



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I NÃO
CLÁSSICAS HLA-G E HLA-E EM ESPÉCIMES GÁSTRICAS DE
PACIENTES ACOMETIDOS COM A BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI***

Mestranda: Daliana Maria Berenice de Oliveira Souza

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas

Natal-RN
2012

DALIANA MARIA BERENICE DE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I NÃO
CLÁSSICAS HLA-G E HLA-E EM ESPÉCIMES GÁSTRICAS DE
PACIENTES ACOMETIDOS COM A BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito à obtenção do grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração de Bioanálises.

Natal-RN
2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE

S729a

Souza, Daliana Maria Berenice de Oliveira.

Avaliação da expressão das moléculas HLA de classe I não clássicas HLA-G e HLA-E em espécimes gástricas de pacientes acometidos com a bactéria helicobacter pylori / Daliana Maria Berenice de Oliveira Souza. – Natal, 2012.

100f. : il.

Orientadora: Prof^a Dr^a Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Antígenos HLA-G – Dissertação. 2. Antígenos HLA-E – Dissertação. 3. Helicobacter pylori – Dissertação. I. Freitas, Janaina Cristiana de Oliveira Crispim. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 616-097.1(043.3)

DALIANA MARIA BERENICE DE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I NÃO
CLÁSSICAS HLA-G E HLA-E EM ESPÉCIMES GÁSTRICAS DE
PACIENTES ACOMETIDOS COM A BACTÉRIA *HELICOBACTER PYLORI***

Dissertação para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Edson Garcia Soares
Externo à instituição

Prof. Dr. Francisco Pignataro Lima
Externo ao programa

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Dorival e Berenice pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela estrutura e oportunidade:

À minha orientadora, Profa. Dra. Janaina Cristiana de Oliveira Crispim Freitas, por ter aceitado me orientar e desenvolver comigo este trabalho, por seu exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa:

Ao Prof. Dr. Carlos André Nunes Jatobá pela orientação e auxílio na leitura das lâminas de imunohistoquímica:

Às Profas. Msc. Keyla Borges Ferreira Rocha e Msc. Cláudia Nunes Oliveira pela revisão dos laudos da patologia e auxílio na leitura das lâminas de Giemsa e HE:

Ao pessoal do Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela atenção e disponibilidade com o qual sempre me atenderam:

Às "meninas do laboratório" e que serão minhas eternas amigas: Lidiane, Fernanda, Wenna, Sayama, com vocês vivi o sentido da palavra GRUPO:

Aos professores e funcionários que deram sua contribuição para a minha formação e confecção deste trabalho:

Aos amigos de todas as épocas, impossível de listar todos, mas inesquecíveis e vitais:

Muito Obrigada!

De tudo, ficaram três coisas...

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

Resumo

A expressão do antígeno leucocitário humano G (HLA-G) e do antígeno leucocitário humano E (HLA-E) em processos fisiológicos e patológicos permanece pouco conhecida. Acredita-se que essas moléculas desempenham papel fundamental no estabelecimento e manutenção da tolerância imunológica, inibindo as funções das células imunocompetentes. Na literatura internacional, até o momento, não foi encontrado nenhum estudo publicado correlacionando *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) com expressão de HLA-G e HLA-E. O presente trabalho tem como objetivo correlacionar a expressão dessas proteínas em biópsias gástricas de pacientes acometidos com *H. pylori*. Sessenta e quatro espécimes gástricas de pacientes acometidos com *H. pylori* foram avaliados para expressão de HLA-G e HLA-E. As amostras foram estratificadas de acordo com a presença de carcinoma ou de úlcera péptica. Como controle foram analisados espécimes gástricas de pacientes vivos sem *H. pylori*. Para detectar a expressão dessas moléculas utilizou-se a técnica de imunohistoquímica com os anticorpos monoclonais anti-HLA-G e anti-HLA-E. Outros critérios como análise do infiltrado inflamatório (hematoxilina-eosina) e identificação do *H. pylori* (Giemsa) foram analisados. As moléculas de HLA-G e HLA-E foram detectadas em grande parte das amostras contendo úlcera e carcinoma gástrico. No grupo controle não foi detectada a presença de HLA-G e HLA-E, indicando que a bactéria *H. pylori* modula a expressão dessas moléculas no grupo dos pacientes que apresentaram úlcera ou carcinoma gástrico. A presença da bactéria *H. pylori* parece modular a expressão do HLA-G e do HLA-E, favorecendo assim a evolução da infecção, o que confere diferentes graus de lesão do epitélio gástrico desses pacientes.

Palavras-chave: Antígenos HLA-G, Antígenos HLA-E, *Helicobacter pylori*.

Abstract

The expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) and human leukocyte antigen E (HLA-E) in physiological and pathological processes remains unknown, it is believed that these molecules play a fundamental role in the establishment and maintenance of immune tolerance by inhibiting the functions of immunocompetent cells. In literature we found no published study involving the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) with expression of HLA-G and HLA-E. The objective this study is investigated the expression of this protein in gastric biopsies of patients with the bacterium *H. pylori*. Sixty-four biopsies of the patients with diagnosis of infection by *H. pylori* were evaluated to expression of HLA-G and HLA-E. The samples were stratified according to the presence of carcinoma or peptic ulcers. Patients without *H. pylori* were used to control. To investigate the expression of this protein were used immunohistochemistry technique with monoclonal antibody anti-HLA-G and anti-HLA-E. Other criteria such as analysis of the inflammatory infiltrate (hematoxylin-eosin) and identification of *H. pylori* (Giemsa) were analyzed. We detected HLA-G and HLA-E molecules in the most samples containing ulcer and gastric carcinoma. In negative control group was not detected the presence of HLA-G and HLA-E. The presence of *H. pylori* seems modulate the expression of HLA-G and HLA-E, favoring the evolution of infection, giving different degrees of gastric lesion in epithelium of these patients.

Keywords: Antigen HLA-G, Antigen HLA-E, *Helicobacter pylori*.

Lista de figuras

Figura 1 - Infecção persistente pela bactéria <i>H. pylori</i> . Interação entre <i>H. pylori</i> e a resposta imune do hospedeiro leva à gastrite crônica e colonização persistente.....	29
Figura 2 - Representação esquemática da supressão imune local de emergência: um possível impacto de trogocitose de HLA-G sobre as respostas imunes	36
Figura 3 - Critérios histológicos de pacientes acometidos com úlcera e carcinoma gástrico.....	51
Figura 4 - Expressão de HLA-G em biópsias gástricas de pacientes acometidos com a bactéria <i>H. pylori</i> utilizando a técnica de imunohistoquímica.....	55
Figura 5 - Expressão de HLA-E em biópsias gástricas de pacientes acometidos com a bactéria <i>H. pylori</i> utilizando a técnica de imunohistoquímica.....	59

Lista de tabelas

Tabela 1 – Avaliação da expressão de HLA-G em pacientes com úlcera péptica associada a parâmetros histopatológicos.....	52
Tabela 2 – Avaliação da expressão de HLA-G em pacientes com carcinoma gástrico associado a parâmetros histopatológicos.....	52
Tabela 3 – Avaliação da expressão de HLA-E em pacientes com úlcera péptica associada a parâmetros histopatológicos.....	53
Tabela 4 – Avaliação da expressão de HLA-E em pacientes com carcinoma gástrico associado a parâmetros histopatológicos.....	53
Tabela 5 - Expressão de HLA-G na mucosa gástrica.....	56
Tabela 6 – Intensidade da expressão de HLA-G na mucosa gástrica.....	57
Tabela 7 – Intensidade da expressão de HLA-G na mucosa gástrica estratificado em dois grupos.....	57
Tabela 8 - Expressão de HLA-E na mucosa gástrica.....	60
Tabela 9 – Intensidade da expressão de HLA-E na mucosa gástrica.....	61
Tabela 10 – Intensidade da expressão de HLA-E na mucosa gástrica estratificado em dois grupos.....	61

Tabela 11 - Expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com úlcera péptica.....	62
Tabela 12 - Intensidade de expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com úlcera péptica.....	62
Tabela 13 - Expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com carcinoma gástrico.....	63
Tabela 14 - Intensidade de expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com carcinoma gástrico.....	63
Tabela 15 – Avaliação da expressão de HLA-G e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com úlcera péptica.....	64
Tabela 16 – Avaliação da expressão de HLA-E e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com úlcera péptica.....	65
Tabela 17 – Avaliação da expressão de HLA-G e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com carcinoma gástrico.....	66
Tabela 18 – Avaliação da expressão de HLA-E e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com carcinoma gástrico.....	66

Lista de abreviaturas

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

DAB - Diaminobenzidina

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

HCMV – Citomegalovírus Humano

HE - Hematoxilina Eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

HVC - Vírus da Hepatite C

H1N1 – Vírus da Influenza A

IFN - Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

ILT - Immunoglobulin-Like Transcript

ITIM - Inhibitory Tyrosine Induction Motif

KIRs - Killer Immunoglobulin-like Receptors

LLCB - Leucemia Linfocítica Crônica de Células B

LT – Linfócito T

MALT - Tecido Linfóide Associado à Mucosa

MAPK - Proteínas Cinasas Ativadoras de Mitose

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

mRNA - Ácido Ribonucléico Mensageiro

NF-κB - Nuclear Transcription Factor

NK - Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

PBS - Solução Salina Tamponada

PMN - Polimorfonucleares

RNA - Ácido Ribonucléico

RUT - Teste Rápido da Urease

TCR - Receptor de Célula T

Th - T-helper

TLR - Receptores “toll-like”

TNF - Fator de Necrose Tumoral

Tregs - Células T Reguladoras

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	24
1.1 - <i>Helicobacter pylori</i>	25
1.2 - FATORES DE VIRULÊNCIA.....	26
1.3 - RESPOSTA IMUNE.....	28
1.4 - COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)..	31
1.5 - MOLÉCULA DO MHC NÃO-CLÁSSICA HLA-G.....	32
1.6 - MOLÉCULA DO MHC NÃO-CLÁSSICA HLA-E.....	37
2-OBJETIVOS.....	40
2.1- OBJETIVO GERAL.....	41
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1- ASPECTOS ÉTICOS DO PROJETO.....	44
3.2- DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	44
3.3- AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELO <i>H. PYLORI</i>	45
3.4 - BIÓPSIAS GÁSTRICAS.....	45
3.5-OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	46
3.6- IMUNOHISTOQUÍMICA - EXPRESSÃO PROTÉICA DE HLA-G E HLA-E.....	47
3.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4- RESULTADOS.....	49
4.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS.....	50
4.2- EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-G.....	54
4.3- EXPRESSÃO DA MOLÉCULA HLA-E.....	57

4.4 - EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA-G X HLA-E EM BIÓPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES INFECTADOS PELA BACTÉRIA <i>H. PYLORI</i> APRESENTANDO ÚLCERA PÉPTICA.....	61
4.5 - EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS HLA-G X HLA-E EM BIÓPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES INFECTADOS PELA BACTÉRIA <i>H. PYLORI</i> APRESENTANDO CARCINOMA GÁSTRICO.....	62
4.6-CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS ESTRATIFICADAS DE ACORDO COM A EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE HLA-G E HLA-E EM BIÓPSIA GÁSTRICA DE PACIENTES ACOMETIDOS COM ÚLCERA PÉPTICA.....	64
4.7-CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS ESTRATIFICADAS DE ACORDO COM A EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE HLA-G E HLA-E EM BIÓPSIA GÁSTRICA DE PACIENTES ACOMETIDOS COM CARCINOMA GÁSTRICO.....	65
5- DISCUSSÃO.....	67
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
7- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	76
8- ANEXO.....	101

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram negativa, espiralada em forma de S ou em bastonete curvo, microaerófila, e que mede cerca de 3 a 5 μ de comprimento por 0,5 μ de largura; possuindo de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e com bulbo terminal (JAWETZ; LEVINSON, 1994; FREIRE; TONELLI, 2000). Apresenta-se como sendo um dos agentes de infecção crônica mais comum em seres humanos, atingindo a mucosa e microvilosidades gástricas, provocando destruição de células gástricas através da produção de urease (VOLAND et al., 2003), fosfolipase (MISIEWICZ, 1995) e citotoxina, alterando a secreção ácida gástrica (FREIRE; TONELLI, 2000), facilitando sua aderência à mucosa (MAHDAVI et al., 2002). Ademais, algumas dessas bactérias apresentam o Gene *cagA*, agravando sua virulência (ATHERTON, 1997).

Aproximadamente, metade da população mundial está infectada pelo *H. pylori* (SHI et al., 2008). Infecções por esta bactéria podem induzir patologias que variam desde uma simples gastrite crônica ou úlcera péptica, até a evolução para o carcinoma gástrico (BACKERT; CLYNE; TEGTMEYER, 2011). A infecção pelo *H. pylori* é mais prevalente nos países subdesenvolvidos e é bem correlacionada com as condições socioeconômicas. Nos países em desenvolvimento, a prevalência nos adultos é de cerca de 80%, enquanto nos países industrializados ela ocorre em cerca de 20% a 50%. Nos Estados Unidos ficou demonstrado que a melhora nas condições sanitárias ocorridas no país na segunda metade do século XIX reduziu de modo significativo a infecção pelo *H. pylori* (KOUNTOURAS et al., 2008). No Brasil, a soroprevalência do *H. pylori* foi estimada em 65%. Esta prevalência está associada a ambientes populosos, condições de higiene precária, falta de saneamento básico e contato próximo (ZATERKA et al., 2007). Contudo, estudos com crianças e jovens

brasileiros até 18 anos, de famílias de baixa renda, evidenciou um percentual de 34% de soropositivos, que aumenta significativamente com a idade (BEDOYA et al., 2003).

O ser humano é o principal reservatório de *H. pylori*, não tendo ainda sido encontrados animais que sirvam de reservatórios significantes. A infecção não é autolimitada e pode persistir por muitos anos (GLYNN et al., 2002). A via pela qual ocorre a infecção pode ser fecal-oral ou oral-oral (BROWN, 2000). A transmissão interpessoal é considerada a mais importante, conforme evidenciado em estudos com famílias que moram em condições de aglomeração. Estudos utilizando tipagem de DNA confirmaram que membros de uma mesma família tendem a ser infectados pela mesma cepa de bactéria (ROMA-GIANNIKOU et al., 2003).

