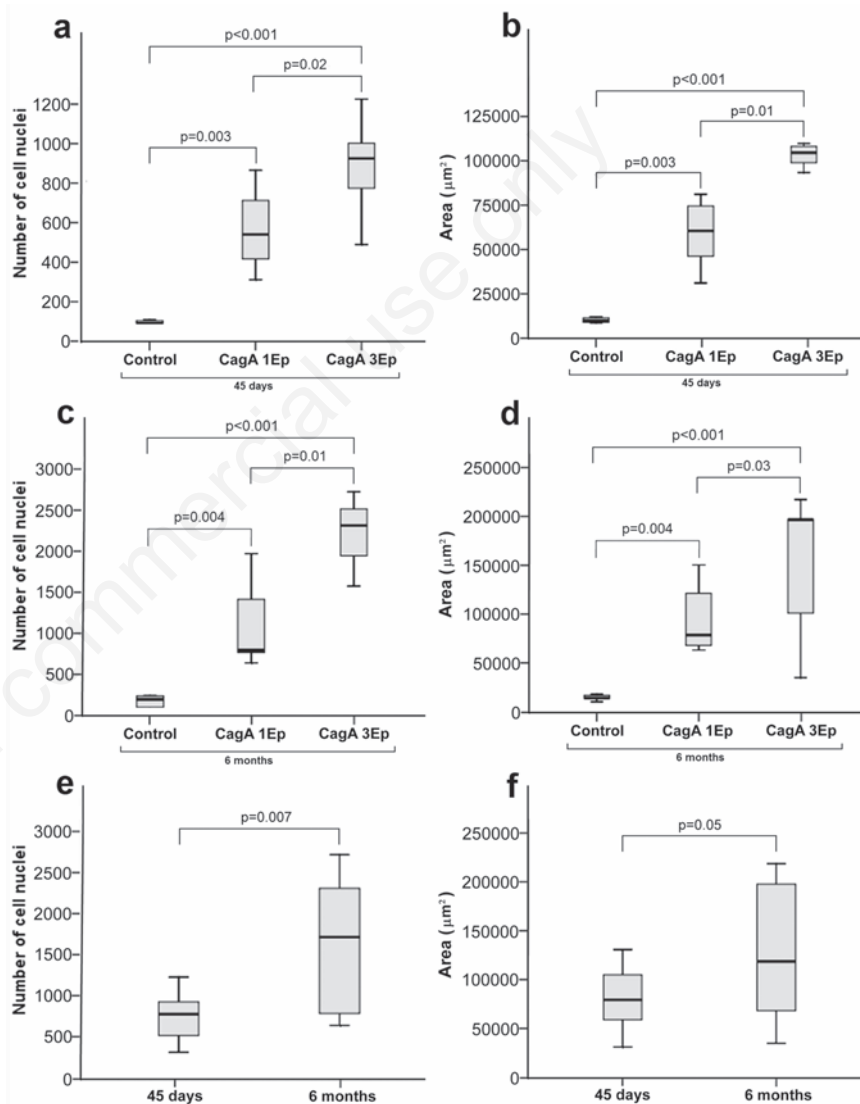


Figure 6. Box plots representing the total number of inflammatory cells and the *lamina propria* area in 15 fields of the gastric mucosa of Mongolian gerbils infected with *H. pylori* strains containing one or three CagA EPIYA-C phosphorylation C sites and uninfected animals as a control group at 45 days (a, b) or six months (c, d) after the inoculation; each group is composed by 8 animals. e, f) Represent the higher number of inflammatory cells and increased *lamina propria* area respectively in infected animals with six months of infection compared with those with 45 days of infection; the upper and lower limits of the boxes represent the 75th and 25th percentiles, respectively; the horizontal bar across the box indicates the median and capped bars indicate the minimum and maximum data values. Data were analyzed by the two tailed Mann-Whitney U Test.

tion of the signal peptide that modulates the growth and differentiation of the gastric progenitor cells, resulting in an increased proliferation of undifferentiated cells. On the other hand, the atrophy induces a hypochlorhydria condition in the gastric mucosa, with consequent stimulation of gastrin-producing cells, inducing hypergastrinemia, which also results in increased proliferation of gastric mucosal cells.³⁴ In fact, some studies reported a higher frequency of malignant gastric lesions in individuals over 50 years of age with chronic atrophic gastritis.³⁵ Thus, for several authors, atrophic gastritis is more important than intestinal metaplasia as a risk factor for the development of gastric cancer.³⁶ Like atrophy, dysplasia occurred 6 months after infection. This lesion was characterised by an increase in the proliferation, loss of cell differentiation, and cellular atypia, mainly karyomegaly. We properly demonstrated the entire sequence of the lesions in the gastric mucosa caused by *H. pylori* in an experimental model that is most similar to human infection. However, to assess the effects of different *H. pylori* strains on the likelihood of developing gastric carcinoma, an evaluation of the infection for periods longer than 6 months is required.

