

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**Estratégias no desenvolvimento de vacinas contra**

***Helicobacter pylori***

**Loyce Ivana Pereira Almeida Duarte**

**Monografia orientada pela Professora Doutora Lídia Maria**

**Diogo Gonçalves, Investigadora Principal**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2021**



**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**Estratégias no desenvolvimento de vacinas contra**  
*Helicobacter pylori*

**Loyce Ivana Pereira Almeida Duarte**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**  
**apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Monografia orientada pela Professora Doutora Lúcia Maria Diogo**  
**Gonçalves, Investigadora Principal**

**2021**

## Resumo

A presente monografia foi elaborada com o intuito de rever os conhecimentos sobre a bactéria *Helicobacter pylori* de uma forma geral, realçando as principais estratégias que têm sido aplicadas no desenvolvimento de uma vacina capaz de a erradicar.

O adenocarcinoma gástrico é a terceira principal causa de morte provocado por cancro a nível mundial, com maior incidência nos países em vias de desenvolvimento. A maioria destes cancros estão associados à infecção por *H. pylori*. Este microrganismo origina uma resposta imune muito intensa por parte do hospedeiro, recorrendo ao seu mecanismo fisiopatológico, desencadeando uma série de patologias gástricas, sendo a mais grave o cancro.

O tratamento recomendado atualmente compreende o uso de terapêutica combinada de vários antibióticos com inibidores da bomba de prótons. Todavia, uma vez que inúmeros doentes submetidos à terapêutica, não demonstram sucesso no combate à doença, este é considerado um tratamento de difícil execução.

Assim, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina capaz de erradicar esta bactéria, constituindo assim uma ferramenta poderosa na prevenção do cancro gástrico. Com base nesta necessidade, várias iniciativas de desenvolvimento de vacinas vão surgindo, focando-se na descoberta de antígenos e adjuvantes capazes de induzir uma resposta imunitária mais potente, bem como da via de administração mais adequada. Estes estudos mostram que a vacina pode ser profilática, e usada como terapêutica após infecção. Apesar dos inúmeros ensaios clínicos que têm sido desenvolvidos, não existe no mercado nenhuma vacina aprovada. Contudo, uma vacina promissora chegou à fase III dos ensaios clínicos. No entanto, foi descontinuada posteriormente, tornando-se assim a abordagem mais próxima de chegar ao mercado.

Apesar de ser uma patologia de alcance global, o desenvolvimento de uma vacina contra *H. pylori* tem sido efetuado até agora por pequenos laboratórios, mostrando a necessidade de um grande investimento por parte das principais empresas farmacêuticas, com o objetivo de possibilitar a realização de ensaios clínicos mais satisfatórios e conclusivos.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*; Vacina; CagA; VacA; Urease

## Abstract

The present monograph has been prepared to provide knowledge about the *Helicobacter pylori* bacteria in a general way, highlighting the main strategies that have been applied in the development of an efficacy vaccine.

Gastric adenocarcinoma is the third leading cause of cancer death worldwide, with the highest incidence in developing countries. Most of these cancers are associated to the gastric infection by *H. pylori*. This microorganism triggers a very intense immune response by the host, using its pathophysiological mechanism, triggering a series of gastric pathologies, the most serious being cancer.

The treatment currently recommended comprises the use of antibiotics simultaneously with proton pump inhibitors. However, since many patients submitted to therapy do not show success in combating the disease, this is considered a difficult treatment to perform.

Therefore, the development of a vaccine capable of eradicating this bacterial infection becomes of extreme importance, thus constituting a powerful tool in the prevention of gastric cancer. Based on this need, several vaccine development initiatives are emerging, focusing mainly on the discovery of the best antigens and adjuvants capable of promoting a more potent immune response, as well as the most appropriate route of administration. These studies show that the vaccine can be prophylactic, as well as used as therapeutic after infection. Despite the numerous clinical trials that have been developed, no vaccine is currently on the market. However, one promising vaccine has reached phase III of clinical trials. However, it has been discontinued, making it the closest approach to reaching the market so far.

Although it is a global pathology, the development of a vaccine against *H. pylori* vaccine has so far been carried out by small laboratories, showing the need for a large investment by major pharmaceutical companies to enable more satisfactory and conclusive clinical trials.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*; Vaccine; CagA; VacA; Urease

## Agradecimentos

Um trabalho desta envergadura, pelo seu grau de exigência e de ansiedade, não pode ser feito sem a colaboração e a solidariedade de várias pessoas, que a despeito das suas ocupações, mostraram-se sempre disponíveis.

Em primeiro lugar, um agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Lídia Maria Diogo Gonçalves, que sempre se mostrou disponível, respondendo com sugestões e críticas pertinentes, que contribuíram para o enriquecimento do meu trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão que, embora ausentes, sempre estiveram presentes apoiando-me com palavras de conforto e fortalecimentos e nunca se esqueceram de mim nas suas orações.

Aos meus tios José António e Raquel, a D. Marcelina e aos meus primos, Josué, Vivi, Gerson que sempre me apoiaram nestes anos de luta e em especial a minha prima Cátia que esteve sempre presente e ajudou-me num momento especialmente difícil.