Após a infecção, a progressão da doença gástrica tem sido associada a diferentes variáveis como cepa infectante, virulência bacteriana, predisposição genética, resposta imune à infecção e dieta (RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Diversos fatores de virulência estão envolvidos na patogenicidade do *H. pylori*, incluindo-se várias enzimas (urease, catalase, lipase, fosfolipase e protease), toxinas e genes associados à citotoxina (RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005). Dentre as enzimas, a mais importante é a urease, a qual é essencial para a sobrevivência da bactéria em meio extremamente ácido, como a luz gástrica, facilitando a colonização da mucosa do estômago. A urease catalisa a degradação da uréia em amônia e dióxido de carbono que torna o meio mais alcalino, permitindo a sobrevivência do microorganismo (HARRIS et al., 1996; MCGEE; MOBLET, 1999).

Em relação à produção de toxinas, a primeira descrita foi a toxina vacuolizadora (VacA), codificada pelo gene *vacA*, o qual não apresenta homólogos em outras bactérias ou outras espécies de *Helicobacter* sugerindo grande grau de importância e relação específica com o estômago humano. Está presente em todas as cepas de *H. pylori*, embora apresente acentuado polimorfismo (RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005; MARSHALL, 2002; SUERBAUM; MICHETTI, 2002). A toxina VacA pode apresentar diferentes mecanismos de ação, como a formação de poros na membrana celular do hospedeiro, modificação do tráfico endo-lisossomal, vacuolização celular e apoptose (AMIEVA; EL-OMAR, 2008; ATHERTON; BLASER, 2009; BACKERT; TEGTMEYER, 2010; POLK; PEEK, 2010).

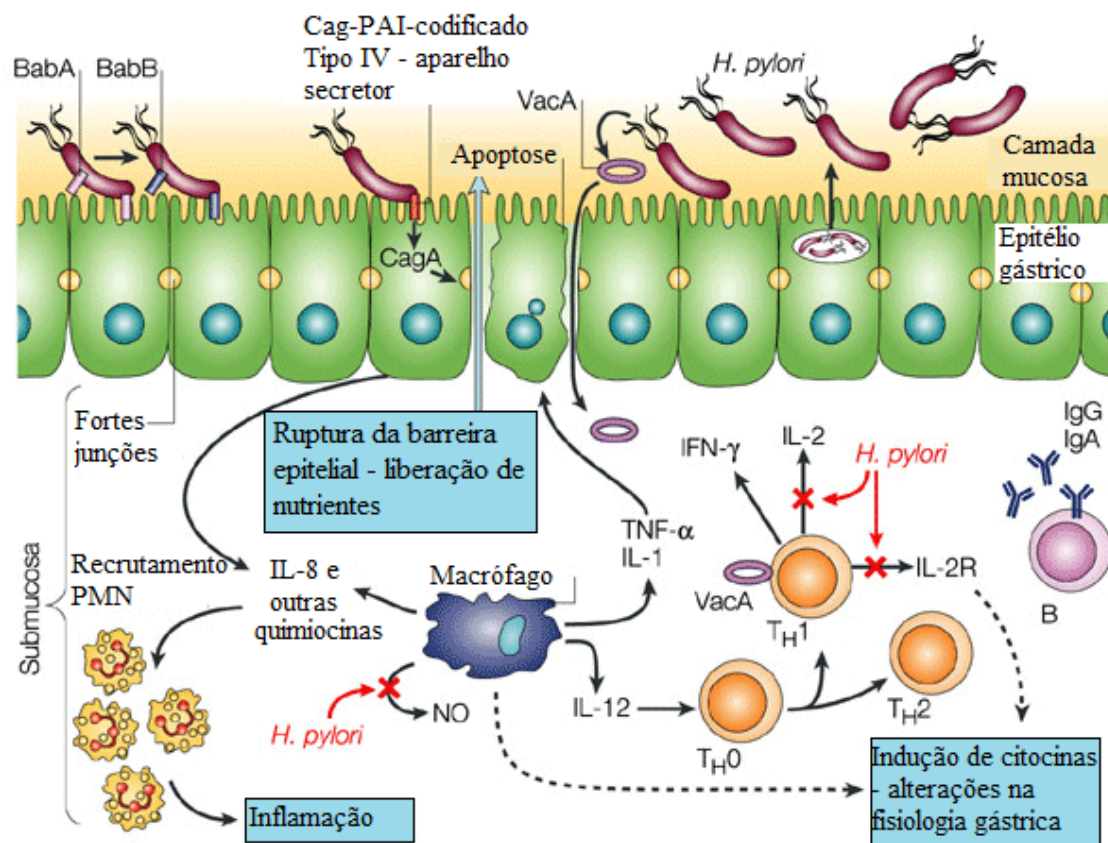
O fator de virulência mais estudado é o gene associado à citotoxina (*cagA*), o qual foi descrito pela primeira vez no final dos anos 80 (COVER; DOOLEY; BLASER, 1990). Atualmente é considerado o marcador de cepas que confere risco aumentado para doenças péptico-ulcerosa (CRABTREE et al., 1991) e carcinoma gástrico (BLASER et al., 1995). Este gene caracteriza a chamada “ilha de patogenicidade” (também usualmente conhecida pela sigla em inglês PAI-Pathogenicity Island) (BLASER; ATHERTON, 2004). A ilha de patogenicidade *cag* (*cag* PAI) é constituída em torno de 29 genes que codificam componentes bacterianos e podem induzir a inflamação (IKENOUE et al., 2001). A produção de citocinas e a presença de *cag* PAI são tidas como os principais fatores de agressividade bacteriana (RADOSZ-KOMONIEWSKA et al., 2005). A *cag* PAI codifica componentes do sistema de secreção do tipo IV (T4SS), que atuam introduzindo o gene *cagA* na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo da célula hospedeira, interferindo com a cascata de sinalização (COVACCI; RAPPUOLI, 2000; TEGTMEYER; WESSLER; BACKERT, 2011).

A sua presença não é observada em todas as bactérias da espécie *H. pylori*, porém as que possuem esta característica parecem ser mais virulentas. A região *cag* PAI contém

também genes que induzem a produção de interleucina oito (IL-8) pelas células epiteliais (MARSHALL, 2002; FISCHER et al., 2001). Esta, por sua vez, atrai neutrófilos que migram dos capilares através da lâmina própria e emergem entre as células epiteliais, liberando produtos agressivos (proteases, radicais livres etc.) que agridem o epitélio (YAMAOKA et al., 1996).

1.3 RESPOSTA IMUNE

O *H. pylori* é altamente adaptado à mucosa gástrica e possui características biológicas que permitem sua entrada no muco, onde migram e se ligam às células epiteliais. Para escapar à atividade bactericida da luz gástrica e entrar na camada mucosa, o *H. pylori* produz urease que, conjuntamente com sua mobilidade, são essenciais no processo inicial da infecção. O *H. pylori* causa inflamação contínua que consiste no recrutamento de neutrófilos, linfócitos T, linfócitos B e macrófagos provocando um dano às células epiteliais da mucosa gástrica. Esta resposta inflamatória é acompanhada de níveis aumentados de diversas citocinas, entre elas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, dentre outras ações decorrentes da cascata inflamatória (WROBLEWSKI; PEEK, 2011; SEPULVEDA, 2001; NAITO; YOSHIKAWA, 2002) como é mostrado na figura 1, adaptada de Monack, Mueller e Falkow (2004). Quando o *H. pylori* escapa da resposta imune ocorre colonização persistente e transmissão. A intensidade da inflamação correlaciona-se com a gravidade dos danos induzidos à mucosa e ao DNA. Ocorre também importante resposta imune humoral, com produção sistêmica de anticorpos que não são capazes de erradicar a infecção, mas podem contribuir para o dano tecidual e levar à gastrite e à úlcera (JAISWAL et al., 2000).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 1. Infecção persistente pela bactéria *H. pylori*. Interação entre *H. pylori* e a resposta imune do hospedeiro leva à gastrite crônica e colonização persistente. (adaptada de MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004).

No decorrer de dezenas de milhares de anos de co-existência com o seu hospedeiro humano, o *H. pylori* tem evoluído adaptações elaboradas que permitem que ele persista no ambiente hostil do estômago em face de uma resposta inata e adaptativa imune vigorosa, incluindo a produção de anticorpos locais e sistêmicos que, geralmente, não são capazes de eliminá-la (MULLER; OERTLI; ARNOLD, 2011; PEREZ-PEREZ et al., 2003; PEEK et al., 1995).

O sistema imunológico inato reconhece o *H. pylori* através dos receptores “toll-like” (TLR) que identificam a sua estrutura molecular. O estímulo dos receptores TLR faz com

que uma verdadeira cascata inflamatória seja desencadeada (MULLER; OERTLI; ARNOLD, 2011; BLASER; ATHERTON, 2004; HOLD; MUKHOPADHYA; MONIE, 2011). Os receptores TLR compõem uma família de 11 membros (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11) de receptores que se encontram expressos nas células dendríticas e são responsáveis pelo reconhecimento de estruturas que foram conservadas pelos microorganismos durante sua evolução, como o lipopolissacáride e o ácido lipoteicóico. Através da ligação aos receptores TLR2 e TLR4, localizados na membrana das células mononucleares, ocorre à ativação de sistemas de sinalização, como o do fator nuclear kappa-beta (NF-KB) e das proteínas cinases ativadoras de mitose (MAPK), do que resulta a determinação do perfil de secreção de citocina por essas células inflamatórias. No caso da infecção pelo *H. pylori* os macrófagos do hospedeiro produzem citocinas inflamatórias, como a IL-1 β e IL-6, fundamentais na patogênese da infecção (RAD et al., 2007).

Por outro lado, quanto ao sistema imune adaptativo, a relação entre o *H. pylori* e o hospedeiro tem sido estudada em modelos murinos infectados por *Helicobacter ssp*, mostrando que a participação das células T é fundamental na resposta do hospedeiro. Acredita-se que, como o *H. pylori* é considerado um patógeno que não apresenta um ciclo intracelular, seria de se esperar resposta adaptativa com padrão predominante Th2. Por outro lado, na vigência da infecção pelo *H. pylori* há predominância da ativação das células Th1, responsáveis pela produção das citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-17 e TNF- α . Crescente interesse tem sido direcionado à função das células T reguladoras, denominadas Tregs, na infecção pelo *H. pylori*. Essas células estão associadas ao controle de respostas imunes exacerbadas, como ocorre na sensibilização a alérgenos e nas doenças auto-imunes. Estudos *in vitro* têm mostrado que as Tregs podem suprimir a resposta de células T de memória e permitir a persistência da infecção pelo *H. pylori* (WILSON; CRABTREE, 2007).

Outras moléculas também podem estar associadas com a indução de tolerância através de um mecanismo de sinalização inibitória como ocorre com as moléculas de HLA-G e HL-E. (WIENDL et al.,2002; ROUAS-FREISS et al., 2005a)

1.4 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC)

Os genes que compõem o MHC humano têm sido agrupados em regiões designadas de classe I, II e III, de acordo com as suas localizações no braço curto do cromossomo 6. Atualmente, são reconhecidos mais de 40 loci no MHC humano (sistema HLA, do inglês Human Leukocyte Antigen) codificando diversas moléculas, muitas delas diretamente envolvidas na resposta imune. A região de classe I engloba os loci HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K, L, P e V (LAWLOR et al., 1990; GERAGHTY, 1993; MARSH et al., 2010). Os genes HLA-A, B e C codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade presentes em praticamente todas as células nucleadas (LAWLOR et al., 1990; SULLIVAN et al., 2006;), enquanto os genes HLA-E e F codificam moléculas encontradas em tecidos fetais e em alguns tecidos da fase adulta (WEI; ORR, 1990; GERAGHTY, 1993; GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987; PYO et al., 2006), já os genes HLA-G são responsáveis pela síntese de moléculas presentes em tecidos do trofoblasto (LOKE; KING, 1991; ISHITANI; GERAGHTY, 1992; PARHAM, 1996).

O HLA-G, E e F são genes não clássicos de classe Ib do sistema HLA (GERAGHTY, 1993; PYO et al., 2006). Os genes não clássicos Ib são caracterizados por apresentar baixo polimorfismo e distribuição restrita a determinados tecidos, sendo que seu papel vem sendo associado com a regulação da resposta imune (SULLIVAN et al., 2006).

1.5 MOLÉCULA DO MHC NÃO-CLÁSSICA HLA-G

O HLA-G, assim como os outros genes clássicos do HLA, apresenta oito éxons, sete íntrons e uma região 3' não-traduzida. A presença de um códon de terminação de cadeia no éxon 6 e a ocorrência de edição alternativa de RNA permitem a produção de sete isoformas da molécula que se expressam, principalmente, no tecido placentário e no timo (ABBAS et al., 2004). O baixo grau de polimorfismo e expressão restrita ao citotrofoblasto desencadeou a hipótese de que a função do HLA-G estaria relacionada à proteção do feto contra a resposta imune provinda da mãe. Embora o HLA-G não seja o único responsável por este mecanismo, uma vez que níveis semelhantes de incompatibilidade de HLA-G existem entre casais férteis e casais com histórico de aborto (GAZIT et al., 2004).

O gene HLA-G foi primeiramente clonado em 1987 por Geraghty, Koller e Orr, mas só reconhecido em 1990, quando Ellis, Palmer e McMichael verificaram que a molécula atípica HLA de classe I, presente em abundância na interface materno-fetal, era idêntica ao HLA-G. Estudos posteriores confirmaram que o HLA-G era expresso em toda a interface celular onde células maternas e fetais estavam em contato, por exemplo: células trofoblásticas invasivas, células do endotélio vascular fetal, células do âmnion e do líquido amniótico (LE BOUTEILLER et al., 1999), sendo recentemente constatado sua expressão também no sistema reprodutivo masculino e no plasma seminal (LARSEN et al., 2011).

HLA-G é expresso de maneira constitutiva em células tímicas, em subpopulação de células do citotrofoblasto, em tecidos coriônicos e córnea (ELLIS et al., 1986; CRISA et al., 1997; KING et al., 2000; LE DISCORDE et al., 2003; ISHITANI et al., 2003), precursores eritróide e endotelial (MENIER et al., 2004). Estudo mais recente estabeleceu que a molécula HLA-G é constitutivamente expressa no compartimento endócrino do pâncreas humano (CIRULLI et al., 2006).