Our results may be explained by the higher SHP-2 activity induced by the isolate with three EPIYA-C phosphorylation sites. It has been demonstrated that phosphorylated CagA protein forms a physical complex with SHP-2 phosphatase that activates MAPK/ERK 1/2 signaling pathway. ERK regulates inflammation by stimulating neutrophil adhesion and superoxide generation, and mediates pro-inflammatory cytokine secretion.³⁷ Furthermore, ERK leads to activation of genes that encode anti-apoptotic proteins, deregulation of the cell growth and differentiation with an increase of the epithelial cell turnover, which enhance the risk of damaged cells acquire pre-cancerous genetic changes. Thus, *H. pylori* strain carrying EPIYA with multiple C repeats leads to more SHP-2 activity and consequently higher degree of gastric inflammation, atrophic gastritis, gastric metaplasia and increased risk of gastric cancer.^{6,38}

Concluding, we reproduced in Mongolian gerbil the pattern of gastric lesions observed in human beings infected with *H. pylori* strain with a greater number of EPIYA-C segments in the CagA protein. The animals developed gastric histopathological lesions that followed the steps of the carcinogenesis model proposed by Pelayo-Correa for intestinal gastric carcinoma, including chronic gastritis, atrophy, intestinal metaplasia and dysplasia.³¹

References

- Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharm Therap* 1995;9:33-9.
- Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ* 1998;316:1507-10.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. *Am J Surg Pathol* 1996;10:1161-181.
- Backert S, Schwarz T, Miehke S, Kirsch C, Sommer C, Kwok T, et al. Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* 2004;72:1043-56.
- Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology* 2008;8:1573-81.
- Batista SA, Rocha AG, Rocha AMC, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, et al. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiology* 2011;11:1-7.
- Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 2004;4:688-94.
- Chuang CH, Yang HB, Sheu SM, Hung KH, Wu JJ, Cheng HC, et al. *Helicobacter pylori* with stronger intensity of CagA phosphorylation lead to an increased risk of gastric intestinal metaplasia and cancer. *BMC Microbiology* 2011;11:1-7.
- Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator Medium for Isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1987;12:2378-79.
- Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998;8:2258-63.
- Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:12619-24.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1992;19:5137-42.
- Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* 1999;32:459-470.
- Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Ahmad N, Habeeb A, Khan AA, et al. Comparing genomes of *Helicobacter pylori* strains from the high-altitude desert of Ladakh, India. *J Clin Microbiol* 2005;43:1538-45.
- Oliveira AG, Santos A, Guerra JB, Rocha GA, Rocha AMC, Oliveira CA, et al. baba2- and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41:3964-66.
- Moura SB, Costa RFA, Anacleto C, Rocha GA, Rocha AMC, Queiroz DMM. Single nucleotide polymorphisms of *Helicobacter pylori* dupA that lead to premature stop codons. *Helicobacter* 2011;17:176-80.
- Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Ohtani M, Ito Y, Muramatsu A, et al. Distinct Diversity of the cag Pathogenicity Island among *Helicobacter pylori* Strains in Japan. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2508-17.
- Ashour AAR, Collares GB, Mendes EN, Gusmão VR, Queiroz DMM, Magalhães PP, et al. iceA genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001;39:1746-50.
- Liang XH, Zhang YN, Wang YJ, Kang XX. Analysis of translocation of the CagA protein and induction of a scattering phenotype in AGS cells infected with *Helicobacter pylori*. *Biomed Environ Sci* 2009;22:394-400.
- Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods* 2001;45:89-94.
- Clayton CL, Kleantous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain-reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:192-00.
- Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Cover T, Atherton JC, et al. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J Clin Microbiol* 1995;33:28-32.
- Rocha GA, Queiroz DMM, Mendes EN, Lage AP, Barbosa AJA. Simple carbolfuchsin staining for showing *Campylobacter pylori* and other spiral bacteria in gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1989; 42:1004-05.
- Wirth HP, Beins MH, Yang M, Tham KT, Blaser MJ. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 1998; 66:4856-66.
- Pacheco CM, Queiroz-Junior CM, Maltos KL, Caliani MV, Pacheco DF, Duarte ID, et al. Crucial role of peripheral kappa-opioid