Ao meu namorado Fábio por ter estado sempre ao meu lado nos bons e maus momentos e ter-me suportado principalmente quando a vontade de desistir era enorme.

Aos meus tios de coração Fernando e Liliana e aos primos também de coração, André e Nicole que sempre me confortaram e ajudaram.

A doutora Sara Ferreira que me ajudou a superar muitas barreiras e atingir os meus objetivos.

As tias Diara e Inisia que prontamente disponibilizaram a ler e a comentar o meu trabalho.

A Deus, um muito obrigada por tudo. (*Josué 1:9*)

## Abreviatura

CagA – do inglês cytotoxin-associated antigen A

CT – do inglês cholera toxin

ELISA – do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FISH – do inglês Fluorescent In Situ Hybridization

GALT – do inglês Gut-Associated Lymphoid Tissue

*H. pylori* – *Helicobacter Pylori*

IL - Interleucina

LT – Enterotoxina termolábil de *E. coli*

MALT – do inglês Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

MHC - do inglês Major Histocompatibility Molecules

PCR – do inglês Polymerase Chain Reaction

RUT – do inglês rapid urease test

UBT – do inglês Urease Breath Test

UreA – subunidade A da urease

UreB – subunidade B da urease

VacA – do inglês vacuolating cytotoxin A

# Índice

Resumo.....	4
Abstract .....	5
Agradecimentos.....	6
Abreviatura.....	7
Índice de Figuras .....	10
Índice de Tabelas.....	10
1.Introdução.....	11
2.Objetivos .....	11
3.Materiais e Métodos .....	12
4.Helicobacter Pylori.....	13
4.1 Caracterização .....	13
4.2 Epidemiologia.....	14
4.2.1 Prevalência Mundial .....	14
4.2.2 Modo de Infecção .....	15
4.3 Vias de Transmissão.....	16
4.3.1 Transmissão Gastro Oral .....	16
4.3.2 Transmissão Oral – Oral.....	17
4.3.3 Transmissão Fecal – Oral .....	17
4.3.4 Transmissão por Água .....	17
4.3.5 Transmissão por alimentos .....	18
4.4 Métodos de Diagnóstico da Infecção por H. pylori .....	18
4.4.1 Métodos Invasivos .....	18
4.4.2 Métodos Não Invasivos .....	19
4.5 Linhas de Tratamento .....	20
4.5.1 Vantagens e Desvantagens das Linhas de Tratamento Usadas Atualmente.....	21

4.6 Probióticos .....	22
5. Vacinas contra H. Pylori .....	23
5.1 Tipos de Vacina .....	24
5.1.1 Vacinas Atenuantes .....	24
5.1.2 Vacinas Inativas .....	24
5.1.3 Vacinas de Subunidades .....	25
5.1.4 Vacinas de Vetores Recombinantes .....	25
5.1.5 Vacinas Baseadas em Ácidos Nucleicos .....	25
5.1.6 Vacinas Toxoides .....	25
5.2 Vias de Administração .....	26
5.2.1 Via Oral .....	27
5.2.2 Via Intramuscular .....	27
6. Seleção de Antígenos para Vacina contra H. Pylori .....	28
6.1 VacA .....	28
6.2 Urease .....	30
6.3 Adjuvantes .....	31
7. Modelos Animais .....	32
7.1 Ratos e outros roedores .....	33
7.2 Porcos Gnotobióticos .....	33
7.3 Primatas .....	33
7.4 Caninos e Felinos .....	33
8. Vacinas construídas contra H. pylori .....	35
8.1 Vacinas inativadas de bactérias de células inteiras .....	35
8.2 Vacinas enzimáticas catalases recombinantes .....	36
8.3 Vacinas recombinantes de urease .....	36
8.4 Vacinas recombinantes de proteínas CagA e VacA .....	37
8.5 Situação atual dos ensaios clínicos de potenciais candidatos a vacina .....	38

8.6 Estratégias de design para uma nova geração de vacinas candidatas contra <i>H. pylori</i> .....	39
9.Discussão.....	41
10.Conclusão .....	43
11.Referencias Bibliográficas .....	44

## Índice de Figuras

Figura 1 - Mapa da prevalência global de <i>H. pylori</i> .....	14
Figura 2 - Mecanismo de colonização de <i>H. pylori</i> .....	14
Figura 3 - Diferentes tipos de vacina .....	21
Figura 4 - Estrutura do gene VacA.....	26

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Regime de primeira linha no tratamento da infecção por <i>H. pylori</i> .....	21
Tabela 2 - Efeitos adversos comuns da terapia de erradicação de <i>H. pylori</i> .....	21
Tabela 3 - Antígenos mais promissores para uma vacina contra <i>H. pylori</i> .....	30
Tabela 4 - Tabela com as principais vantagens e desvantagens dos modelos animais...35	
Tabela 5 - Lista de Vacinas recombinantes baseados em enzimas de catalase.....	36
Tabela 6 - Lista de Vacinas Recombinantes Baseadas na Enzima Urease. ....	37
Tabela 7 - Lista de vacinas recombinantes baseadas nas proteínas CagA e/ou VacA. 37	
Tabela 8 - Vacinas candidatas em estudo de ensaios clínicos.....	38

## 1. Introdução

*H. pylori* consiste num importante patógeno humano que infeta cerca de 50% da população humana. Esta bactéria tem a capacidade de colonizar a mucosa gástrica humana, um ambiente ácido inerentemente inóspito, e persiste nesse nicho por muitas décadas, apesar do desenvolvimento da resposta imune e inflamatória do hospedeiro. É um dos principais agentes etiológicos para uma ampla gama de doenças gástricas, como úlceras pépticas, gastrite superficial, gastrite atrófica, dispepsia, adenocarcinoma gástrico, linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (1).