Uma expressão ectópica da proteína HLA-G pode ser observada em condições patológicas, e sua expressão pode ser detectada em diversas células e tecidos. Dados experimentais demonstram que os linfócitos T, células apresentadoras de antígenos (APCs), células tumorais e tecidos transplantados podem expressar HLA-G na isoforma ligada à membrana ou solúvel (PYO et al., 2006). As primeiras tentativas de elucidação da importância de HLA-G no controle da resposta imune resultaram de diversos estudos em complicações associadas à gravidez, tais como abortos espontâneos (HVIID et al., 2002; OBER et al., 2003; HVIID, 2004; HVIID, 2006). Outros pesquisadores investigaram sua expressão nas células do citotrofoblasto, sua presença sugere indução de mecanismos de tolerância dirigidos ao enxerto semi-alogênico fetal pelo sistema imune materno (ROUAS-FREISS et al., 1997).

Relatos mais recentes demonstraram que as funções inibitórias de HLA-G ocorrem pela interação da molécula com pelo menos 3 receptores que possuem “motifs” intracelular inibitório (*inhibitory tyrosine induction motif*- ITIM), uma vez associado ao seu ligante, tais receptores podem promover a inativação das tirosinas kinases presentes em células imunocompetentes (LE ROND et al., 2006).

Estes receptores são membros da família de imunoglobulinas (Ig) e são denominados de ILT-2 (*Immunoglobulin-Like Transcript-2*), presentes nas populações de linfócitos T, NK, monócitos, macrófagos, linfócitos B e células dendríticas; ILT-4, presentes nos monócitos, macrófagos e células dendríticas e p49/KIR2DL4, presente em células NK e linfócitos TCD8+ [54-57]. Se, por um lado, ILT-2 e ILT-4 interagem também com outras moléculas HLA de classe I, por outro lado KIR2DL4 é um receptor específico para HLA-G (SHIROISHI et al., 2003).

Mesmo que a expressão constitutiva do HLA-G seja firmemente controlada e restrita a certos tecidos, atualmente sabe-se que essa expressão pode ser alterada durante várias

condições patológicas, tais como transplantes, câncer e infecções virais (LEMAOULT et al., 2003).

A expressão de HLA-G foi observada na colite ulcerativa, mas não na doença de Crohn (TORRES et al., 2004). Outro estudo mostrou que altos níveis de HLA-G5 foram detectados no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (LEMAOULT et al., 2003). Também foi descrito que em pacientes com esclerose múltipla há uma baixa regulação da expressão monocítica de HLA-G que pode contribuir para a diminuição da capacidade imunomodulatória dessas células (WIENDL; MITSDOERFFER; WELLER, 2003). Assim como também, há relatos de que altos níveis de sHLA-G foram encontrados na mucosa genital de pacientes infectados com HIV-1 e vaginose bacteriana (THIBODEAU et al., 2011).

A expressão de HLA-G em alguns tecidos e células tumorais, embora com algumas controvérsias, é um fato bem documentado (BUKUR; SELIGER, 2003; PAUL et al, 1998). Essa expressão não permite o reconhecimento de células tumorais pelas células NK, conferindo assim uma vantagem ao desenvolvimento do tumor. Análises por imunohistoquímica de biópsias de câncer revelaram o aumento da expressão da proteína HLA-G em vários tipos de lesões malignas, apresentando expressão nas células tumorais e/ou em células inflamatórias infiltradas (CHANG; MURPHY; FERRONE, 2003; MARINCOLA et al., 2003).

Embora o HLA-G tenha sido detectado em uma grande variedade de tumores analisados, a percentagem de lesões positivas variou de acordo com o tecido analisado com o mínimo de 14% no carcinoma de células basais e o máximo de 100% nas molas hidatiformes (ROUAS-FREISS et al., 2003). Shih e Davidson (2009) relataram genes associados com o desenvolvimento de câncer de ovário, dentre eles o HLA-G. O HLA-G foi mais expresso em 61% dos carcinomas de ovário de alto grau e em 25% dos carcinomas ductais invasivos de

mama. Nas lesões benignas ou de baixo grau de mama e ovário normais, a expressão tecidual do HLA-G não foi detectada (DAVIDSON et al., 2005; SINGER et al., 2003). Ainda, a proteína HLA-G também foi detectada em tumores de cérebro, tais como, glioblastomas e oligoastrocitomas anaplásicos e em carcinoma de pulmão (WIENDL et al., 2002; UROSEVIC et al., 2001). Nas doenças linfoproliferativas e em células de carcinoma renal, o HLA-G foi detectado na forma solúvel (BUKUR et al., 2003a; BUKUR et al., 2003b; SEBTI et al., 2003). Estudos também demonstram a expressão de mRNA na maioria dos carcinomas de células renais, mas nunca em células renais normais, associando a expressão de HLA-G com o quadro maligno (ARACTINGI et al., 2003). Na leucemia linfocítica crônica de células B (LLCB), a expressão de HLA-G foi correlacionada com o grau de imunossupressão celular e humoral em pacientes com LLCB (NUCKEL et al., 2005). Estudos recentes evidenciaram a expressão de HLA-G em carcinoma hepatocelular, indicando que esta molécula pode ser utilizada como um marcador de prognóstico para esse tipo de câncer (WANG et al., 2011; CAI et al., 2009).

A alta expressão de HLA-G também foi relacionada à transformação maligna em células melanocíticas (PAUL et al., 1998; CHANG; MURPHY; FERRONE, 2003; ADRIAN et al., 1999; IBRAHIM et al., 2004; PAUL et al., 1999). Da mesma forma que a expressão de HLA-G protege o feto do efeito citolítico das células NK, esta mesma expressão também poderia favorecer a evasão de células tumorais (ALGARRA et al., 2004; LE BOUTEILLER, 1997). No caso das células NK, a aquisição de HLA-G, muda o seu comportamento funcional de células de lise para células reguladoras de células tumorais (células alvo) protegendo-as. A trogocitose de HLA-G1 representa um novo mecanismo de geração da regulação celular: uma delas não envolve a maturação de células regulatórias de vida longa, e outra que envolve a conversão direta e imediata de células efectoras em células que adquirem

temporariamente, efetiva função regulatória *in situ* e assim proporcionam uma supressão imunológica local de emergência (Figura 2) (CAROSELLA et al., 2008).

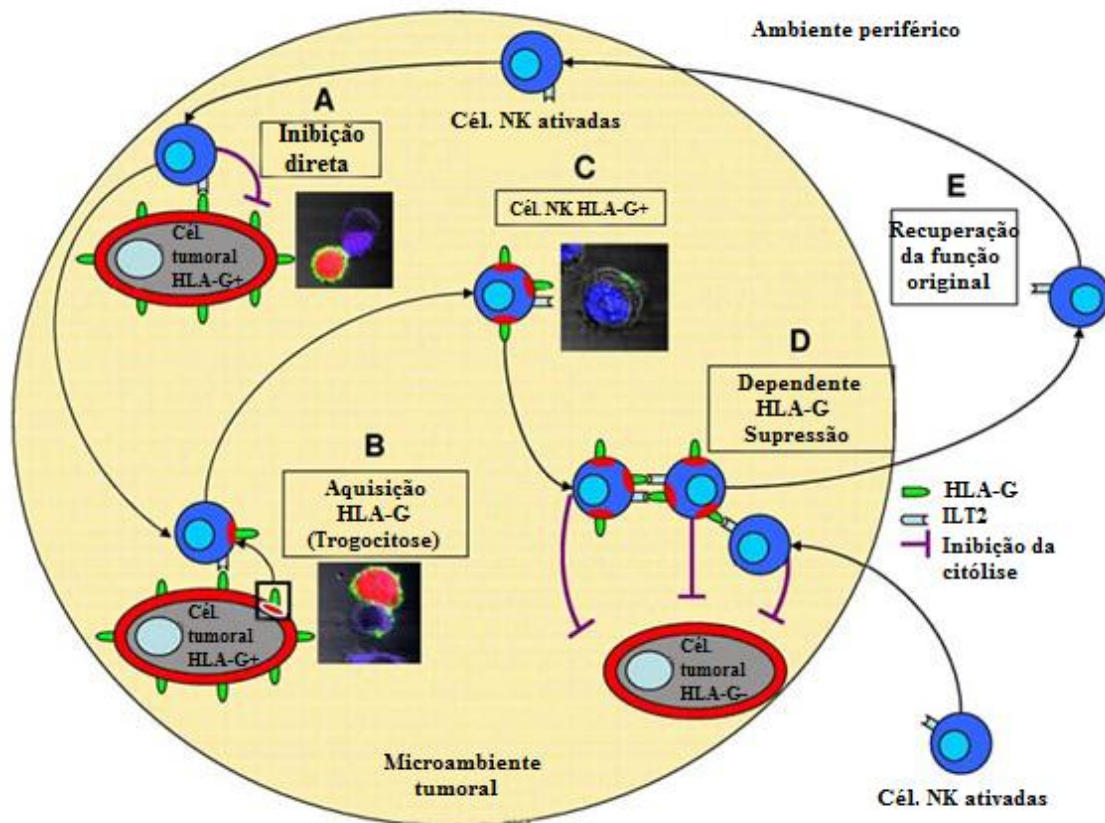


Figura 2. Representação esquemática da supressão imune local de emergência: um possível impacto de trogoctose de HLA-G sobre as respostas imunes. (adaptada de CAROSELLA et al., 2008).

Apesar da molécula HLA-G ser bastante estudada no contexto de câncer, doenças auto-imunes e infecções virais, não foi encontrado relatos na literatura associando esta molécula com infecção bacteriana por *H. pylori*, sendo este, portanto, um dos objetivos do nosso estudo.

1.6 MOLÉCULA DO MHC NÃO-CLÁSSICA HLA-E

Diferentemente da molécula de HLA-G, a expressão e função de HLA-E em processos fisiológicos e patológicos permanecem pobremente estabelecidas. HLA-E é expresso de forma constitutiva em linfócitos T, linfócitos B, células NK e macrófagos (COUPEL et al., 2007). Coupel et al. (2007) demonstraram que em órgãos não linfóides de indivíduos normais, HLA-E é expresso nas células endoteliais destes órgãos, e, para que ocorra a estabilização da molécula para a sua expressão de superfície, HLA-E requer a disponibilidade de peptídeos derivados da seqüência líder de várias moléculas HLA de classe I clássicas, incluindo, HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-G (BRAUD et al., 1998; LEE et al., 1995). Ainda, HLA-E pode ser encontrado também na forma solúvel (HLA-Es). Assim, quando HLA-G é expresso em células ou tecidos, a co-expressão na superfície celular da molécula HLA-E também pode ocorrer (CAROSELLA et al., 2003).

HLA-E tem sido identificado como um ligante para os receptores CD94/NKG2A e CD94/NKG2C expressos em células NK. A molécula de HLA-E juntamente com peptídeos de seqüência líder oriundas das moléculas de HLA de classe I clássicas interagem com o receptor inibitório CD94/NKG2A presente na célula NK, resultando na inibição da lise por estas células e por LT CD8+ (POSCH et al., 1998; BRAUD et al., 1998; LEE et al., 1995). Sendo assim, o complexo HLA-E e peptídeos da seqüência líder pode interagir com LT CD8+ expressando TCRs $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, o que fornece uma via de proteção e regulação da função de LT CD8+ (POSCH et al., 1998). Por outro lado, quando o HLA-E interage com peptídeo sinal oriundo da molécula de HLA-G, esse complexo se liga ao receptor CD94/NKG2C, promovendo ativação das células NK (LEE et al., 1995; LLANO et al., 1998).

A evidência definitiva da importância de HLA-E na regulação da resposta imune foi obtida da construção de animais deficientes de Qa1 (homólogo para o HLA-E em humanos)

(HU et al., 2004). Esses animais apresentaram defeitos na imunoregulação mediada pelos LT CD8+, mostrando o envolvimento de células T CD8+ supressoras restritas à expressão de HLA-E para antígenos próprios ou estranhos (PANOUTSAKOPOULOU et al., 2004; SARANTOPOULOS; LU; CANTOR, 2004).

A importância *in vitro* da expressão da molécula HLA-E foi enfatizada em linhagens de melanoma metastático, assegurando a função supressora dessa molécula (DERRE et al., 2006). Recentemente, também detectada em sua forma solúvel *in vivo* em pacientes com melanoma (ALLARD et al., 2011).

Posteriormente, Schulte et al. (2009) identificaram o aumento da expressão de HLA-E em pacientes com hepatite C crônica no qual foram identificados pelo peptídeo do vírus da hepatite C (HCV). O HLA-E favorece a inibição das células NK, indicando uma importante função imunomoduladora de HLA-E na hepatite C. Joosten et al. (2010) também identificaram uma atividade imunomoduladora ao relacionar a resposta imune ao *Mycobacterium tuberculosis* com sua ligação a novos peptídeos HLA-E.

Recentemente, foi avaliada a expressão da molécula HLA-E em amostras de pacientes com carcinoma colorretal através da técnica de imunohistoquímica no qual foi constatado que a molécula de HLA-E favorece a ativação da resposta imune ao carcinoma colorretal, apresentando uma alta correlação com a expressão do HLA-A (BENEVOLO et al., 2011). Em linhagens de células tumorais representativas das principais linhagens linfóides e não-linfóides, o HLA-E foi detectado em todas as amostras, o que sugere que o HLA-E pode representar um mecanismo de evasão do sistema imune (LO MONACO et al., 2011).

Uma questão central e que remete a muitas controversias são os mecanismos de supressão dessa molécula. Diferentemente da molécula HLA-G, o papel do HLA-E é mais restrito. Nesse contexto, nossos estudos estarão focalizados sobre a expressão de HLA-E e

seu papel em pacientes com infecção com *H. pylori*, visto que a expressão dessa molécula ainda não foi avaliada em biópsias gástricas.