- receptors in a model of periodontal disease in rats. *J Periodontol Res* 2008; 6:730–36.
26. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397:176–80.
 27. Kalali B, Mejías-Luque R, Javaheri A, Gerhard M. H. *pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Med Inflamm* 2014;ID 426309, 9 pages.
 28. Aras RA, Lee Y, Kim SK, Israel D, Peek RM, Blaser MJ. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affects human host cell phenotype. *J Infect Dis* 2003;188:486–96.
 29. Ohnita K, Isomoto H, Honda S, Wada A, Wen CY, Nishi Y, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric inflammation in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2005;10:1549–53.
 30. Álvares MMD, Marino M, Oliveira CA, Mendes CC, Costa ACF, Guerra J, et al. Características da gastrite crônica associada a *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o status *cagA*. *J Bras Patol Med Lab* 2006;1:51–9.
 31. Wiedemann T, Loell E, Stoeckelhuber M, Stolte M, Haas R, Rieder G. *Helicobacter Pylori cag*-Pathogenicity Island-Dependent Early Immunological Response Triggers Later Precancerous Gastric Changes in Mongolian Gerbils. *PLoS ONE* 2009;4:1–13.
 32. Murakami M, Fukuzawa M, Yamamoto M, Hamaya K, Tamura Y, Sugiyama A, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric parietal cells and E-cadherin in Mongolian gerbils. *J Pharmacol Sci* 2013;121: 305–11.
 33. Neu B, Puschmann AJ, Mayerhofer A, Hutzler P, Grossmann J. TNF-alpha induces apoptosis of parietal cells. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1755–60.
 34. Fox JG, Wang TC, Rogers AB, Poutahidis T, Ge Z. Host and microbial constituents influence *Helicobacter pylori*-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia. *Gastroenterol* 2003;124:1879–90.
 35. Vannella L, Lahner E, Osborn J, Bordi C, Miglione M, Delle FG, et al. Risk factors for progression to gastric neoplastic lesions in patients with atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:1042–50.
 36. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 60–9.
 37. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002;295:683–6.
 38. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis* 2012; 13:2–9.

TITLE PAGE

Title: CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites produces increase of G cell and decrease of D cell in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*)

Moacir Ferreira Júnior^a, Sérgio de Assis Batista^b, Rafael Calvão Barbuto^c,
Adriana Dias Gomes^b, Dulciene Maria Magalhães Queiroz^b, Ivana Duval Araújo^c,
Marcelo Vidigal Caliar^{a,*}

Affiliations

^a Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratory of Research in Bacteriology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Surgery Department, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author at: Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP 31 270-010. E-mail: caliari@icb.ufmg.br; Tel: 55-31-3409-2892.

Conflict of interests: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Financial disclosure: The authors have no funding to disclose.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Dean of Research of the Federal University of Minas Gerais (*Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais*-

PRPq/UFMG), the Minas Gerais State Research Foundation (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* – FAPEMIG, and the National Council for Research and Development (*Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento* - CNPq).

ABSTRACT

Purpose: Human infection by *Helicobacter pylori* is associated with an increase in the number of gastrin-producing G cells and a concomitant decrease of somatostatin-producing D cells. However, to our knowledge, changes in G and D cell numbers in response to infection with *H. pylori* CagA-positive strains containing different number of EPIYA-C phosphorylation sites have not been analyzed to date. Therefore, the aim of this study was to perform a quantitative analysis of the number of G and D cells in Mongolian gerbils challenged with *H. pylori* strains with different numbers of EPIYA-C motifs.

Materials and methods: Mongolian gerbils were inoculated with isogenic *H. pylori* strains containing one to three phosphorylation sites. Mucosal fragments were evaluated by morphometry and immunohistochemistry using primary polyclonal rabbit anti-gastrin and anti-somatostatin antibodies. Positive cells were counted using an image analyzer.

Results: Forty-five days after infection, there was a decrease in the number of D cells and an increase in the G/D cell ratio in the group with three EPIYA-C. Six months post-infection, there was a progressive and significant increase in the number of G cells and in the G/D cell ratio, with a concomitant decrease in the number of D cells, especially in the three EPIYA-C group.

Conclusions: CagA-positive *H. pylori* strains containing a large number of EPIYA-C phosphorylation sites induce a decrease in D cell number and an increase in G cell number and G/D ratio, that were correlated with the number of inflammatory cells and the area of the lamina propria.

[Keywords] *Helicobacter pylori*, G cells, D cells, CagA , EPIYA C motif

1.Introduction

Infection by the gram-negative spiral bacterium, *Helicobacter pylori*, causes an increase in the plasmatic and gastric concentration of gastrin [1,2]. The mechanism by which *H. pylori* enhances gastrin release remains uncertain, but studies on the regulation of gastrin secretion have shown that gastrin (G)-cells are under constant restraint by somatostatin (D)-cells in the antral mucosa. The presence of high gastric acid secretion increases somatostatin release, resulting in reduced gastrin secretion, whereas the presence of low gastric acid decreases somatostatin release, resulting in increased gastrin secretion. In addition to having an inhibitory effect on gastrin release, somatostatin has been suggested also to inhibit antral gastrin cells at the gene transcriptional and posttranscriptional levels [3].

The changes in the gastrin concentration associated with the infection have been correlated with the degree of inflammation and activity of the gastritis [4]. In addition to host factors, virulence bacterial factors participate in the inflammatory response to the infection. Among them, the Cag pathogenicity island (cagPAI), a DNA locus of approximately 40 Kb in length, comprises 27–31 genes, which encodes a type IV secretion system (T4SS), responsible for the translocation of the oncogenic CagA protein into gastric epithelial cells. This is followed by CagA tyrosine phosphorylation, resulting in the activation of pro-inflammatory and antiapoptotic genes and increasing the risk of developing pre-cancerous lesions [5,6]. Phosphorylation of CagA occurs on tyrosine residues in a repeating sequence of five amino acids located in its carboxy-terminal portion, called EPIYA (Glu, Pro, Ile, Tyr, and Ala) composed by four discrete segments named A, B, C and D based on the presence of different amino acids. *H. pylori* strains isolated in Western countries consist of EPIYA-A, EPIYA-B and a variable number of EPIYA-C, whereas strains from East Asian countries exhibit EPIYA-D site

instead of EPIYA-C. Human infection by CagA-positive *H. pylori* strains with a large number of EPIYA-C phosphorylation sites is associated with more severe chronic gastritis and an increased risk of developing intestinal metaplasia and gastric cancer [7].