Este microrganismo foi classificado como um agente carcinogéneo do Grupo I pela Organização Mundial de Saúde, sendo uma das principais causas relacionada com a morte por cancro no mundo (1).

A terapêutica usada atualmente baseia-se na combinação de antibióticos. Contudo, esta estratégia tem muitos inconvenientes, incluindo falha terapêutica devido ao surgimento de resistência bacteriana, má adesão do paciente, elevado custo do tratamento, e o mais crucial, falha em prevenir a reinfeção (2).

Das circunstâncias acima descritas surge a necessidade de desenvolver uma terapêutica eficaz a nível mundial a fim de prevenir ou tratar a infeção provocada pelo *H. pylori*.

## 2. Objetivos

Esta monografia tem como objetivo conhecer as principais estratégias aplicadas no desenvolvimento de vacinas capazes de erradicar *H. pylori*, debruçando-se nos ensaios clínicos realizados e a respetiva resposta imune desencadeada no organismo do hospedeiro.

### 3. Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho, foi feito um estudo inicial de vários artigos científicos, originários de uma pesquisa de definições, etiologia, procedimentos e estudos relacionados a *H. pylori*.

Os motores de busca usados para procura de material foram o PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), o Google Scholar (<https://scholar.google.pt/>), e o Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>).

Os artigos foram selecionados baseados no ano de publicação, optando-se por artigos publicados a partir dos anos 2000, de modo a obter informações atualizadas a fim de perceber e superar algumas barreiras encontradas ao longo dos anos pelos cientistas.

As referências bibliográficas foram elaboradas com o auxílio da ferramenta Mendeley Desktop, de acordo com as normas do formato Vancouver.

## 4. *Helicobacter Pylori*

### 4.1 Caracterização

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa, microaerofílica, que apresenta uma morfologia espiral e flagelada. Na maioria dos casos, estas bactérias são positivas para catalase e a oxidase. Possui uma grande habilidade para colonizar a mucosa gástrica humana, um ambiente ácido profundamente inabitável, persistindo no mesmo por décadas, apesar do desenvolvimento da resposta imune e inflamatória do hospedeiro (1).

A *Helicobacter* é um género de bactéria integrante da subdivisão  $\epsilon$  das *Proteobacteria*, ordem *Campylobacterales*, família *Helicobacteraceae*, constituída por mais de 20 espécies reconhecidas e por várias outras que aguardam reconhecimento formal (3).

A informação de que esta bactéria causa gastrite e úlcera gástrica é conhecida há mais de 100 anos, quando Walery Jaworski a descreveu pela primeira vez. No entanto, a sua identificação precisa só ocorreu em 1982, quando Barry Marshall e Robin Warren a isolaram a partir de biópsias obtidas de pacientes infetados. Inicialmente foi denominada *Campilobacter Pylori*, porém, através de características genéticas específicas foi classificado como um novo género e chamado de *H. pylori* (4).

Diagnosticada através da presença de enzimas específicas, nomeadamente a oxidase, catalase e urease, é considerado um importante agente etiológico para uma ampla gama de doenças gástricas tais como, úlceras pépticas e duodenais, cancro gástrico, gastrite atrófica, dispepsia, adenocarcinoma gástrico e linfoma associado à mucosa (1). O cancro gástrico é a consequência mais grave e a principal razão para o desenvolvimento de uma vacina uma vez que é a 3ª principal causa de mortes relacionadas ao cancro a nível mundial, sendo classificado como carcinogénico de classe 1 pela OMS (5).

## 4.2 Epidemiologia

### 4.2.1 Prevalência Mundial

A infecção por *H. pylori* continua a ser um dos maiores problemas de saúde a nível mundial. Estima-se que em 2015, cerca de 4.4 bilhões de indivíduos testaram positivo para esta infecção. Estudos recentes demonstram uma grande variação na prevalência da infecção entre países. A região com maior prevalência é a África (79.1%), seguida pela América Latina e Caribe (63.4%), e a Ásia (54.7%). No entanto, a prevalência é menor na América do Norte (37.1%) e Oceânia (24.4%). O nível de urbanização, saneamento, acesso a água potável e a variedade do *status* socioeconómico é apontado como principal causa para a diferença da distribuição da doença (6). Na figura 1 podemos observar a prevalência da infecção por *H. pylori* nas diferentes regiões do mundo.