Embora sejam relatados vários estudos de associação envolvendo a molécula HLA-G, em moléstias inflamatórias e câncer, ainda pouco se sabe acerca da relação dessa molécula nas infecções bacterianas, assim como em relação à molécula HLA-E, especificamente, em estudos relacionados ao *H. pylori*. Visto que alguns tipos de cepas *H. pylori* são reconhecidamente carcinógenos, que a expressão de HLA-G e HLA-E podem favorecer o escape de células tumorais da resposta imune do hospedeiro, desenvolvemos este trabalho sob a hipótese de que a expressão de HLA-G e HLA-E em biópsias gástricas de pacientes infectados com *H. pylori* possa favorecer a evolução da infecção e resultar em diferentes graus de lesão do epitélio gástrico. Células epiteliais gástricas expressando a molécula de HLA-G e/ou HLA-E poderiam favorecer a inibição da resposta inflamatória e o recrutamento celular, e conseqüentemente diminuir a inflamação. Por outro lado, a alta expressão dessa molécula pode favorecer as células tumorais escaparem da imunovigilância, e assim evadir da resposta imune do hospedeiro favorecendo o estabelecimento de metaplasias e câncer gástrico.

A compreensão desse paradoxo contribuirá para um melhor entendimento dos mecanismos que controlam a resposta imune do hospedeiro à infecção com *H. pylori*. Assim, investigar a possível participação da molécula de HLA-G e HLA-E na fisiopatogenia da infecção com *H. pylori* torna-se extremamente relevante.

Objetivos

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

Avaliar a expressão das moléculas de HLA de classe I não clássicas, Antígeno Leucocitário Humano G e E (HLA-G e HLA-E), na patogênese de pacientes acometidos com *H. pylori*, em amostras de pacientes com úlcera péptica e carcinoma gástrico.

2.2- Objetivos específicos:

2.2.1- Correlacionar a expressão do Antígeno Leucocitário Humano G e E (HLA-G e HLA-E) em biópsias gástricas, provenientes de pacientes acometidos com úlcera e carcinoma gástrico, com os seguintes critérios: presença de *H. pylori*, idade, sexo, atividade inflamatória, cronicidade, metaplasia, hiperplasia foveolar, ulceração, dilatação cística, atrofia, eosinófilos, atipia, alteração de reparo, acúmulo linfóide, folículo linfóide, localização do tumor, tipo histológico do tumor. Em relação a um mecanismo que está associado com a indução de tolerância podemos citar a sinalização inibitória mediada pelas moléculas HLA-G e HL-E. Embora os mecanismos pelos quais HLA-G participa do controle da resposta imune não estejam totalmente elucidados, a molécula de HLA-G vem sendo intensivamente estudada em várias condições patológicas, tais como tumores (WIENDL et al., 2002; ROUAS-FREISS et al., 2005a), em doenças autoimunes (MITSDOERFFER et al., 2005), em transplante de órgãos (LILA et al., 2000; LILA et al., 2002; CRÉPUT et al., 2003a; CRÉPUT et al., 2003b) e infecções virais (LOZANO et al., 2002). Os mecanismos de supressão da molécula de HLA-E durante a resposta imune também é pouco conhecida. A expressão de HLA-E tem sido identificada em pacientes com

hepatite C crônica (SCHULTE et al., 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (JOOSTEN et al., 2010), carcinoma colorretal (BENEVOLO et al., 2011) e em linhagens de células tumorais (LO MONACO et al., 2011). Portanto, desenvolvemos este trabalho sob a hipótese de que a expressão de HLA-G e HLA-E em biópsias gástricas de pacientes infectados com *H. pylori* possa favorecer a evolução da infecção e resultar em diferentes graus de lesão do epitélio gástrico. Células epiteliais gástricas expressando a molécula de HLA-G e/ou HLA-E poderiam favorecer a inibição da resposta inflamatória e o recrutamento celular, e conseqüentemente diminuir a inflamação.

2.2.2-Verificar se há associação entre a expressão dos antígenos de histocompatibilidade humano HLA-G e HLA-E, em tecido gástrico retirado por biópsia, e a evolução clínica dos pacientes acometidos pela bactéria *H. pylori*. Alguns tipos de cepas *H. pylori* são reconhecidamente carcinógenos e a expressão de HLA-G e HLA-E podem favorecer o mecanismo de escape de células tumorais pelas células do sistema imune do hospedeiro. Posto isto, a compreensão de fatores imunológicos que controlam e participam da resposta imune local se faz necessário. Tal abordagem é inovadora dentro do universo científico e, desta maneira, este estudo ampliará os conhecimentos científicos sobre o potencial uso dessas moléculas como uma grande ferramenta de prognóstico da doença. Ainda, será útil no combate da forma precoce, fase assintomática de gastrite aguda, evitando a evolução para gastrite crônica e/ou formação de úlceras duodenais, atrofia de mucosa, carcinoma gástrico ou linfoma gástrico, além do mais, na literatura internacional nenhum trabalho foi encontrado associando à presença da bactéria com a expressão de moléculas não clássicas, nem, tão pouco, no estado do Rio Grande do Norte nenhum estudo tem sido registrado até o momento.

Material e métodos

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Aspectos éticos do projeto

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes – UFRN, obedecendo às diretrizes regulamentadas da pesquisa envolvendo seres humanos, que constam na Resolução do CNS nº 196/96. A pesquisa foi aprovada sob parecer nº 308/09 (anexo 1).

3.2- Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, no qual foram estudados 64 espécimes de pacientes diagnosticados com a bactéria *H. pylori* no período correspondente aos anos de 2007 a 2011. Esses pacientes foram selecionados do arquivo do Departamento de Patologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os dados demográficos e epidemiológicos dos pacientes, além de outros dados clínicos foram levantados diante da análise de prontuários médicos.

3.3- Avaliação da infecção pelo *H. pylori*

Resultados foram obtidos a partir da endoscopia de um grupo de 64 pacientes realizada no Departamento de Gastroenterologia do Hospital Universitário Onofre Lopes. Para todos os pacientes foram realizados o Teste Rápido da Urease (RUT) e a coloração de Giemsa. O RUT é um exame realizado para investigar a presença da bactéria *H. pylori* na mucosa do estômago. Fragmentos da mucosa, colhidos durante a endoscopia, são colocados em um frasco contendo uréia e um indicador de pH, fenoftaleína. Graças à produção da enzima urease pelo *H. pylori*, a uréia é metabolizada em CO₂ e amônia, aumentando o pH e mudando a cor da solução de amarela para avermelhada. Portanto, a presença de infecção por *H. pylori* foi determinada pela positividade do RUT e pela coloração de Giemsa.

3.4. Biópsias gástricas

A obtenção do fragmento foi feita por meio de biópsia e realizada conforme indicação clínica no momento do procedimento endoscópico no Hospital Universitário Onofre Lopes. Após a obtenção dos espécimes, os blocos foram arquivados e retirados no momento da realização deste estudo.

3.5. Obtenção dos espécimes para análises histopatológicas

Com a finalidade de caracterizar morfologicamente as espécimes gástricas nos pacientes infectados pela bactéria *H. pylori*, fragmentos da mucosa gástrica foram fixados no formol tamponado e, após 6 (seis) horas, desidratados em álcool 70% e clarificados em xilol. Os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina e cortes de 3 µm foram obtidos com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 59- 60°C para fixação. Em seguida, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados em concentração decrescente de álcool. Os cortes reidratados foram corados com hematoxilina e eosina (HE), para análise do infiltrado inflamatório e pelo Giemsa modificado para identificação do *H. pylori*. Em seguida foram desidratados com álcool absoluto, lavados com xilol e cobertos com lamínulas. Os achados histopatológicos foram classificados conforme a classificação de Sydney (MISIEWICZ, 1991). Todas as análises ópticas foram processadas no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e analisadas por uma equipe de dois patologistas, conforme os seguintes critérios: presença de *H. pylori*, de atividade inflamatória, de cronicidade, de metaplasia, de hiperplasia foveolar, de ulceração, de dilatação cística, de atrofia, de eosinófilos, de atipia, de alteração de reparo, de acúmulo linfóide, de folículo linfóide.

3.6. Imunohistoquímica - Expressão protéica de HLA-G e HLA-E

A avaliação da expressão de antígenos de histocompatibilidade (HLA-G e HLA-E) em tecido gástrico foi realizada utilizando-se técnica de imunohistoquímica. A expressão de HLA-G e HLA-E foram avaliadas em amostras parafinadas obtidas do epitélio gástrico proveniente de biópsia de paciente acometido com *H. pylori*. Para caracterizar a expressão da molécula HLA-G e HLA-E, foram utilizados, respectivamente, o anticorpo monoclonal anti-HLA-G e anti-HLA-E (Exbio - República Checa) dando início com a recuperação antigênica em ácido cítrico 10 mM com rigorosa aferição do pH (6,0), durante 40 minutos.

Após recuperação antigênica, os cortes foram lavados em PBS 0.01M (pH 7.2). Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, por meio da incubação dos cortes com peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 minutos, seguido de lavagens com PBS. Depois deste procedimento, os cortes foram incubados com soro de leite a 1% em água destilada (leite desnatado Molico, Nestlé) por 30 minutos, a fim de obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, dispensando dessa vez as lavagens, os cortes foram incubados com o anticorpo primário, em câmara úmida, em uma temperatura de 4°C, por uma noite.

O anticorpo utilizado foi o anticorpo monoclonal humano, anti-HLA-G e anti-HLA-E (EXBIO-REPÚBLICA THECA), na diluição de 1/50. O anticorpo foi diluído em PBS, contendo 1% de tween 20 (Sigma). Após esse período, foi aplicado o anticorpo secundário proveniente do MACH 4 Universal HRP Polymer Detection (Biocare Medical).

Posterior às lavagens consecutivas com PBS, procedeu-se a revelação da reação, utilizando-se o substrato revelador 3,3 diaminobenzidina (DAB) à temperatura ambiente. Posteriormente, as reações foram interrompidas com PBS e as lâminas coradas com Hematoxilina de Harris por 15 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada, as lâminas foram imediatamente montadas com meio para montagem Permount (Merck, Darmstadt, Alemanha). O controle das reações foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por PBS. O controle negativo foi constituído de 25 indivíduos sem nenhum acometimento gástrico, ou seja, mucosa gástrica normal para detectar se haveria produção basal dessas moléculas no tecido gástrico. Como controle positivo da reação foi utilizado fragmento de trofoblasto humano pertencente ao terceiro trimestre de gravidez para caracterizar a expressão de HLA-G e biópsias deciduais para caracterizar a expressão de HLA-E.

3.7. Análise Estatística

Diferenças qualitativas entre os grupos determinados, de acordo com parâmetros clínicos, foram avaliadas por meio do teste do qui-quadrado para variáveis independentes e do teste exato de Fisher com o auxílio do software GraphPad InStat (San Diego, CA, EUA), com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e valores de $p < 0,05$ considerados significativos.

Resultados

4- RESULTADOS

4.1. Análise histológica de biópsias gástricas

Por ocasião do surgimento de manifestações clínicas, foram coletadas 64 biópsias gástricas de pacientes submetidos ao procedimento endoscópico. Espécimes gástricas foram coletadas, fixadas e processadas para análise histológica, na qual foram observados os seguintes critérios: presença de *H. pylori*, atividade inflamatória, cronicidade, metaplasia, hiperplasia foveolar, ulceração, dilatação cística, atrofia, eosinófilos, atipia, alteração de reparo, acúmulo linfóide, folículo linfóide. Os achados histológicos da população do estudo são apresentados nas Tabelas 1 a 4 e Figura 3. A bactéria *H. pylori* foi detectada em 64 casos (100%) através da coloração de Giemsa (Figura 3A e B) e do RUT. De acordo com análises histopatológicas, os pacientes foram estratificados em dois grupos: pacientes com úlcera péptica (37, 58%) e pacientes com carcinoma gástrico (27, 42%).

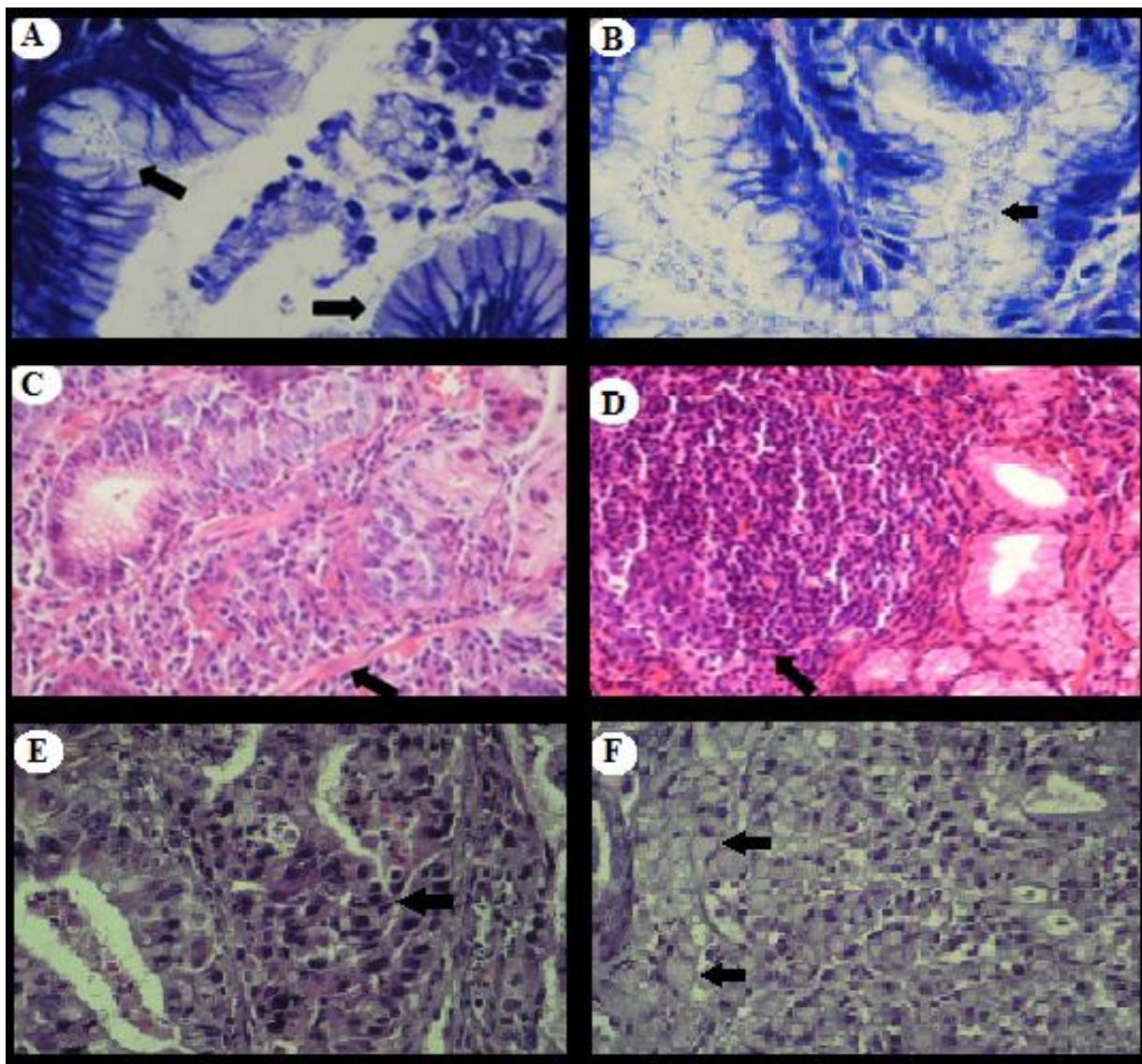


Figura 3. Critérios histológicos de pacientes acometidos com úlcera e carcinoma gástrico. **A e B-** Intensidade do *H. pylori* no epitélio gástrico (Giemsa). **C-** Atividade inflamatória, presença de Eosinófilos (HE). **D-** Formação de Folículos Linfóides e Acúmulo Linfóide (HE). **E-** Adenocarcinoma gástrico de padrão intestinal. Núcleos hiper Cromáticos (seta) (HE). **F-** Adenocarcinoma difuso com células em anel de sinete (seta) (HE). (40 x).