To our knowledge, a quantitative analysis of the changes in G and D cell numbers upon infection with different strains of CagA-positive *H. pylori* containing one or more EPIYA-C phosphorylation sites has not been performed to date. Therefore, the aim of this study was to determine the number of the G and D cells in the gastric mucosa of Mongolian gerbils infected with *H. pylori* strains containing one or three EPIYA-C sites, an experimental model that resembles *H. pylori* infection in human beings.

2. Material and methods

2.1 Animals

The experiment was conducted in accordance with the guidelines outlined in the Ethical Principles in Animal Experimentation guide and was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais (CEUA/UFMG). Forty-eight three-month-old female Mongolian gerbils, with an average weight of 80 g, were housed under natural ventilation with a mechanical exhauster, and subjected to natural day and night cycles, with free access to filtered water and standard rat feed (Labina®, Purina, Brazil).

2.2 Experimental design

The animals were divided into three experimental groups: 16 controls, uninfected animals; 16 animals infected with a CagA-positive strain containing one EPIYA-C fragment and 16 animals infected with a CagA-positive strain containing three

EPIYA-C fragments. In each group, eight animals were analyzed 45 days post-infection, and eight animals were analyzed six months post-infection.

2.3 Inoculum

CagA-positive *H. pylori* strains containing one or three EPIYA-C phosphorylation sites were used to inoculate the animals. The strains were isolated from the antral mucosa of the stomach obtained at surgery from a single 71 years-old patient with gastric carcinoma medium BHM [8]. The isolates were tested for EPIYA-C pattern by PCR according to Yamaoka *et al.* [9] and the results were confirmed by sequencing [6]. The presence of other genes of the *cagPAI* involved in the SST4 (*cagL*, *cagI*, *cagX*, *cagY* and *cagT*) and in the induction of IL-8 (*cagE*) was also confirmed in the isolates.

We confirmed that the strains were isogenic, differing only in the number of EPIYA-C segments, by identical Random-amplified DNA (RAPD)-PCR profiles, the same *vacA* more virulent s1i1d1m1 genotype and identical *oipA* sequences with 9 CT and *vacA* i/d sequences. Furthermore, the sequences of the housekeeping genes *efp*, *yphC*, *atpA*, *ureI* and *mutY* [10] (total of 3439 nucleotides) were 100% identical, which indicates that isolates are clonal [11]. Two days culture of the strains LPB 1034-12 and LPB 1034-6, containing one or three EPIYA-C phosphorylation sites were used to inoculate the animals.

2.4 Inoculation and necropsy

Prior to *H. pylori* inoculation, the animals were fasted for eight hours, and then, sedated slightly with isoflurane. Three samples of each bacterial isolates in suspension in sterile Brucella broth (difco) (0.8 mL) containing 10^9 colony forming units (CFU)/mL were administered by gastric gavage to each animal of the study groups at 48 hour intervals. The control group received identical volumes of sterile Brucella broth alone. Four hours after each inoculation, the animals received standard rat chow (Labina®),

Purina, Brazil) and water *ad libitum*. After 45 days and 6 months of infection, the animals were sacrificed by means of anesthetic overdose, the abdomen was opened, the stomach removed, and opened, along the greater curvature and the mucosa of the gastric body and antrum were exposed. Then, the stomach was distended and washed with saline solution.

2.5 Histopathology

Fragments of the lesser curvature of the antrum (size, approximately 2.0 × 0.5 cm) were obtained for histological analysis. The fragments were fixed in 10% buffered formalin for 48 h, dehydrated, diaphanized, infiltrated, and embedded in paraffin. Sections (4-µm thick) were obtained for immunohistochemical and morphometric analysis.

2.6 Immunohistochemical and morphometric analysis

The sections for immunohistochemical reactions were processed according to the manufacturer's guidelines. Briefly, the sections were washed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2). Antigens were recovered from the D cells using DAKO Retrieval solution (Dako, USA) at 100 °C for 20 min. The endogenous peroxidase activity was suppressed by incubating the sections in a solution containing 3.5% H₂O₂ (70:30 v/v) in 200 mL PBS for 20 min, and nonspecific binding sites were blocked by the incubating sections with goat serum (dilution 1:40) for 40 min. Subsequently, the sections were incubated for 16 to 18 h at 4 °C with the following rabbit polyclonal antibodies: anti-gastrin NCL-GASP (dilution, 1:150; Novacasta Laboratories, Newcastle, UK) or anti-somatostatin (dilution, 1:500; Abcam, Cambridge, USA). The slides were then washed in PBS and incubated in biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin (Ig)G (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA) and peroxidase-conjugated streptavidin (dilution, 1:50; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA), for 1 h at room temperature. The