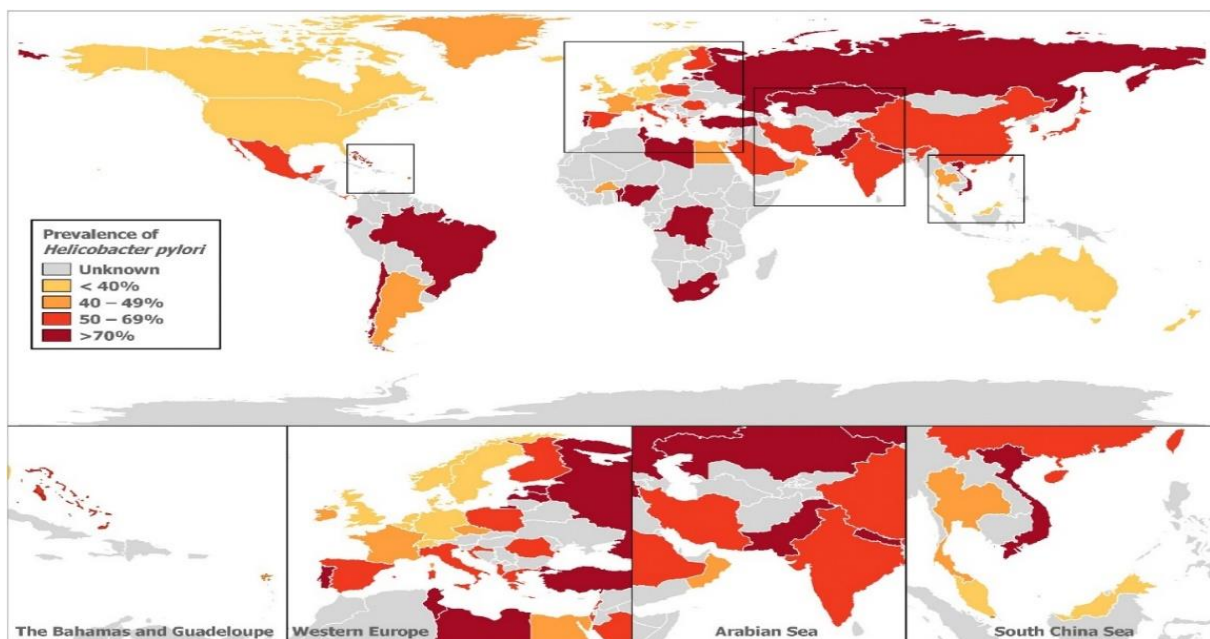


Figura 1 – Mapa da prevalência global de *H. pylori*, que pode ser encontrado no seguinte URL:  
<https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html>

#### 4.2.2 Modo de Infecção

A acidez, os movimentos peristálticos, a indisponibilidade de nutrientes e a ação do sistema imunitário inato e adaptativo dificultam a colonização do estômago por parte das bactérias. Porém, a *H. pylori* tem capacidade elevada de se adaptar a esse ambiente devido a inúmeros mecanismos e fatores que garantem a sua permanência, nomeadamente enzimas, adesinas e a sua morfologia (7).

A morfologia é responsável pela mobilidade e penetração na mucosa gástrica, permitindo-lhe alcançar o epitélio gástrico. Durante o seu trajeto até à mucosa, a bactéria gera duas enzimas, a mucinase e cologenase, que diminuem a viscosidade da mucosa, auxiliando o seu movimento(8), exemplificado na figura 2(A).

Para neutralizar o ambiente ácido, a bactéria produz a urease, uma enzima que catalisa a hidrólise de ureia em dióxido de carbono e amónia, proporcionando um ambiente neutro (7). Mecanismo esquematizado na figura 2(B).

*H. pylori* é ainda munida de várias adesinas na sua superfície que facilitam a adesão desta ao epitélio gástrico, promovendo a sua resistência perante os movimentos peristálticos e induzindo falhas no tecido epitelial, levando ao desbloqueio de nutrientes por parte das células danificadas, para uso da bactéria (7,9).

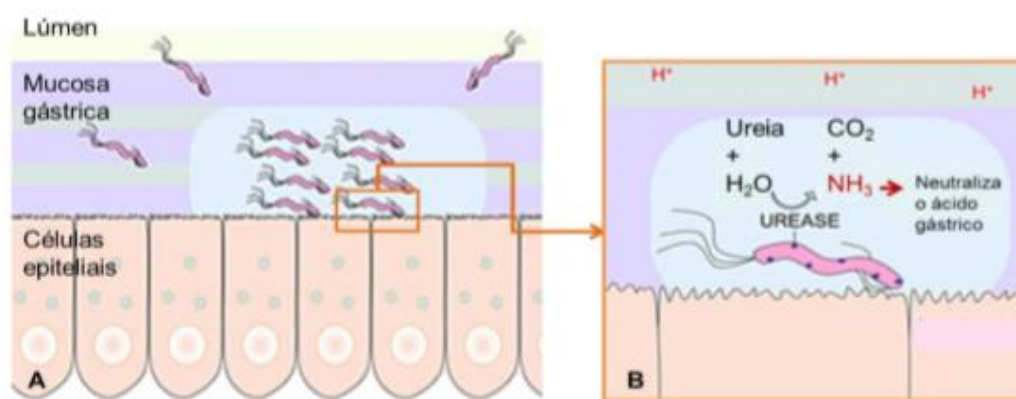


Figura 2 - Mecanismo de colonização da *H. pylori* na mucosa gástrica evidenciando a relevância da urease; A) Percurso executado pela *H. pylori* desde o lúmen do estômago até à sua aderência às células epiteliais na mucosa gástrica; B) A *H. pylori* expressa a proteína urease que catalisa a neutralização do ácido gástrico (H<sup>+</sup>), através a hidrólise da ureia em CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>, permitindo assim a sobrevivência da bactéria. Adaptado de (9)