Tabela 1 – Avaliação da expressão de HLA-G em pacientes com úlcera péptica associada a parâmetros histopatológicos

Parâmetros Histopatológicos	Nº de Casos	Expressão HLA-G		P valor	
		Positivo	Negativo	Qui-quadrado	Fisher
<i>H. pylori</i>	37	35	2	-	-
Cronicidade	37	35	2	-	-
Alterações de reparo	37	35	2	-	-
Atividade inflamatória	34	32	2	0,6658	1,0000
Acúmulo linfoide	18	16	2	0,4433	0,2297
Hiperplasia foveolar	10	8	2	0,1162	0,0676
Folículo linfoide	15	13	2	0,3075	0,1577
Metaplasia Incompleta	5	5	0	0,5654	1,0000
Metaplasia Completa	3	3	0	0,6658	1,0000

(-) Não é possível realizar o teste estatístico quando há ausência de amostras para um determinado parâmetro.

Tabela 2 – Avaliação da expressão de HLA-G em pacientes com carcinoma gástrico associado a parâmetros histopatológicos

Parâmetros Histopatológicos	Nº de Casos	Expressão HLA-G		P valor	
		Positivo	Negativo	Qui-quadrado	Fisher
<i>H. pylori</i>	27	23	4	-	-
Cronicidade	27	23	4	-	-
Alterações de reparo	25	22	3	0,6735	0,2792
Atividade inflamatória	26	22	4	0,6709	1,0000
Acúmulo linfoide	9	8	1	0,7017	1,0000
Hiperplasia foveolar	15	11	4	0,1636	0,1060
Folículo linfoide	2	1	1	0,6735	0,2792
Metaplasia Incompleta	8	8	0	0,4163	0,2855
Metaplasia Completa	4	3	1	0,5344	0,4954

(-) Não é possível realizar o teste estatístico quando há ausência de amostras para um determinado parâmetro.

Tabela 3 – Avaliação da expressão de HLA-E em pacientes com úlcera péptica associada a parâmetros histopatológicos

Parâmetros Histopatológicos	Nº de Casos	Expressão HLA-E		P valor	
		Positivo	Negativo	Qui-quadrado	Fisher
<i>H. pylori</i>	37	33	4	-	-
Cronicidade	37	33	4	-	-
Alterações de reparo	37	33	4	-	-
Atividade inflamatória	34	30	4	0,5293	1,0000
Acúmulo linfoide	18	16	2	0,9543	1,0000
Hiperplasia foveolar	10	10	0	0,4885	0,5571
Folículo linfoide	15	14	1	0,8957	0,6328
Metaplasia Incompleta	5	5	0	0,9499	1,0000
Metaplasia Completa	3	2	1	0,7333	0,2978

(-) Não é possível realizar o teste estatístico quando há ausência de amostras para um determinado parâmetro.

Tabela 4 – Avaliação da expressão de HLA-E em pacientes com carcinoma gástrico associado a parâmetros histopatológicos

Parâmetros Histopatológicos	Nº de Casos	Expressão HLA-E		P valor	
		Positivo	Negativo	Qui-quadrado	Fisher
<i>H. pylori</i>	27	22	5	-	-
Cronicidade	27	22	5	-	-
Alterações de reparo	25	21	4	0,8063	0,3419
Atividade inflamatória	26	21	5	0,6271	1,0000
Acúmulo linfoide	9	8	1	0,8610	0,6361
Hiperplasia foveolar	15	13	2	0,7818	0,6280
Folículo linfoide	2	1	1	0,8063	0,3419
Metaplasia Incompleta	8	6	2	0,9840	0,6159
Metaplasia Completa	4	3	1	0,7177	1,0000

(-) Não é possível realizar o teste estatístico quando há ausência de amostras para um determinado parâmetro.

4.2. Expressão da molécula HLA-G

Com a finalidade de verificar associação entre expressão da molécula HLA-G e a contribuição desta molécula na indução da tolerância, comparamos qualitativamente a expressão dessa molécula em biópsias gástricas de pacientes infectados pela bactéria *H. pylori* apresentando úlcera péptica e carcinoma gástrico.

A expressão da molécula HLA-G não foi observada em espécimes obtidos de indivíduos sem nenhum acometimento gástrico, ou seja, mucosa gástrica normal (Figura 4A).

Dentre as 64 biópsias avaliadas, 58 (91%) apresentaram expressão citoplasmática de HLA-G. Avaliamos o perfil de expressão dessa molécula em biópsias estratificadas em úlcera péptica e carcinoma gástrico. Assim, entre os 37 (58%) espécimes avaliados com úlcera péptica, 35 (55%) expressavam HLA-G. Dentre os 27 (42%) espécimes que apresentavam carcinoma gástrico, 23 (36%) expressavam HLA-G (Tabela 5). A expressão dessa molécula foi predominantemente difusa no qual os principais sítios de expressão foram as células glandulares e linfócitos em ambos os grupos estudados, sendo que, em alguns casos, detectou-se marcação para HLA-G também em células do interstício. Células tumorais e alguns casos de plasmócitos expressaram HLA-G apenas em espécimes com carcinoma gástrico (Figura 4)

Quando aplicamos o Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes e o Teste Exato de Fisher, observamos que não houve significância estatística entre os grupos estudados (Tabela 5).

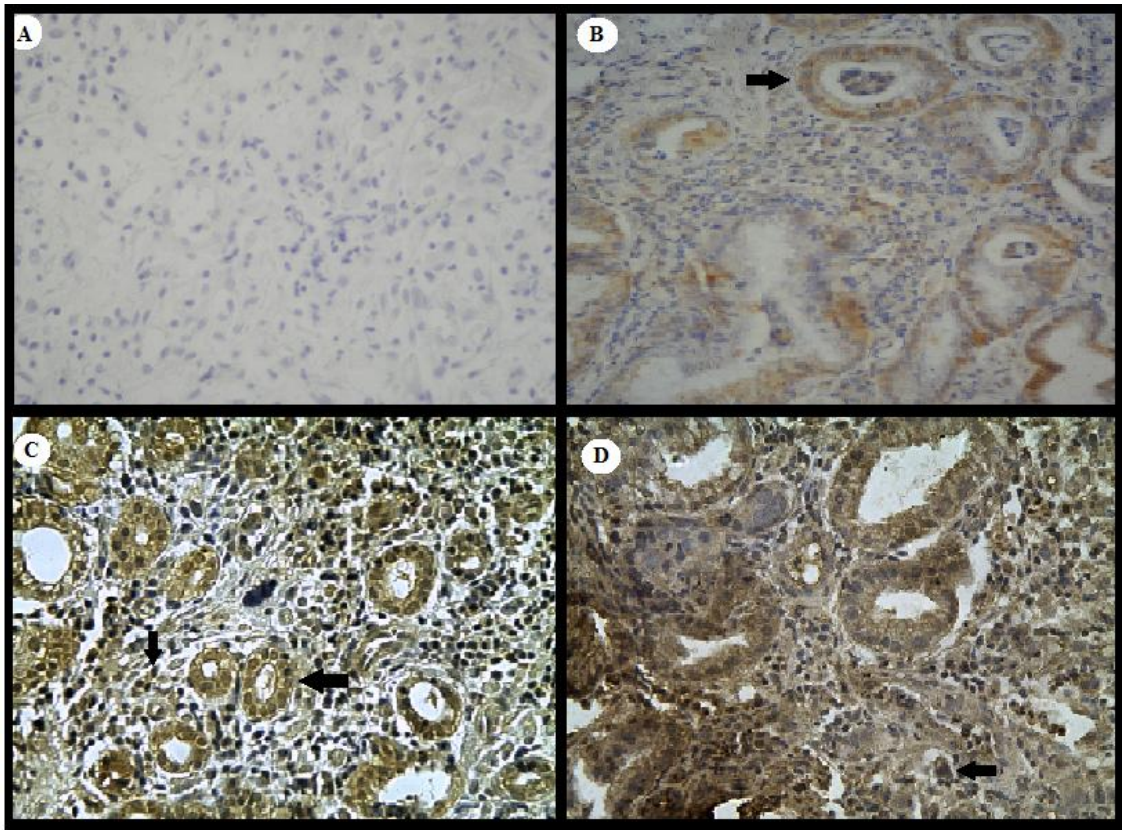


Figura 4. Expressão de HLA-G em biópsias gástricas de pacientes acometidos com a bactéria *H. pylori* utilizando a técnica de imunohistoquímica. **A-** Células da mucosa gástrica normal que não expressam HLA-G (40X). **B e C-** Expressão de HLA-G pelas células glandulares da mucosa gástrica (seta) e linfócitos (seta) em espécimes com úlcera péptica e acometido pela bactéria *H. pylori* (40X). **D-** Expressão de HLA-G pelas células tumorais (seta) da mucosa gástrica de espécimes com adenocarcinoma e acometidos com a bactéria *H. pylori* (40X) (observar a coloração marrom).

Tabela 5 - Expressão de HLA-G na mucosa gástrica

Dados analisados	Úlcera péptica	Carcinoma gástrico	Total
HLA-G positivo	35 (55%)	23 (36%)	58 (91%)
HLA-G negativo	2 (3%)	4 (6%)	6 (9%)
Total	37 (58%)	27 (42%)	64 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes p = 0,4002

Teste Exato de Fisher p = 0,2307

Em seguida, estratificamos a expressão de HLA-G em intensidades no qual (-) significa ausência da expressão de HLA-G, (+) expressão leve, (++) expressão moderada e (+++) expressão acentuada da molécula de HLA-G (Tabela 6).

A Tabela 6 mostra que as variáveis estão significativamente associadas ($p = 0,0041$), ou seja, a intensidade de expressão de HLA-G varia de acordo com a condição clínica. Amostras com úlcera péptica apresentaram um maior número de casos nos níveis moderado e acentuado ao analisar a intensidade de expressão dessa molécula. Com o intuito de confirmar esse padrão de expressão, re-estratificamos as amostras em apenas dois níveis de intensidade de expressão de HLA-G no qual foi utilizado discreto para amostras negativas e com leve intensidade e intenso para amostras com moderada e acentuada expressão de HLA-G (Tabela 7), confirmando os dados anteriormente obtidos (Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes $p = 0,0054$; Teste Exato de Fisher $p = 0,0034$).

Tabela 6 – Intensidade da expressão de HLA-G na mucosa gástrica

Dados analisados	Nº de casos	Expressão HLA-G				P valor
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Úlcera péptica	37	2	5	17	13	0,0041
Carcinoma gástrico	27	4	11	11	1	

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes

Tabela 7 – Intensidade da expressão de HLA-G na mucosa gástrica estratificado em dois grupos

Dados analisados	Úlcera péptica	Carcinoma gástrico	Total
HLA-G Discreto	7 (11%)	15 (23%)	22 (34%)
HLA-G Intenso	30 (47%)	12 (19%)	42 (66%)
Total	37 (58%)	27 (42%)	64 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes p = 0,0054

Teste Exato de Fisher p = 0,0034

De forma geral, a expressão da molécula HLA-G se apresentou elevada, aparecendo em um maior número de biópsias, em epitélios com úlcera péptica, e sua expressão diminuiu conforme aumentou a malignização do tecido, como no caso dos carcinomas gástricos.

4.3. Expressão da molécula HLA-E

Com a finalidade de verificar associação entre expressão da molécula HLA-E e a contribuição desta molécula na indução da tolerância também comparamos

qualitativamente a expressão dessa molécula em biópsias gástricas de pacientes infectados pela bactéria *H. pylori* apresentando úlcera péptica e carcinoma gástrico.

A expressão da molécula HLA-E também não foi observada em espécimes obtidos de indivíduos sem nenhum acometimento gástrico, ou seja, mucosa gástrica normal (Figura 5A).

Dentre as 64 biópsias avaliadas, 55 (86%) apresentaram expressão citoplasmática de HLA-E. Avaliamos o perfil de expressão dessa molécula em biópsias estratificadas em úlcera péptica e carcinoma gástrico. Assim, entre os 37 (58%) espécimes avaliados com úlcera péptica, 33 (52%) expressavam HLA-E. Dentre os 27 (42%) espécimes que apresentavam carcinoma gástrico, 22 (34%) expressavam HLA-E (Tabela 8). A expressão dessa molécula foi predominantemente difusa, no qual, assim como constatado na expressão na molécula de HLA-G, os principais sítios de expressão da molécula de HLA-E foram as células glandulares e linfócitos em ambos os grupos estudados, sendo que, em alguns casos, detectou-se marcação também em células do interstício. Células tumorais e alguns casos de plasmócitos expressaram HLA-E apenas em espécimes com carcinoma gástrico (Figura 5).

Quando aplicamos o Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes e o Teste Exato de Fisher, observamos que não houve significância estatística entre os grupos estudados (Tabela 8).