stain was detected using a solution containing 0.05% diaminobenzidine in 0.2% H₂O₂ (60:40 v/v) for 3 min. As a negative control, the primary antibody was replaced with PBS in a few antral sections from the control gerbils. Antral sections of control gerbils were used as positive controls. The sections were counterstained with Harris hematoxylin (diluted to 60% with distilled water) and mounted in Entelan® medium. All G- and D-positive cells were counted with the use of the KS300 software coupled to a Carl Zeiss image analyzer (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). A total area of 4.77 × 10⁵ μm² of the antral gastric mucosa was scanned using a micro camera Q-Color3 (Olympus; Tokyo, Japan) for each animal.

2.7 Statistical analysis

The data were compared among the different groups and periods of infection by the two-tailed Mann-Whitney U test. Pearson correlation test was used to compare the number of inflammatory cells and G and D cells. P values ≤ 0.05 were considered significant.

3. Results

In the infected groups, the presence of *H. pylori* in the gastric mucosa was identified in 27 animals by simultaneously positive results in RUT, *ureaA* and *cagA* PCR, and in three animals by positive *ureaA* and *cagA* PCR [11]. There was not a positive test in the controls. A dark brown cytoplasmic staining identified positive immunoreactivity for G and D cells. Most G and D cells were located predominantly in the basal third and in the middle of the gastric glands (Fig. 1a-h). Omission of the primary antibody did not result in immunohistochemical marking (Data not shown).

The results of the immunohistochemical analysis for G and D cell numbers and G/D cell ratio are presented in figure 2.

After 45 days of infection, the number of G cell in the gastric antrum was 29.0 ± 3.0 in the control group, 32.0 ± 2.8 in the one EPIYA-C group, and 29.9 ± 4.4 in the three EPIYA-C group, without differences among the three groups. In the same period of infection, the number of D cells was 19.8 ± 2.1 in the control group, 17.3 ± 4.4 in the one EPIYA-C group, and 15.4 ± 4.3 in the three EPIYA-C group, being significantly lower in the three EPIYA-C group compared with the control group ($p = 0.02$). The G/D cell ratio was 1.6 ± 0.1 in the control group, 1.8 ± 0.4 in the one EPIYA-C group and 2.0 ± 0.5 in the three EPIYA-C group, with a significantly higher G/D cell ratio in the three EPIYA-C group than in the control group ($p = 0.04$). No other difference among the groups was observed (Fig. 2a,b,e).

After six months of infection, the number of G cell was significantly higher in the three EPIYA-C group compared with the control group ($p < 0.001$) and with the one EPIYA-C group ($p = 0.001$). A tendency of difference was observed between one EPIYA-C group and controls ($p = 0.08$) (Fig. 3). The average count was 29.0 ± 4.7 in the control group, 32.8 ± 4.5 in the one EPIYA-C group, and 54.0 ± 11.7 in the three EPIYA-C group. A significant lower D cell number in the three EPIYA-C group than in the control group was also observed. The average count was 18.7 ± 2.5 in the control group, 17.6 ± 3.0 in the one EPIYA-C group, and 15.3 ± 3.9 in the three EPIYA-C group. As expected, the increase in G cell count concomitant with the decrease in D cell count led to an increased G/D cell ratio in the animals infected with strain containing one EPIYA-C (1.9 ± 0.3 , $p = 0.02$) and three EPIYA C (3.8 ± 0.8 , $p < 0.001$) compared with the control group (1.6 ± 0.3). A significant difference was also observed between the groups with one and three EPIYA-C segments ($p = 0.001$) (Fig. 2c,d,f).

Because in a previous study we observed a significantly higher number of inflammatory cells and larger area of the antral lamina propria in Mongolian gerbils infected with *H. pylori* strains containing one or three EPIYA-C segments compared with the control group [11], we correlated these parameters with the number of G and D

cells. A positive correlation was observed between the number of G cells and the number of cell nuclei ($r=7$, $p<0.001$) and the lamina propria area ($r=6$, $p=0.001$) in animals infected with *H. pylori* strain containing three EPIYA-C segments (Fig. 3 a,b).

4. Discussion

Although several authors have demonstrated changes in the number of G and D cells in response to *H. pylori* infection in human beings [4] and animals [12], this is the first study to analyze differences in G and D cell populations according to the number of EPIYA C segments of the CagA protein of *H. pylori*. For that, we evaluated infected and non-infected Mongolian gerbils, the animal model that is known to represent *H. pylori* infections in human beings most closely. Here we show for the first time that infection with strains containing higher number of EPIYA-C segments leads to marked changes in the number of antral D and G cells. A reduction in the population of D cells with a concomitant increase in the proportion of G/D cells was observed early in the three EPIYA-C group.