### 4.3 Vias de Transmissão

A via de transmissão desta bactéria ainda não se encontra totalmente clarificada. O único reservatório conhecido é o estômago humano e, como a *H. pylori* aparenta ter uma estreita gama de hospedeiros, considera-se que as novas infecções sucedem como consequência da transmissão direta de homem para homem ou contaminação ambiental. A transmissão entre pessoas pode ser subdividida em dois modos principais: vertical e horizontal (10).

O modo vertical é caracterizado pela propagação do ascendente para o descendente na mesma família, ao passo que a transmissão no modo horizontal envolve contacto com indivíduos fora da família ou contaminação ambiental (10).

Alguns estudos destacam a relação entre a infecção e a exposição familiar, nos quais a maioria apoia o conceito de agrupamento intrafamiliar da infecção por *H. pylori*, sugerindo que a transmissão entre pessoas da mesma família, ocorre possivelmente por contactos interpessoais íntimos, partilha de uma predisposição genética à infecção, exposição a uma fonte de contágio comum e por partilharem um mesmo *status* socioeconómico (11).

A transmissão entre pessoas pode ocorrer por três vias distintas: via gastro oral, oral-oral e fecal-oral. Contudo não foi ainda identificado nenhum mecanismo predominante de transmissão (10).

#### 4.3.1 Transmissão Gastro Oral

O principal veículo de transmissão nesta via seria, provavelmente, o suco gástrico, principalmente como resultado do vômito na infância, uma vez que *H. pylori* é contraído no início da vida. Alguns estudos relataram a percentagem da bactéria presente no suco gástrico de pacientes sintomáticos. *H. pylori* aparenta sobreviver fora do corpo humano, no suco gástrico sem tampão e geralmente presente no vômito em grandes quantidades. Estes resultados apoiam a transmissão gastro oral, principalmente durante a infância, associada a más condições de higiene (12).

#### 4.3.2 Transmissão Oral – Oral

A saliva é outra possível fonte de transmissão de *H. pylori*, visto que o microbioma gástrico pode alcançar e colonizar a boca após regurgitação ou vômito (13).

*H. pylori* foi cultivado diretamente da saliva, e o seu DNA tem sido frequentemente amplificado a partir da saliva, biofilme subgengival e placa dentária. Com base nestas descrições, a boca pode ser considerada um reservatório desta bactéria. A transmissão oral-oral envolve principalmente a transmissão mãe-filho. As secreções orais da mãe podem estar contaminadas e, como consequência contaminar diretamente o bebê (13).

Estes dados sugerem que, embora a saliva possa funcionar como veículo de propagação, a transmissão oral-oral não é a principal modalidade de contágio de *H. pylori*, pelo menos em adultos (14).

#### 4.3.3 Transmissão Fecal – Oral

O DNA da *H. pylori* tem sido frequentemente detetado em fezes humanas. Contudo, as tentativas de cultivar esta bactéria a partir das fezes tiveram um sucesso insuficiente, uma vez que esta persiste maioritariamente no local na forma não cultivável (15).

#### 4.3.4 Transmissão por Água

A forma precisa pela qual *H. pylori* obtém acesso ao estômago humano permanece desconhecida. Quando as condições higiênicas são inadequadas, a contaminação doméstica da água potável não pode ser descartada (16).

Alguns autores acreditam que a água desempenha um papel crucial como reservatório humano, assim como meio de transmissão fecal-oral da infecção (16).

Conseguiram demonstrar que crianças morando em casas com abastecimento de água externa, ou que consomem verduras cruas, geralmente irrigadas com água de esgoto não tratada, apresentam maior prevalência da infecção (16).

A associação de soros contendo anticorpos contra *H. pylori*, juntamente com soros contendo anticorpos contra outros dois agentes patogênicos aquáticos (vírus da Hepatite A) e Giardia, sugerem que a infecção pode ser transmitida pela água ou relacionada com más condições higiênicas (17).

#### 4.3.5 Transmissão por alimentos

Tal como acontece com a água, os produtos alimentícios também podem ser contaminados ao serem manuseados em más condições de higiene. Diversos estudos falam do papel dos alimentos na transmissão da *H. pylori*. Os alimentos analisados foram principalmente o leite, a carne e os vegetais. Entre estes, os produtos lácteos são os mais estudados, provavelmente devido ao fato da infecção ser adquirida principalmente na infância, sendo o leite o principal alimento consumido durante esse período (18).

### 4.4 Métodos de Diagnóstico da Infecção por *H. pylori*

Existem inúmeras técnicas possíveis para identificar o surgimento da infecção pela *H. pylori*, sendo essas descritas como invasivos ou não invasivos, segundo a sua metodologia.