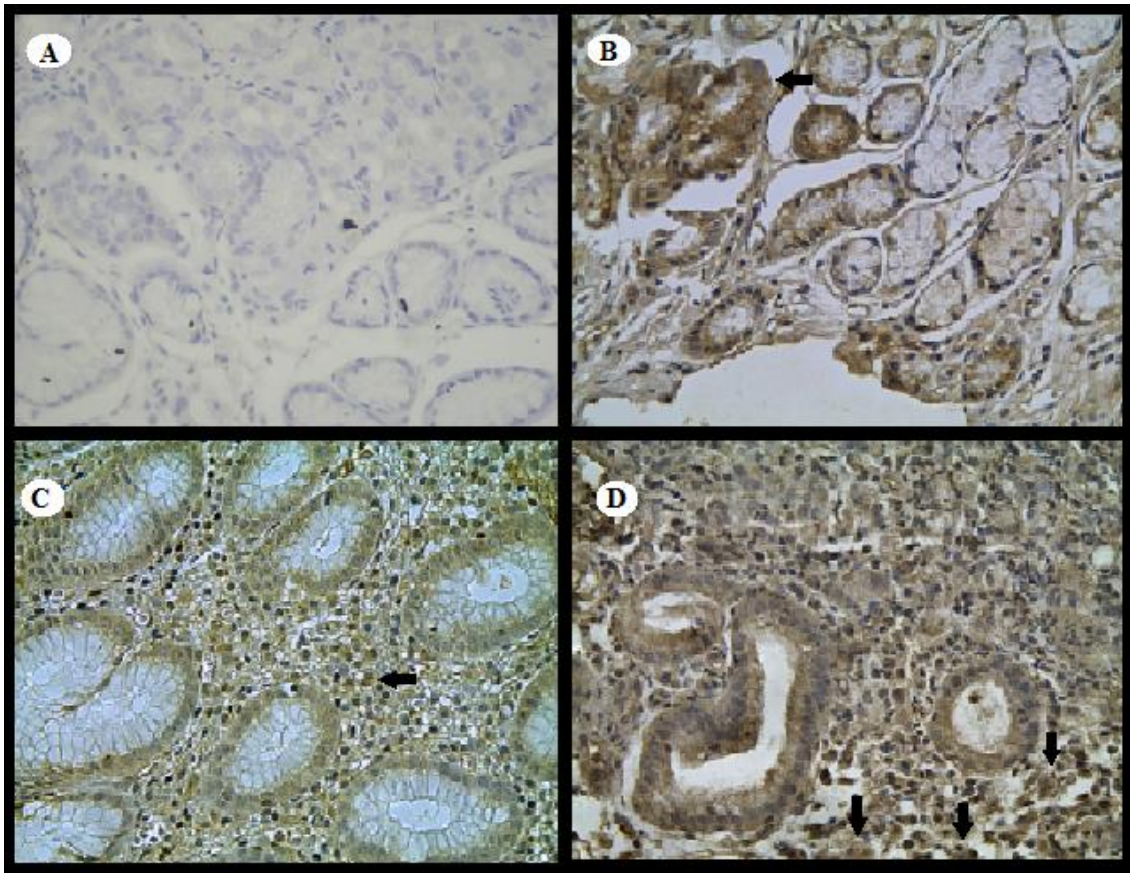


Figura 5. Expressão de HLA-E em biópsias gástricas de pacientes acometidos com a bactéria *H. pylori* utilizando a técnica de imunohistoquímica. **A-** Células da mucosa gástrica normal que não expressam HLA-E (40X). **B-** Expressão de HLA-E pelas células glandulares da mucosa gástrica (seta) de espécimes com úlcera péptica e acometidos pela bactéria *H. pylori*. **C-** Expressão de HLA-E por linfócitos (seta) em espécimes com úlcera péptica e acometidos pela bactéria *H. pylori* (40X). **D-** Expressão de HLA-E pelas células tumorais (seta) da mucosa gástrica de espécimes com adenocarcinoma e acometidos com a bactéria *H. pylori* (40X) (observar a coloração marrom).

Tabela 8 - Expressão de HLA-E na mucosa gástrica

Dados analisados	Úlcera péptica	Carcinoma Gástrico	Total
HLA-E positivo	33 (52%)	22 (34%)	55 (86%)
HLA-E negativo	4 (6%)	5 (8%)	9 (14%)
Total	37 (58%)	27 (42%)	64 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes p = 0,6087

Teste Exato de Fisher p = 0,4753

Assim como realizado com a molécula de HLA-G, também estratificamos a expressão de HLA-E em intensidades no qual (-) significa ausência da expressão de HLA-G, (+) expressão leve, (++) expressão moderada e (+++) expressão acentuada da molécula de HLA-G (Tabela 9).

Ao contrário do que ocorreu com a molécula de HLA-G, a Tabela 9 mostra que as variáveis não estão significativamente associadas com a expressão de HLA-E ($p = 0,5497$), ou seja, a intensidade de expressão de HLA-E não varia de acordo com as condições clínicas estudadas. Para confirmar esse padrão de expressão, re-estratificamos as amostras em apenas dois níveis de intensidade de expressão de HLA-E no qual foi utilizado discreto para amostras negativas e com leve intensidade e intenso para amostras com moderada e acentuada expressão de HLA-G (Tabela 10), confirmando os dados anteriormente obtidos (Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes $p = 0,9553$; Teste Exato de Fisher $p = 0,8017$).

Tabela 9 – Intensidade da expressão de HLA-E na mucosa gástrica

Dados analisados	Nº de casos	Expressão HLA-E				P valor
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Úlcera péptica	37	4	18	15	0	0,5497
Carcinoma gástrico	27	5	10	12	0	

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes

Tabela 10 – Intensidade da expressão de HLA-E na mucosa gástrica estratificado em dois grupos

Dados analisados	Úlcera péptica	Carcinoma Gástrico	Total
HLA-E Discreto	22 (34%)	15 (23%)	37 (58%)
HLA-E Intenso	15 (23%)	12 (19%)	27 (42%)
Total	37 (58%)	27 (42%)	64 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes p = 0,9553

Teste Exato de Fisher p = 0,8017

4.4. Expressão das moléculas HLA-G x HLA-E em biópsias gástricas de pacientes infectados pela bactéria *H. pylori* apresentando úlcera péptica

Análises estatísticas foram feitas com a finalidade de verificar se haveria associação entre expressão de moléculas HLA-G e HLA-E em biópsias gástricas de pacientes infectados pela bactéria *H. pylori* apresentando úlcera péptica. É possível observar que dentre os resultados obtidos não houve nenhuma associação em relação à expressão dessas moléculas (Tabela 11) ou à intensidade dessa expressão (Tabela 12).

Tabela 11 - Expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com úlcera péptica

Dados analisados	HLA-G positivo	HLA-G negativo	Total
HLA-E positivo	31 (84%)	2 (5%)	33 (89%)
HLA-E negativo	4 (11%)	0 (0%)	4 (11%)
Total	35 (95%)	2 (5%)	37 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes p = 0,6127

Teste Exato de Fisher p = 1,0000

Tabela 12 - Intensidade de expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com úlcera péptica

Dados analisados	HLA-G discreto	HLA-G intenso	Total
HLA-E discreto	4 (11%)	18 (49%)	22 (59%)
HLA-E intenso	3 (8%)	12 (32%)	15 (41%)
Total	7 (19%)	30 (81%)	37 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes p = 0,8897

Teste Exato de Fisher p = 1,0000

4.5. Expressão das moléculas HLA-G x HLA-E em biópsias gástricas de pacientes infectados pela bactéria *H. pylori* apresentando carcinoma gástrico

Análises estatísticas também foram feitas com a finalidade de verificar se haveria associação entre expressão de moléculas HLA-G e HLA-E em biópsias gástricas de pacientes infectados pela bactéria *H. pylori* apresentando carcinoma

gástrico. Assim como ocorreu com o grupo de pacientes que apresentavam úlcera péptica, foi observado que dentre os resultados obtidos não houve nenhuma associação em relação à expressão dessas moléculas (Tabela 13) ou à intensidade dessa expressão (Tabela 14).

Tabela 13 - Expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com carcinoma gástrico

Dados analisados	HLA-G positivo	HLA-G negativo	Total
HLA-E positivo	19 (70%)	3 (11%)	22 (81%)
HLA-E negativo	4 (15%)	1 (4%)	5 (19%)
Total	23 (85%)	4 (15%)	27 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes $p = 0,7177$

Teste Exato de Fisher $p = 1,0000$

Tabela 14 - Intensidade de expressão de HLA-G x HLA-E na mucosa gástrica de pacientes com carcinoma gástrico

Dados analisados	HLA-G discreto	HLA-G intenso	Total
HLA-E discreto	9 (33%)	6 (22%)	15 (56%)
HLA-E intenso	6 (22%)	6 (22%)	12 (44%)
Total	15 (56%)	12 (44%)	27 (100%)

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes $p = 0,8966$

Teste Exato de Fisher $p = 0,7068$

4.6. Características demográficas e clínicas estratificadas de acordo com a expressão das moléculas de HLA-G e HLA-E em biópsia gástrica de pacientes acometidos com úlcera péptica

A expressão de HLA-G e HLA-E e diversas variáveis como idade, sexo e região gástrica são relacionadas nas tabelas 15 e 16. Não foi encontrado uma associação entre a região gástrica e estágios avançados de doença. Assim como, nenhuma correlação significativa foi constatada entre a expressão de HLA-G e HLA-E e os parâmetros de idade, sexo e localização histológica.

Tabela 15 – Avaliação da expressão de HLA-G e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com úlcera péptica

Parâmetros Clínico-patológicos	Nº de casos	Expressão de HLA-G				P valor
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Idade						0,6744
≤ Média (46 anos)	21	1	3	8	9	
> Média	16	1	2	9	4	
Sexo						0,7791
Masculino	16	1	2	6	7	
Feminino	21	1	3	11	6	
Localização histológica						0,1103
Fundo	9	0	0	3	6	
Antro	28	2	5	14	7	

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes

Tabela 16 – Avaliação da expressão de HLA-E e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com úlcera péptica

Parâmetros Clínico-patológicos	Nº de casos	Expressão de HLA-E				P valor
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Idade						0,1699
≤ Média (46 anos)	21	2	13	6	0	
> Média	16	2	5	9	0	
Sexo						0,2255
Masculino	16	1	6	9	0	
Feminino	21	3	12	6	0	
Localização histológica						0,8737
Fundo	9	1	5	3	0	
Antro	28	3	13	12	0	

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes

4.7. Características demográficas e clínicas estratificadas de acordo com a expressão das moléculas de HLA-G e HLA-E em biópsia gástrica de pacientes acometidos com carcinoma gástrico

A expressão de HLA-G e HLA-E e diversas variáveis como idade, sexo, região gástrica e tipo histológico são relacionadas nas tabelas 17 e 18. Não foi encontrado uma associação entre a região gástrica, o tipo histológico e estágios avançados de doença. Assim como nenhuma correlação significativa foi constatada entre a expressão de HLA-G e HLA-E e os parâmetros de idade, sexo e localização histológica, seguindo o mesmo padrão do grupo que apresentava apenas úlcera péptica.

Tabela 17 – Avaliação da expressão de HLA-G e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com carcinoma gástrico

Parâmetros Clínico-patológicos	Nº de casos	Expressão de HLA-G				P valor
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Idade						0,4709
≤ Média (62 anos)	11	2	6	3	0	
> Média	16	2	5	8	1	
Sexo						0,7969
Masculino	16	2	7	6	1	
Feminino	11	2	4	5	0	
Localização histológica						0,6540
Fundo	1	0	1	0	0	
Antro	24	3	10	10	1	
Pangastrite	2	1	0	1	0	
Tipo histológico (Lauren, 1965)						0,4347
Adenocarcinoma	17	3	6	8	0	
Carcinoma com células em anel de Sinete	10	1	5	3	1	

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes

Tabela 18 – Avaliação da expressão de HLA-E e parâmetros demográficos e clínico-patológicos de pacientes com carcinoma gástrico

Parâmetros Clínico-patológicos	Nº de casos	Expressão de HLA-E				P valor
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Idade						0,2258
≤ Média (62 anos)	11	3	2	6	0	
> Média	16	2	8	6	0	
Sexo						0,9962
Masculino	16	3	6	7	0	
Feminino	11	2	4	5	0	
Localização histológica						0,2944
Fundo	1	1	0	0	0	
Antro	24	4	9	11	0	
Pangastrite	2	0	1	1	0	
Tipo histológico (Lauren, 1965)						0,4759
Adenocarcinoma	17	3	5	9	0	
Carcinoma com células em anel de Sinete	10	2	5	3	0	

Teste Qui-Quadrado para variáveis independentes

Discussão

5- DISCUSSÃO

Durante os últimos 20 anos, *H. pylori* emergiu como um exemplo importante de um patógeno bacteriano persistente. Esta bactéria coloniza com sucesso o ambiente hostil do estômago humano, e proporciona uma infecção regularmente persistente no hospedeiro por meio de vigorosa e constante adaptação a resposta imune (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004).

Devido às características apresentadas pela bactéria *H. pylori*, estudos sugerem que esta tem desenvolvido uma série de estratégias que lhe permitem manter-se no hospedeiro. Estas incluem mecanismos de evasão da bactéria ao sistema imune, diversidade genética da bactéria, e estilo de vida intracelular (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004).

Diante desse contexto, moléculas regulatórias são produzidas frente à infecção pelos mais diferentes microorganismos que agem tentando modula-la, a fim de que o microorganismo permaneça no hospedeiro. Isso ocorre com as moléculas de classe I não clássicas, como as moléculas de HLA-G e HLA-E, que desempenham um papel no estabelecimento da manutenção da tolerância imunológica através da inibição de funções de células imunocompetentes. Estudos indicam que alguns tecidos expressam HLA-G na tentativa de subverter a resposta imune favorecendo o escape das células tumorais por células NK e linfócito T citotóxico, ou ainda, inibindo o infiltrado das células inflamatórias para o local afetado (ROUAS-FREISS et al., 2005b).