The differences between infected and non-infected animals become much higher after six months of infection, with a progressive and significant increase in the number of G cells and in the G/D cell ratio, notably in the three EPIYA-C group. Similar alterations have been demonstrated by several authors in previous studies evaluating *H. pylori* infected patients, changes that disappear after the eradication of *H. pylori* as demonstrated in both infected adults [3] and children [1]. The involved mechanisms are not completely elucidated; however, it has been suggested that the stomach responds to the presence of inflammation by reducing the levels of somatostatin with consequent increased G cell population and gastrin secretion. Furthermore, it is assumed that infection with CagA-positive *H. pylori* strains with a large number of EPIYA-C phosphorylation sites is associated with more severe chronic gastritis and an increased risk of developing gastric intestinal metaplasia and atrophy [6-7]. Recently, our group

demonstrated in Mongolian gerbil infected with strains containing three EPIYA-C sites a more severe gastric inflammation than that observed in the animals infected with strains containing only one EPIYA-C site [11].

In other study (Wiedemann et al, 2009), Mongolian gerbil infected with *H. pylori* strains that are able to translocate CagA into gastric cells, but not the animals challenged with an isogenic mutant strain unable to translocate cagA, displayed a severe active and chronic gastritis, with a significant increase of pro-inflammatory cytokines (IL1 β , IL-6, IFN γ and TNF α), intestinal metaplasia and atrophy of parietal cells. Lately the animals developed hypochlorhydria and hypergastrinemia. According to the authors, the pro-inflammatory immune response dependent of cag-PAI, triggers late histopathological alterations with consequent disturbance in the gastric physiology that predisposes to carcinogenesis [13].

In agreement with the results of Wiedemann et al, 2009 [13], in this study, the physiological alterations in the number of D and G cells were more pronounced later in the infection. Here we also demonstrated that the alterations were more marked in animals infected with the strains with higher number of EPIYA-C sites pointing to a participation of the phosphorylation EPIYA-C sites in the induction of more severe inflammation and alteration of the gastric physiology.

After the cagA is translocated into the gastric cells, it undergoes tyrosine phosphorylation at EPIYA-C motif, interacts with SH₂ domain containing SHP₂ abnormally triggering the SHP₂/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ ERK 1/2 pathway that regulates direct and indirect transcription of cytokines contributing to the severity of gastric inflammation and further atrophy [16,17]. Of note, independently of its pro-inflammatory property, IL1 β is a potent inhibitor of acid secretion [14] and TNF α induces apoptosis of parietal cells contributing to the development of atrophy and hypochlorhydria that stimulates gastrin-producing cells [17]. Gastrin due to its trophic effect on the gastric mucosa, also participates in the gastric carcinogenesis [18].

In conclusion, our results showed that CagA-positive strains of *H. pylori*, which contain a large number of phosphorylation sites, induce a greater increase in the number of G cells and the ratio of G/D cells, and a marked decrease in D cell population.

References

- [1] Queiroz DMM, Moura SB, Mendes EN, Rocha GA, Barbosa AJ, De Carvalho AS. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on G-cell and D-cell density in children. *Lancet* 1994;343:1191-1193.
- [2] Tham TC, Chen L, Dennison N, Johnston CF, Collins JS, Ardill JE, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on antral somatostatin cell density in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:289-291.
- [3] Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA, Moura SB, Resende LMH, Barbosa AJA, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on antral gastrin- and somatostatin-immunoreactive cell density and gastrin and somatostatin concentrations. *Scand J of Gastroenterol* 1993;28:858-864.
- [4] Liu Y, Vosmaer GD, Tytgat GN, Xiao SD, Ten Kate FJ. Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: *Helicobacter pylori* associated and non-associated gastritis. *J Clin Pathol* 2005;58:927-931.
- [5] Backert S, Selbach M: Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* 2008;8:1573-1581.
- [6] Batista SA, Rocha AG, Rocha AMC, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, et al. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol* 2011; 61:1-7.
- [7] Chuang Chiao-Hsiung, Yang Hsiao-Bai, Sheu Shew-Meei, Hung KH, Wu JJ, Cheng HC, et al. *Helicobacter pylori* with stronger intensity of CagA

phosphorylation lead to an increased risk of gastric intestinal metaplasia and cancer. BMC Microbiol 2011;121:1-7.

- [8] Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator Medium for Isolation of *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol 1987;12:2378-79.
- [9] Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. J Clin Microbiol 1998;8:2258-63.
- [10] Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Mol Microbiol 1999;32:459-470.
- [11] Júnior MF, Batista SA, Vidigal PVT, Cordeiro AAC, Oliveira FMS, Prata LO, et al. Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Eur J Histochem 2015;59:137-146. (in press – DOI:10.408/ejh.2015.2489).
- [12] Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Samuelson LC, Merchant JL. Hypergastrinemia in response to gastric inflammation suppresses somatostatin. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002;282:175-183.
- [13] Wiedemann T, Loell E, Stoeckelhuber M, Stolte M, Haas R, Rieder G. *Helicobacter Pylori* *cag*-Pathogenicity Island-Dependent Early Immunological Response Triggers Later Precancerous Gastric Changes in Mongolian Gerbils. PLoS ONE 2009;4:1-13.
- [14] Lee IO, Kim JH, Choi YJ, Pillinger MH, Kim SY, Blaser MJ, et al. *Helicobacter pylori* CagA Phosphorylation Status Determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT Signal Transduction Pathways in Gastric Epithelial Cells J Biol Chem 2010;285:16042-16050.