#### 4.4.1 Métodos Invasivos

A sua metodologia consiste na recolha de biópsias da mucosa gástrica, recorrendo a uma endoscopia gástrica (19). Os métodos mais usados são: a cultura, a histologia, o teste rápido da urease (RUT) e os de biologia molecular.

No método cultura, a bactéria é isolada do tecido infetado e da respetiva cultura em laboratório. Contudo, pelo fato de apresentar uma técnica laboratorial bastante exigente, não é o método mais utilizado.

A histologia consiste no estudo direto de uma biópsia, sendo por isso um dos métodos mais usados. Com base nos resultados, torna-se possível reconhecer a morfologia da *H. pylori*, além de avaliar as manifestações clínicas na infecção (20).

O RUT implica uma análise pouco dispendiosa e com rápidos resultados. Esta análise tem por base a atividade urease da *H. pylori*, que produz amónia através da decomposição da ureia, provocando um aumento do pH, sendo detetado pelo indicador fenol vermelho (20).

Os métodos moleculares são aplicados tanto para o diagnóstico da infecção como na análise da diversidade, deteção de fatores de virulência, averiguação da persistência e análise dos padrões de resistência da *H. pylori* a antibióticos. Dentre eles, os mais usados são o PCR (polymerase chain reaction), PCR em tempo real e o FISH (fluorescente in situ hybridization) (21,22). Embora os métodos moleculares sejam caracterizados como invasivos, existe atualmente um teste não invasivo com base em técnicas biomoleculares como, por exemplo, o PCR em tempo real a fezes, que possibilita a deteção da bactéria, assim como testar a suscetibilidade desta a claritromicina (22).

#### 4.4.2 Métodos Não Invasivos

São exemplos de métodos não invasivos o teste de sopro da urease (UBT), os testes serológicos e os testes de antígenos fecais.

O UBT consiste na conversão da ureia em amónia e CO<sub>2</sub> tal como o RUT. Todavia, não há necessidade de recolher uma biópsia neste teste. O procedimento consiste na ingestão de um líquido com ureia marcada com <sup>13</sup>C e <sup>14</sup>C. Em seguida recolhem-se amostras de sopro do paciente para serem analisadas. A deteção do CO<sub>2</sub> isotópico corresponde a presença da bactéria na amostra (9).

A técnica de sorologia baseia-se na pesquisa de anticorpos específicos da infecção. Esta pesquisa é feita recorrendo ao método ELISA e a um conjunto de antígeno. A imunoglobulina G é um dos tipos de anticorpos detetados habitualmente (21,23). Contudo, foram surgindo novos testes baseados na deteção de novos anticorpos, como por exemplo, proteína CagA, VacA e a subunidade B da urease (UreB) (24).

Os testes de antígenos fecais são realizados com o auxílio de um ELISA às fezes, usando anticorpos policlonais (pAb) para detetar os antígenos (21).

## 4.5 Linhas de Tratamento

Existem vários regimes de tratamento propostos para a infecção de *H. pylori*. Porém, o tratamento padrão usado como primeira linha assenta na combinação de um inibidor de bomba de prótons (IBP) com dois antibióticos, geralmente a amoxicilina e a claritromicina, por um período de 14 dias, como está descrito na tabela 1. Existem pacientes alérgicos à penicilina. Nestes casos, recomenda-se a substituição da amoxicilina pelo metronidazol. O mesmo acontece nos casos de resistência à claritromicina, sendo esta igualmente substituída pelo metronidazol (23).

Contudo, a terapêutica de primeira linha pode fracassar em 20% dos tratamentos, sobretudo devido à resistência a antibióticos. O uso excessivo de antibióticos como o método padrão causa um aumento da resistência dos micro-organismos face aos antibióticos, provocando um declínio na eficácia destes (23).

Quando isso acontece, é imprescindível que o paciente seja sujeito a outro tipo de tratamento, alterando ao menos um dos antibióticos, visto que existe uma probabilidade acrescida de a estirpe ter ganho resistência aos antibióticos usados na terapêutica de primeira linha. Como terapêutica de segunda linha é recomendado a terapia quadrupla contendo bismuto, terapia sequencial ou terapia tripla contendo levofloxacina (23).

Caso ocorra a falha da segunda linha terapêutica, há necessidade de se realizar um teste a fim de se avaliar a atividade antimicrobiana da estirpe, comparativamente aos diferentes antibióticos utilizados. Com a aplicação de duas terapêuticas constituídas com elevadas doses de antibióticos, observa-se um desenvolvimento de uma grande resistência aos antibióticos por parte das estirpes, diminuindo assim a probabilidade de sucesso de erradicação. Após a aplicação deste teste, torna-se mais viável a escolha da terapêutica adequada para cada caso, permitindo aumentar a taxa de eficácia da mesma (23).