Trabalhos recentes demonstram que a indução da expressão da molécula HLA-G por células infectadas por vírus pode ser um mecanismo adicional e induzido que o ajude a subverter as defesas do hospedeiro, como demonstrou Donaghy et al. (2007) que verificaram que os níveis de HLA-G solúveis são maiores em indivíduos portadores do HIV. Em trabalhos recentes do nosso grupo demonstrou-se que a expressão de HLA-G

modula a infecção pelo vírus da hepatite B em espécimes de fígado humano (SOUTO et al., 2011) e na hepatite C, a expressão de HLA-G está associada a estágios mais leves da doença (CRISPIM et al., 2011). Outros trabalhos têm detectado a expressão de HLA-G em tecido ou cultura de células infectadas com HIV, raiva, herpes simples, HCMV, H1N1 (GAZIT et al., 2007;. LEBOUDEY et al., 2009;. LOZANO et al., 2002;. ONNO et al., 2000). Em relação aos estudos de expressão das moléculas de HLA-G e HLA-E no microambiente gástrico e a associação com a presença da bactéria *H. pylori*, este é o primeiro estudo na literatura.

Em nossa casuística confirmamos a presença da bactéria *H. pylori* pelos métodos indicados na literatura internacional. Todos os pacientes estudados apresentaram RUT positivo e presença da bactéria confirmada através da coloração de Giemsa no microambiente gástrico.

Alguns estudos apontam que a inflamação crônica gástrica induzida pelo *H. pylori* é considerada um processo mediado por um linfócito T helper-1 (Th1), pelo aumento da produção de interferon gama (IFN- γ) e estes fatores estão implicados na perpetuação de intensidades inflamatórias que mediam à doença (NAKANISHI et al., 2001). Adicionalmente, no contexto da inflamação crônica a bactéria *H. pylori* pode dar origem a tecidos linfóides organizados na mucosa gástrica, também chamado de tecido linfóide associado à mucosa (MALT) (ADAM et al., 2008; BARONE et al., 2008).

Estes dados corroboram com nossos achados no qual observamos na avaliação histológica uma intensa atividade inflamatória, metaplasia, hiperplasia foveolar, ulceração, presença de eosinófilos, atipia, alteração de reparo, acúmulo linfóide e folículo linfóide em indivíduos infectados com *H. pylori*. A alteração histológica mais evidente na mucosa gástrica, induzida pela presença do *H. pylori*, é a resposta inflamatória, cuja atividade depende da capacidade de resposta do hospedeiro e da

atividade bacteriana. Nos processos inflamatórios, diferentes fagócitos, tais como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, geram radicais livres em resposta a mediadores pró-inflamatórios e produtos da parede celular bacteriana (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003). Como constatado em nosso estudo, as amostras apresentaram intensa presença de eosinófilo nos achados histológicos.

Estudos tem demonstrado uma relação entre a presença da bactéria e o linfoma de MALT. A presença de anticorpos IgG anti-CagA foram confirmados ser um fator de risco para o desenvolvimento dos folículos linfóides em pacientes com gastrite (ACHYUT et al., 2008; DE LUCA et al., 2008). Em nossa casuística detectamos a formação de acúmulos linfóides e folículos linfóides.

Interações complexas entre o patógeno e os linfócitos e células apresentadoras de antígenos do hospedeiro podem conduzir a resposta imunológica. Postula-se que fatores bacterianos importantes para a sua persistência no organismo ainda não estejam completamente elucidados, podendo este equilíbrio ser influenciado por outras moléculas regulatórias, assim como as células T reguladoras, induzindo a tolerância periférica (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004).

Além disso, a expressão do HLA-G no microambiente pode induzir citocinas polarizando a resposta imune para um padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-10). Este padrão não é eficaz na destruição de patógenos, permitindo a manutenção de bactérias e progressão das lesões (NAKANISHI et al., 2001).

No presente estudo, a molécula HLA-G e HLA-E foram expressas em pacientes infectados com *H. pylori* tanto no grupo de pacientes que apresentavam úlcera péptica quanto nos pacientes que possuíam carcinoma gástrico.

Recentemente autores demonstram que em indivíduos acometidos com adenocarcinoma gástrico a expressão de HLA-G é induzida por citocinas como a IL-10.

Esta citocina está associada com o escape de células tumorais do processo de vigilância imunológica (YIE et al., 2007a). Sabe-se que durante o acometimento gástrico pela bactéria *H. pylori*, as cepas expressando CAG+ são responsáveis por intensa resposta inflamatória, induzindo a produção de IL-8, que aumenta a produção de IL-1 e TNF, que atua para reduzir a acidez do estômago, principalmente em hospedeiros com polimorfismo que favorecem uma alta expressão destas citocinas.

As células tumorais podem criar mecanismos para escapar da resposta imunológica antitumoral. Estas células podem modular a expressão do antígeno, produzindo citocinas imunossupressoras ou por meio da indução de tolerância periférica (SMYTH; DUNN; SCHREIBER, 2006, UROSEVIC; DUMMER, 2008). As células tumorais que perderam as moléculas HLA clássicas que são importantes para o reconhecimento imunológico tendem a expressar a moléculas HLA-G em suas superfícies, induzindo tolerância imunológica (ROUAS-FREISS et al., 2005b). Em condições patológicas, a expressão de HLA-E foi descrito em vários tipos de tumores malignos em linhagens de células in vitro e em células tumorais in vivo (MALMBERG et al., 2002; MARIN et al., 2003; DERRE et al., 2006; BIANCHINI et al., 2006). No nosso estudo, tanto o grupo de pacientes com úlcera péptica como carcinoma gástrico expressaram HLA-G e HLA-E. Nossa hipótese é que essas moléculas estariam criando um ambiente de tolerância imunológica desde a infecção inicial no sentido de conter o processo inflamatório pela bactéria *H. pylori* e conseqüentemente evitar danos ao epitélio gástrico. Por outro lado, pacientes infectados por cepas mais virulentas, possuem um *background* genético e imunológico que favorece o surgimento e progressão de lesões malignas, a expressão de HLA-G e HLA-E nesta situação seria maléfica e o paciente iria evoluir com um pior prognóstico. A alta expressão de HLA-E também foi encontrada em um estudo de perfil cDNA do melanoma em estágio III.

Devido aos altos níveis encontrados de HLA-E está pode vir a ser uma favorável molécula de prognóstico (JOHN et al., 2008).

Pesquisas indicam que a maioria dos HLA de classe I, incluindo HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-DR e HLA-DQ, foram mais altamente expressos nos tumores de bom prognóstico (JOHN et al., 2008; MANDRUZZATO et al., 2006). A expressão de HLA-E na superfície da célula é raramente encontrada em tecidos normais, e tem sido postulado que a sua expressão fornece um mecanismo para que o tumor escape da vigilância imunológica (MALMBERG et al., 2002; SPEISER et al., 1999). Em contradição, um estudo recente documentou haver perda da expressão de HLA-E com a progressão de um tumor primário para uma doença metastática (DERRE et al., 2006).

Um estudo recente sobre glioblastoma mostrou haver uma correlação positiva inesperada entre a expressão de HLA-E por células neoplásicas e o tempo de sobrevivência dos pacientes (Kren et al., 2011). No entanto, a maioria dos relatos descrevem uma sobrevivência curta em várias doenças malignas em que as células neoplásicas expressam moléculas moduladoras imunes (YIE et al., 2007a; YIE et al., 2007b; YIE et al., 2007c; YE et al., 2007; PEREZ-CHACON et al., 2009; NUCKEL et al., 2005; KLEINBERG et al., 2006; JUNG et al., 2009; HE et al., 2010; CAI et al., 2009; BIJEN et al., 2010). Possivelmente, o equilíbrio entre a ativação e inibição das funções de HLA-E podem diferir em tipos histológicos de tumores diferentes (BENEVOLO et al., 2011).

Diante do exposto acima poderíamos fazer a seguinte pergunta: Será que em nosso estudo os pacientes com adenocarcinoma produziram um padrão de citocinas Th2 na fase inicial da infecção pelo *H. pylori*? E conseqüentemente isto poderia favorecer a expressão do HLA-G e do HLA-E? Estudo de seguimento destes pacientes seria interessante no sentido de avaliarmos a cinética de expressão dessas moléculas aplicadas à evolução e progressão.

Com relação aos parâmetros histológicos, alguns estudos apontam haver uma correlação entre a expressão de HLA-G com a agressividade do tumor (CRAWFORD, 1994). Estudos com adenocarcinoma gástricos mostraram haver uma maior expressão de HLA-G em cânceres de cárdia, que tem o pior prognóstico, quando comparado aos cânceres do corpo ou antro gástrico (YIE et al., 2007a; PINTO-DE-SOUSA et al., 2001). Em nosso estudo, houve uma maior prevalência de cânceres de antro gástrico no qual expressaram HLA-G e HLA-E.

Com estes dados, acreditamos que a expressão das moléculas de HLA-G e HLA-E no âmbito do *H. pylori* é um processo complexo, modulado por vários fatores, tais como a natureza polimórfica da população bacteriana, o polimorfismo de HLA-G e HLA-E dos indivíduos estudados, os padrões de expressão das citocinas no microambiente gástrico, que podem contribuir para um ambiente promotor de infecção.

Considerações finais

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a infecção pelo *H. pylori* está associada à expressão das moléculas de HLA-G e HLA-E em células da mucosa gástrica em espécimes com úlcera e carcinoma gástrico. Estes resultados sugerem que essas moléculas podem ser um fator importante durante a infecção como um mecanismo usado pelas bactérias para escapar da vigilância imune, ou ainda para modular o processo inflamatório. Desta forma, estudos posteriores são necessários para que possamos compreender melhor a relação entre a participação das moléculas não clássicas de HLA, fatores genéticos inerentes à cepa colonizadora e ao hospedeiro. Com esses avanços podemos alcançar melhorias significativas no tratamento dos pacientes infectados com *H. pylori* em diferentes etapas da evolução da doença.

Referências bibliográficas

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Tripathi P, Naik S, Agrawal S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet.* 2004 Dec;31(6):275-8.

Achyut BR, Moorchung N, Srivastava AN, Gupta NK, Mittal B. Risk of lymphoid follicle development in patients with chronic antral gastritis: role of endoscopic features, histopathological parameters, CagA status and interleukin-1 gene polymorphisms. *Inflamm Res.* 2008 Feb;57(2):51-6.

Adam P, Schmausser B, Gobel-Kolve M, Muller-Hermelink HK, Eck M. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphomas of MALT type exclusively express Toll-like receptor 4 in contrast to other lymphomas infiltrating the stomach. *Ann Oncol.* 2008 Mar;19(3):566-9.

Adrian Cabestre F, Moreau P, Riteau B, Ibrahim EC, Le Danff C, Dausset J, et al. HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J Reprod Immunol.* 1999 Jul;43(2):183-93.

Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Oct;53(10):904-10.

Allard M, Oger R, Vignard V, Percier JM, Fregni G, Perier A, et al. Serum soluble HLA-E in melanoma: a new potential immune-related marker in cancer. *PLoS One*. 2011;6(6):e21118.

Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):306-23.

Aractingi S, Kanitakis J, Euvrard S, Le Danff C, Carosella ED. Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. *Int J Cancer*. 2003 Aug 20;106(2):232-5.

Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*. 1997 Jun;40(6):701-3.

Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2475-87.

Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal*. 2011 Nov 1;9(1):28.

Backert S, Tegtmeyer N. The Versatility of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin VacA in Signal Transduction and Molecular Crosstalk. *Toxins (Basel)*. 2010 Jan;2(1):69-92.

Barone F, Bombardieri M, Rosado MM, Morgan PR, Challacombe SJ, De Vita S, et al. CXCL13, CCL21, and CXCL12 expression in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and MALT lymphoma: association with reactive and malignant areas of lymphoid organization. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):5130-40.

Bedoya A, Garay J, Sanzon F, Bravo LE, Bravo JC, Correa H, et al. Histopathology of gastritis in *Helicobacter pylori*-infected children from populations at high and low gastric cancer risk. *Hum Pathol*. 2003 Mar;34(3):206-13.

Benevolo M, Mottolose M, Tremante E, Rollo F, Diodoro MG, Ercolani C, et al. High expression of HLA-E in colorectal carcinoma is associated with a favorable prognosis. *J Transl Med*. 2011;9:184.

Bianchini M, Levy E, Zucchini C, Pinski V, Macagno C, De Sanctis P, et al. Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Oncol*. 2006 Jul;29(1):83-94.

Bijen CB, Bantema-Joppe EJ, de Jong RA, Leffers N, Mourits MJ, Eggink HF, et al. The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2010 Mar 15;126(6):1417-27.

Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*. 2004 Feb;113(3):321-33.

Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995 May 15;55(10):2111-5.

Braud VM, Allan DS, Wilson D, McMichael AJ. TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol.* 1998 Jan 1;8(1):1-10.

Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000;22(2):283-97.

Bukur J, Malenica B, Huber C, Seliger B. Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinoma and its association with impaired immune response. *Hum Immunol.* 2003a Nov;64(11):1081-92.

Bukur J, Rebmann V, Grosse-Wilde H, Luboldt H, Ruebben H, Drexler I, et al. Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003b Jul 15;63(14):4107-11.

Bukur J, Seliger B. The role of HLA-G for protection of human renal cell-carcinoma cells from immune-mediated lysis: implications for immunotherapies. *Semin Cancer Biol.* 2003 Oct;13(5):353-9.

Cai MY, Xu YF, Qiu SJ, Ju MJ, Gao Q, Li YW, et al. Human leukocyte antigen-G protein expression is an unfavorable prognostic predictor of hepatocellular carcinoma following curative resection. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 15;15(14):4686-93

Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood.* 2008 May 15;111(10):4862-70.

Carosella ED MP, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol.* 2003;81:199-252.

Chang CC, Murphy SP, Ferrone S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. *Hum Immunol.* 2003 Nov;64(11):1057-63.

Cirulli V, Zalatan J, McMaster M, Prinsen R, Salomon DR, Ricordi C, et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes.* 2006 May;55(5):1214-22.

Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Soullillou JP, Charreau B. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood.* 2007 Apr 1;109(7):2806-14.

Covacci A, Rappuoli R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J Exp Med.* 2000 Feb 21;191(4):587-92.

Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun.* 1990 Mar;58(3):603-10.

Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet.* 1991 Aug 10;338(8763):332-5.

Crawford J. The gastrointestinal tract. In: Robbins SLCR, Kumar V, Schoen FJ, eds. *Pathologic Basis of Disease.* Philadelphia: WB Saunders Co; 1994:755–83.

Crisa L, McMaster MT, Ishii JK, Fisher SJ, Salomon DR. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med.* 1997 Jul 21;186(2):289-98.

Crispim JCO, Silva TG, Souto FJ, Souza FF, Bassi CL, Soares CP, et al. Upregulation of soluble and membrane-bound human leukocyte antigen G expression is primarily observed in the milder histopathological stages of chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol.* 2011 Dec 8.