- [15] Higashi H, Nakaya A, Tsutsumi R, Yokoyama K, Fujii Y, Ishikawa S, et al. *Helicobacter pylori* CagA Induces Ras-independent Morphogenetic Response through SHP-2 Recruitment and Activation. *J Biol Chem* 2004;279:17205-17216.
- [16] El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 6776:398-402.
- [17] Neu B, Puschmann AJ, Mayerhofer A, Hutzler P, Grossmann J, Lippl F, et al. TNF-alpha induces apoptosis of parietal cells. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1755-1760.
- [18] Konturek PC, Konturek SJ, Bielanski W, Karczewska E, Pierzchalski P, Duda A, et al. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected humans. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:857-873.

Legends

Figure 1. Immunohistochemical reaction of G and D cells in the antral mucosa of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. G cells (arrowheads), D cells (arrows), muscularis mucosae (*), follicle lymphoid (white arrow). (a) Control group: G⁺ cells; (b) Control group: D⁺ cells; (c) one EPIYA-C 6 months group: G⁺ cells; (d) one EPIYA-C 6 months group: D⁺ cells; (e) three EPIYA-C 45 days group: G⁺ cells; (f) three EPIYA-C 45 days group: D⁺ cells; (g) three EPIYA-C 6 months group: G⁺ cells; (h) three EPIYA-C 6 months group: D⁺ cells. Counterstaining with Harris Hematoxylin. Bar 50 μm.

Figure 2. G and D cell numbers in the stomach antrum of the gerbils after 45 days or six months of infection with CagA-positive strains of *H. pylori* with one or three EPIYA loci.

Figure 3. Correlation between D cell numbers, number of cell nuclei and area of lamina propria in the stomach antrum of the gerbils after six months of infection with CagA-positive strain of *H. pylori* with three EPIYA loci.

All authors have read the manuscript, approved its submission and declare that they have no competing interests and financial disclosures. The manuscript has not been published and is not being considered for publication elsewhere as a whole or in part in any language.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