Tabela 1 – Regime de primeira linha no tratamento da infecção por *H. pylori* (ACG guideline). Adaptado de (25)

Regimen	Duration	Eradication rates	Comments
Standard dose PPI, clarithromycin 500 mg b.i.d., amoxicillin 1 g b.i.d.	10 – 14 days	70 – 85%	Consider in non-penicillin-allergic, macrolide-naïve patients
Standard dose PPI, clarithromycin 500 mg b.i.d., metronidazole 500 mg b.i.d.	10 – 14 days	70 – 85%	Consider in penicillin-allergic patients who are macrolide-naïve or unable to tolerate bismuth quadruple therapy
Bismuth subsalicylate 525 mg q.i.d., metronidazole 250 mg q.i.d., tetracycline 500 mg q.i.d., ranitidine 150 mg b.i.d. or standard dose PPI b.i.d.	10 – 14 days	75 – 90%	Consider in penicillin-allergic patients
PPI + amoxicillin 1 g b.i.d. followed by: PPI, clarithromycin 500 mg, tinidazole 500 mg b.i.d.	5 days 5 days	> 90%	Requires validation in North America

#### 4.5.1 Vantagens e Desvantagens das Linhas de Tratamento Usadas Atualmente

A terapêutica descrita acima tem-se provado extremamente eficaz na erradicação da *H. pylori*. Porém apresenta alguns inconvenientes tais como a insuficiência terapêutica devido ao aparecimento de resistência bacteriana, pouca adesão por parte do paciente que pode ser provocado em parte pelos efeitos adversos desta terapia, custo elevado do tratamento, insucesso em prevenir a reinfeção. Assim sendo, surgiu a necessidade de desenvolver vacinas de modo a ultrapassar essas barreiras (25). A tabela 2 lista alguns dos principais efeitos adversos associados à terapêutica.

PPI	Headache and diarrhoea
Amoxicillin	Gastrointestinal (GI) upset, headache and diarrhoea
Clarithromycin	GI upset, diarrhoea, altered taste and (rarely) QT prolongation
Metronidazole	Metallic taste, dyspepsia, disulfiram-like reaction with alcohol consumption, peripheral neuropathy and seizures
Tetracycline	GI upset, photosensitivity, tooth discoloration if aged < 8 years
Bismuth	Darkening of the tongue and stool, nausea and GI upset

Tabela 2 – Efeitos adversos comuns da terapia de erradicação de *H. pylori*. Adaptado de (25)

Os antibióticos apenas são administrados em pacientes sintomáticos. E isto pode ser visto como um problema, uma vez que os indivíduos assintomáticos também estão em risco de desenvolver sintomas simples a graves doenças digestivas, incluindo o cancro. Este facto traduz-se num dos maiores problemas no manejo da infeção por *H. pylori*. Tendo como base os resultados obtidos em todas as linhas de tratamento, cada uma exigirá um conjunto de considerações bem cuidadas para aumentar a eficácia em várias populações a nível mundial. Posto isto, deparamo-nos com dois principais problemas: em primeiro lugar, o design e aplicação contínua de novos antibióticos, provavelmente, irá progredir lentamente, e em segundo lugar, com tais taxas de resistência, a eficácia da maioria das linhas de tratamento são muito baixas (26).

Em suma, o principal problema relativamente ao tratamento com antibióticos consiste no facto de não conseguirmos garantir proteção contra a reinfeção, mesmo tendo um regime de tratamento com maior sucesso. A realidade é que antibióticos são bastante úteis, mas não são os melhores possíveis na intervenção contra a infeção (26).

#### 4.6 Probióticos

Os probióticos são definidos pela OMS como sendo bactérias vivas que permitem a sobrevivência na mucosa gástrica e alterar a composição microbiota, provocando efeitos benéficos se administrados de forma adequada (26).

Foram publicados alguns estudos que sugerem que a diarreia associada ao uso de antibiótico no tratamento contra *H. pylori*, pode ser aliviada com a administração de probióticos. Como consequência, as iniciativas médicas para pesquisas sobre probióticos sofreram um aumento exponencial nos últimos anos (26).

De facto, a recomendação do uso de probióticos como micróbios pró-fermentação provou ter alguns benefícios, tais como, a estimulação da produção de mucina que se traduz numa resposta imune mais eficaz, a indução do ácido de secreção que reduz significativamente a densidade de *H. pylori* no estômago, proteção ao competir com outros micro-organismos pelos recetores humanos, modulação da resposta imune que comporta uma maior proteção contra agentes invasores, entre outros (26).

Recentemente, os probióticos têm-se mostrado bastante úteis como adjuvantes. Os lactobacilos têm demonstrado um melhor desempenho no aumento da eficácia da terapêutica contra *H. pylori*. Partindo destes resultados, alguns estudos *in vitro* já mostram efeitos benéficos

da administração de lactobacilos em indivíduos infetados com *H. pylori*. Porém, ainda são necessários vários estudos para termos informações mais detalhadas sobre este assunto (26).

Apesar dos progressos, muitas questões permanecem sem resposta. E com base nas incertezas e alguns resultados divulgados até a data, o uso dos probióticos atualmente só pode ser empregue para aumentar a eficácia da terapêutica com antibióticos. Contudo, podemos admitir que humanos e probióticos estão em estágios iniciais de uma grande cooperação para erradicar *H. pylori* (26).

## 5. Vacinas contra *H. Pylori*

As vacinas são uma das grandes conquistas de saúde pública, com enorme sucesso na erradicação e diminuição da incidência de várias doenças, tais como a poliomielite, sarampo e varíola.