Davidson B, Elstrand MB, McMaster MT, Berner A, Kurman RJ, Risberg B, et al. HLA-G expression in effusions is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005 Jan;96(1):42-7.

De Luca A, De Falco M, Manente L, Dattilo D, Lucariello A, Esposito V, et al. Helicobacter pylori heat shock protein B (HspB) localizes in vivo in the gastric mucosa and MALT lymphoma. J Cell Physiol. 2008 Jul;216(1):78-82.

Derre L, Corvaisier M, Charreau B, Moreau A, Godefroy E, Moreau-Aubry A, et al. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. J Immunol. 2006 Sep 1;177(5):3100-7.

Donaghy L, Gros F, Amiot L, Mary C, Maillard A, Guiguen C, et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. Clin Exp Immunol. 2007 Feb;147(2):236-40.

Ellis SA, Palmer MS, McMichael AJ. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. J Immunol. 1990 Jan 15;144(2):731-5.

Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. Immunology. 1986 Dec;59(4):595-601.

Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. Mol Microbiol. 2001 Dec;42(5):1337-48.

Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):60-9.

Freire L, Tonelli E. *Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência.* São Paulo: Medsi; 2000.

Gazit R, Garty BZ, Monselise Y, Hoffer V, Finkelstein Y, Markel G, et al. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1965-6.

Gazit E, Sherf M, Balbin E, Muratov A, Goldstein I, Loewenthal R. HLA-G expression is induced in Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines by culture conditions. *Hum Immunol.* 2007 Jun;68(6):463-8.

Geraghty DE. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr Opin Immunol.* 1993 Feb;5(1):3-7.

Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9145-9.

Glynn MK, Friedman CR, Gold BD, Khanna B, Hutwagner L, Iihoshi N, et al. Seroincidence of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. *Clin Infect Dis.* 2002 Nov 1;35(9):1059-65.

Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD. Helicobacter pylori urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology*. 1996 Aug;111(2):419-25.

He X, Dong DD, Yie SM, Yang H, Cao M, Ye SR, et al. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on alloctotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. *Ann Surg Oncol*. 2010 May;17(5):1459-69.

Hold GL, Mukhopadhyaya I, Monie TP. Innate immune sensors and gastrointestinal bacterial infections. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:579650.

Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol*. 2004 May;5(5):516-23.

Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens*. 2002 Aug;60(2):122-32.

Hviid TV. HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth. *Hum Immunol*. 2004 Jun;65(6):586-93.

Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update*. 2006 May-Jun;12(3):209-32.

Ibrahim EC, Aractingi S, Allory Y, Borrini F, Dupuy A, Duvillard P, et al. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer*. 2004 Jan 10;108(2):243-50.

Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M, Mitsuno Y, Imai Y, et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Jan;8(1):181-6.

Ishitani A, Geraghty DE. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 1;89(9):3947-51.

Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H, et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol*. 2003 Aug 1;171(3):1376-84.

Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2000 Jan 1;60(1):184-90.

Jawetz E, Levinson W. Pathogenesis. In: Levinson WE, Jawetz E, editors. *Medical microbiology and immunology*. 3^a ed. East Norwalk: Appleton & Lange; 1994.

John T, Black MA, Toro TT, Leader D, Gedye CA, Davis ID, et al. Predicting clinical outcome through molecular profiling in stage III melanoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 15;14(16):5173-80.

Joosten SA, van Meijgaarden KE, van Weeren PC, Kazi F, Geluk A, Savage ND, et al. Mycobacterium tuberculosis peptides presented by HLA-E molecules are targets for human CD8 T-cells with cytotoxic as well as regulatory activity. *PLoS Pathog.* 2010 Feb;6(2):e1000782.

Jung YW, Kim YT, Kim SW, Kim S, Kim JH, Cho NH, et al. Correlation of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression and disease progression in epithelial ovarian cancer. *Reprod Sci.* 2009 Nov;16(11):1103-11.

King A, Hiby SE, Gardner L, Joseph S, Bowen JM, Verma S, et al. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors--a review. *Placenta.* 2000 Mar-Apr;21 Suppl A:S81-5.

Kleinberg L, Florenes VA, Skrede M, Dong HP, Nielsen S, McMaster MT, et al. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. *Virchows Arch.* 2006 Jul;449(1):31-9.

Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D, Katsinelos P. New aspects of Helicobacter pylori infection involvement in gastric oncogenesis. *J Surg Res.* 2008 May 1;146(1):149-58.

Kren L, Slaby O, Muckova K, Lzicarova E, Sova M, Vybihal V, et al. Expression of immune-modulatory molecules HLA-G and HLA-E by tumor cells in glioblastomas: an unexpected prognostic significance? *Neuropathology*. 2011 Apr;31(2):129-34.

Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopathology of *Helicobacter pylori*. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39.

Larsen MH, Bzorek M, Pass MB, Larsen LG, Nielsen MW, Svendsen SG, et al. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. *Mol Hum Reprod*. 2011 Dec;17(12):727-38.

Lawlor DA, Zemmour J, Ennis PD, Parham P. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:23-63.

LeBouder F, Khoufache K, Menier C, Mandouri Y, Keffous M, Lejal N, et al. Immunosuppressive HLA-G molecule is upregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus infection. *Hum Immunol*. 2009 Dec;70(12):1016-9.

Le Bouteiller P. HLA-G: on the track of immunological functions. *Eur J Immunogenet*. 1997 Oct;24(5):397-408.

Le Bouteiller P, Solier C, Proll J, Aguerre-Girr M, Fournel S, Lenfant F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum Reprod Update*. 1999 May-Jun;5(3):223-33.

Le Discorde M, Moreau P, Sabatier P, Legeais JM, Carosella ED. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol.* 2003 Nov;64(11):1039-44.

Lee N, Malacko AR, Ishitani A, Chen MC, Bajorath J, Marquardt H, et al. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity.* 1995 Nov;3(5):591-600.

Llano M, Lee N, Navarro F, Garcia P, Albar JP, Geraghty DE, et al. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol.* 1998 Sep;28(9):2854-63.

LeMaoult J, Le Discorde M, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, McCluskey J, et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens.* 2003 Oct;62(4):273-84.

Le Rond S, Azema C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3266-76.

Lila N, Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet.* 2000 Jun 17;355(9221):2138.

Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN, et al. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation*. 2002 Apr 23;105(16):1949-54.

Loke YW, King A. Recent developments in the human maternal-fetal immune interaction. *Curr Opin Immunol*. 1991 Oct;3(5):762-6.

Lo Monaco E, Tremante E, Cerboni C, Melucci E, Sibilio L, Zingoni A, et al. Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells. *Neoplasia*. 2011 Sep;13(9):822-30.

Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS*. 2002 Feb 15;16(3):347-51.

Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 2002 Jul 26;297(5581):573-8.

Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, de Matos CT, Carlsten M, Schedvins K, et al. IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(10):1515-23.

Mandruzzato S, Callegaro A, Turcatel G, Francescato S, Montesco MC, Chiarion-Sileni V, et al. A gene expression signature associated with survival in metastatic melanoma. *J Transl Med.* 2006;4:50.

Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Mendez R, Jimenez P, Geraghty DE, et al. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics.* 2003 Feb;54(11):767-75.

Marincola FM, Wang E, Herlyn M, Seliger B, Ferrone S. Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. *Trends Immunol.* 2003 Jun;24(6):335-42.

Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens.* 2010 Apr;75(4):291-455.

Marshall B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med.* 2002 Mar-Apr;2(2):147-52.

McGee DJ, Mobley HL. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;241:155-80.

Menier C, Rabreau M, Challier JC, Le Discorde M, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood.* 2004 Nov 15;104(10):3153-60.

Misiewicz JJ. Current insights in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995 Jul;7(7):701-3.

Misiewicz JJ. The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991 May-Jun;6(3):207-8.

Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung HP, et al. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2005 Feb;159(1-2):155-64.

Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Micro*. [10.1038/nrmicro955]. 2004;2(9):747-65.

Muller A, Oertli M, Arnold IC. *H. pylori* exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. *Cell Commun Signal*. 2011;9(1):25.

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

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:423-74.

Nuckel H, Rebmann V, Durig J, Duhrsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1694-8.

Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet*. 2003 Jun;72(6):1425-35.

Onno M, Pangault C, Le Fric G, Guilloux V, Andre P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6426-34.

Panoutsakopoulou V, Huster KM, McCarty N, Feinberg E, Wang R, Wucherpfennig KW, et al. Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(8):1218-24.

Parham P. Immunology: keeping mother at bay. *Curr Biol*. 1996 Jun 1;6(6):638-41.

Paul P, Cabestre FA, Le Gal FA, Khalil-Daher I, Le Danff C, Schmid M, et al. Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res*. 1999 Apr 15;59(8):1954-60.

Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4510-5.

Peek RM, Jr., Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*. 1995 Dec;73(6):760-70.

Perez-Chacon G, Rosado S, Rebolleda N, Losada-Fernandez I, Vargas JA, Morado M, et al. Prognostic irrelevance of HLA-G in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2009 Jun;31(3):327-37.

Perez-Perez GI, Sack RB, Reid R, Santosham M, Croll J, Blaser MJ. Transient and persistent *Helicobacter pylori* colonization in Native American children. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2401-7.

Pinto-De-Sousa J, David L, Seixas M, Pimenta A. Clinicopathologic profiles and prognosis of gastric carcinomas from the cardia, fundus/body and antrum. *Dig Surg*. 2001;18(2):102-10.

Polk DB, Peek RM, Jr. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jun;10(6):403-14.

Posch PE, Borrego F, Brooks AG, Coligan JE. HLA-E is the ligand for the natural killer cell CD94/NKG2 receptors. *J Biomed Sci*. 1998 Sep-Oct;5(5):321-31.

Pyo CW, Williams LM, Moore Y, Hyodo H, Li SS, Zhao LP, et al. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. *Immunogenetics*. 2006 May;58(4):241-51.

Rad R, Brenner L, Krug A, Volland P, Mages J, Lang R, et al. Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):150-63 e3.

Radosz-Komoniewska H, Bek T, Jozwiak J, Martirosian G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Aug;11(8):602-10.

Roma-Giannikou E, Karameris A, Balatsos B, Panayiotou J, Manika Z, Van-Vliet C, et al. Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori*: a genetic analysis. *Helicobacter*. 2003 Feb;8(1):15-20.

Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 14;94(21):11520-5.

Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol*. 2003 Oct;13(5):325-36.

Rouas-Freiss N, Bruel S, Menier C, Marcou C, Moreau P, Carosella ED. Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. *Int J Cancer*. 2005a Oct 20;117(1):114-22.

Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 2005b Nov 15;65(22):10139-44.

Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(9):1218-21.

Schulte D, Vogel M, Langhans B, Kramer B, Korner C, Nischalke HD, et al. The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200(9):1397-401.

Sebti Y, Le Friec G, Pangault C, Gros F, Drenou B, Guilloux V, et al. Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol.* 2003 Nov;64(11):1093-101.

Sepulveda AR. Molecular testing of *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions: clinical implications. *J Clin Gastroenterol.* 2001 May-Jun;32(5):377-82.

Shi R, Xu S, Zhang H, Ding Y, Sun G, Huang X, et al. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. *Helicobacter.* 2008 Apr;13(2):157-65.

Shih Ie M, Davidson B. Pathogenesis of ovarian cancer: clues from selected overexpressed genes. *Future Oncol.* 2009 Dec;5(10):1641-57.

Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8856-61.

Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res.* 2003 Oct 1;9(12):4460-4.

Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006;90:1-50.

Souto FJ, Crispim JC, Ferreira SC, da Silva AS, Bassi CL, Soares CP, et al. Liver HLA-G expression is associated with multiple clinical and histopathological forms of chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat.* 2011 Feb;18(2):102-5.

Speiser DE, Pittet MJ, Valmori D, Dunbar R, Rimoldi D, Lienard D, et al. In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1999 Sep 20;190(6):775-82.

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 2002 Oct 10;347(15):1175-86.

Sullivan LC, Hoare HL, McCluskey J, Rossjohn J, Brooks AG. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2006 Sep;27(9):413-20.

Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J.* 2011 Apr;278(8):1190-202.

Thibodeau V, Lajoie J, Labbe AC, Zannou MD, Fowke KR, Alary M, et al. High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PLoS One.* 2011;6(9):e25185.

Torres MI, Le Discorde M, Lorite P, Rios A, Gassull MA, Gil A, et al. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol.* 2004 Apr;16(4):579-83.

Urosevic M, Kurrer MO, Kamarashev J, Mueller B, Weder W, Burg G, et al. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):817-24.

Urosevic M, Dummer R. Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):627-30.

Voland P, Weeks DL, Marcus EA, Prinz C, Sachs G, Scott D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Jan;284(1):G96-G106.

Wang Y, Ye Z, Meng XQ, Zheng SS. Expression of HLA-G in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2011 Apr;10(2):158-63.

Wei XH, Orr HT. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol*. 1990 Oct;29(2):131-42.

Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Bornemann A, Meyermann R, et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4772-80.

Wiendl H, Mitsdoerffer M, Weller M. Express and protect yourself: the potential role of HLA-G on muscle cells and in inflammatory myopathies. *Hum Immunol*. 2003 Nov;64(11):1050-6.

Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):288-308.

Wroblewski LE, Peek RM, Jr. Targeted disruption of the epithelial-barrier by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal*. 2011 Nov 1;9(1):29.

Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology*. 1996 Jun;110(6):1744-52.

Ye SR, Yang H, Li K, Dong DD, Lin XM, Yie SM. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2007 Mar;20(3):375-83.

Yie SM YH, Ye SR, Li K, Dong DD, Lin XM Expression of human leucocyte antigen G (HLA-G) correlates with poor prognosis in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007a;14(10):2721-9.

Yie SM, Yang H, Ye SR, Li K, Dong DD, Lin XM. Expression of HLA-G is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2007b Dec;128(6):1002-9.

Yie SM, Yang H, Ye SR, Li K, Dong DD, Lin XM. Expression of human leucocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007c Nov;58(2):267-74.

Zaterka S, Eisig JN, Chinzon D, Rothstein W. Factors related to Helicobacter pylori prevalence in an adult population in Brazil. *Helicobacter*. 2007 Feb;12(1):82-8.

Anexo