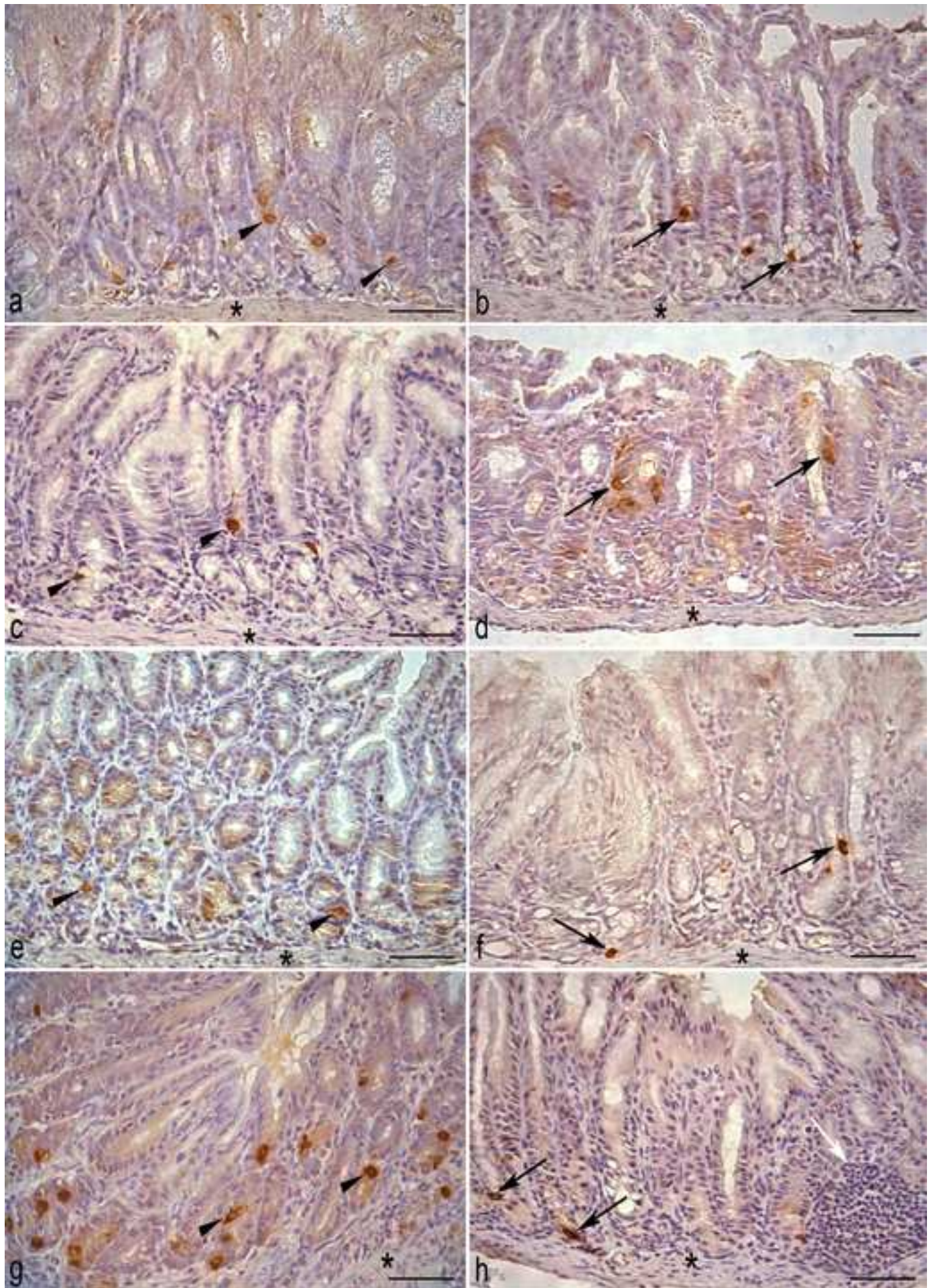


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

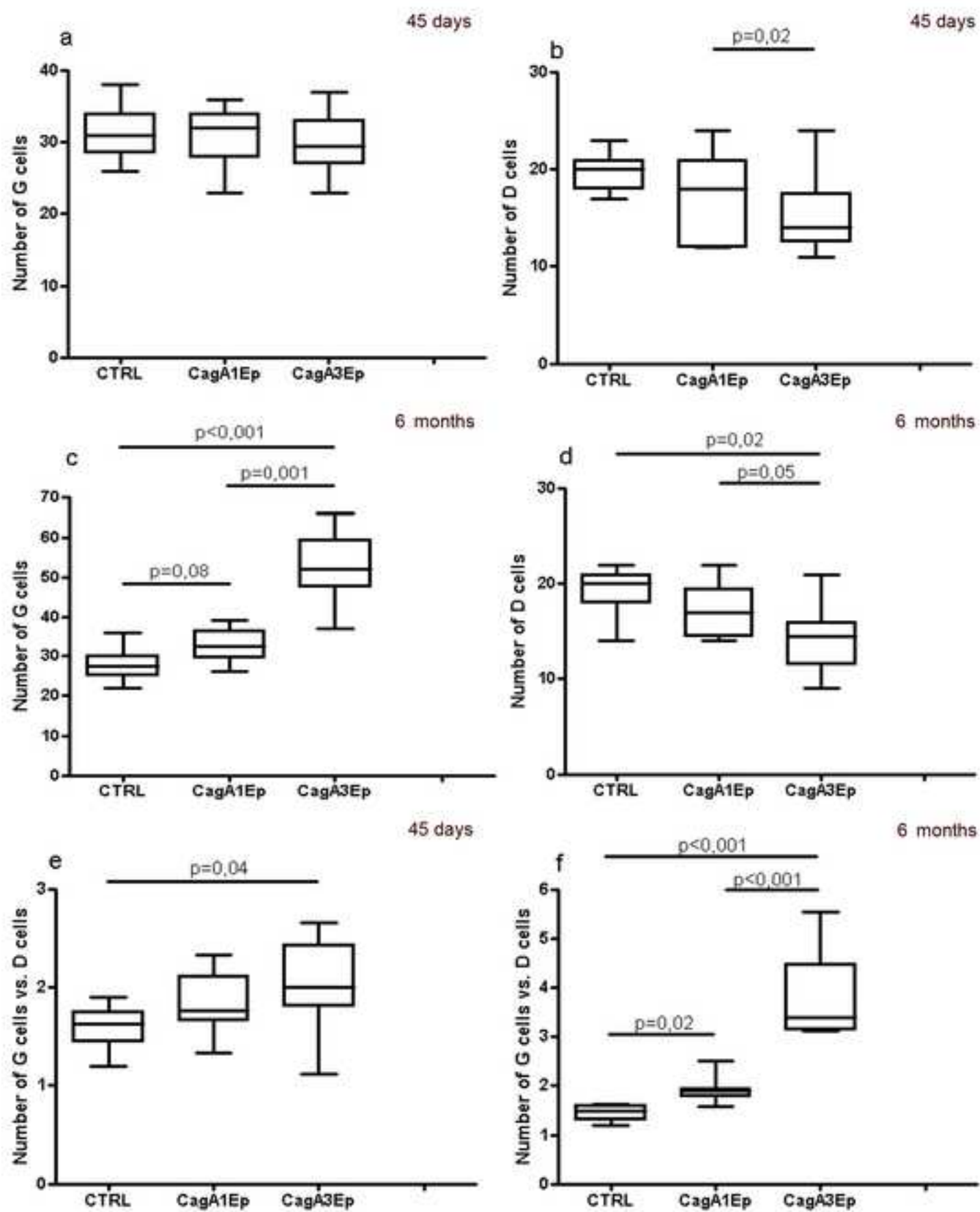


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