A vacinação tem como objetivo introduzir uma resposta imune protetora face ao agente patogénico alvo, sem o risco de adquirir a doenças e suas potenciais complicações (27).

As vacinas atuam promovendo uma resposta imune inata, que por sua vez ativa uma resposta imune adaptativa. A imunidade inata consiste na primeira linha de defesa contra agentes patogénicos. É estabelecida num curto período, sendo inespecífico e isento de memória (28). Por outro lado, a imunidade adaptativa, proporciona uma segunda linha de defesa, caracterizada por um conjunto diverso de linfócitos e anticorpos capazes de reconhecer e eliminar os agentes patogénicos. Cada vacina compõe-se de antigénios específicos, capazes de induzirem a imunidade mediada por células, ativando os linfócitos T e estimularem a produção de anticorpos específicos, através dos linfócitos B. Após a eliminação dos agentes patogénicos, o sistema imunitário adaptativo estabelece uma memória imunológica, caracterizada pela persistência de anticorpos de células de memória, podendo ser reativado rapidamente após uma exposição subsequente ao mesmo patogénico. Esta base de proteção a longo prazo consiste no objetivo da vacinação (29).

Tendo em conta as limitações causadas pela terapêutica com antibióticos, torna-se crucial o desenvolvimento de uma vacina terapêutica e profilática. Prevê-se que uma vacina

profilática, com uma eficácia limitada de 55%, produza uma elevada rentabilidade uma vez que preveniria o desenvolvimento de diferentes doenças a longo prazo (30).

As vacinas podem ser classificadas como atenuadas, inativas, de subunidades, toxoides, baseadas em ácidos nucleicos e de vetores recombinantes, como é possível observar na figura 3 (27).

## 5.1 Tipos de Vacina

### 5.1.1 Vacinas Atenuantes

Vacinas atenuantes são compostas por agentes patogénicos que foram enfraquecidos, alterados ou selecionados para não causarem doenças graves em indivíduos com o sistema imunitário saudável. Geralmente são produzidas a partir de vírus visto que estes possuem menos genes e a atenuação pode ser obtida e controlada de uma forma mais fiável. Elas originam uma infeção muito limitada, desenvolvendo respostas imunes semelhantes às induzidas pela infeção natural, uma vez que possuem os mesmos antigénios que o agente patogénico original. Porém, indivíduos imuno comprometidos correm o risco de sofrer uma replicação patogénica não regulamentada, podendo levar a infeções severas ou morte. Deste modo, vacinas atenuadas muitas vezes são contraindicadas nestes pacientes. Podem ainda infetar o feto resultando numa doença congénita, sendo por isso, igualmente contraindicado durante a gravidez (31,32).

### 5.1.2 Vacinas Inativas

Baseiam-se em agentes patogénicos inativados por calor, radiação ou produtos químicos. A inativação destrói a capacidade de replicar e provocar doença do agente patogénico, porém, mantem a sua imunogenicidade a fim de ser reconhecido pelo sistema imunológico (27).

### 5.1.3 Vacinas de Subunidades

São compostas por fragmentos selecionados do patogénico usados como antígenos. Estes fragmentos podem ser proteínas, polissacáridos, ou partes do agente infeccioso. Geralmente causam menos reações adversas que as vacinas atenuadas ou inativas, mas são menos imunogénicas pois contêm menos antígenos e o processo de purificação muitas vezes elimina componentes que desencadeiam a imunidade inata (27).

### 5.1.4 Vacinas de Vetores Recombinantes

Produzidas a partir de vírus infecciosos não patogénicos que expressam genes da proteína antigénica de um agente patogénico, combinam vantagens das vacinas atenuadas e de subunidades. No entanto, o seu uso pode ser limitado devido a pré-exposição aos vírus usados como vetores, originando uma elevada prevalência de anticorpos neutralizantes pré-existentes contra estes vetores em humanos, causando uma depuração precoce da vacina e redução da imunogenicidade da mesma (33).

### 5.1.5 Vacinas Baseadas em Ácidos Nucleicos

Funcionam através da inserção do RNA ou do DNA que codificam proteínas antigénicas nas células, originando a apresentação destes antígenos ao sistema imunitário, desencadeando uma resposta imune (27).

### 5.1.6 Vacinas Toxoides

Algumas bactérias podem provocar doenças através da libertação de toxinas patogénicas. Vacinas contra estas doenças são produzidas pela desintoxicação da toxina utilizando calor, produtos químicos ou ambos. Os toxoides não são patogénicos, porém mantêm a capacidade de induzir anticorpos neutralizantes de toxinas, fornecendo proteção (27).

Como podemos observar nos parágrafos anteriores e na figura 3, existem várias classificações associadas às vacinas. Contudo, os tipos de vacinas mais usadas no estudo da erradicação da infecção por *H. pylori* são as vacinas recombinantes (34), as vacinas de células inteiras (35), e as vacinas baseadas em ácidos nucleicos, como é o caso das vacinas baseadas em etítopos (36), vacinas encapsuladas (37), vacinas carregadas com células bacterianas inativas (2), vacinas de codão (25), entre outras.

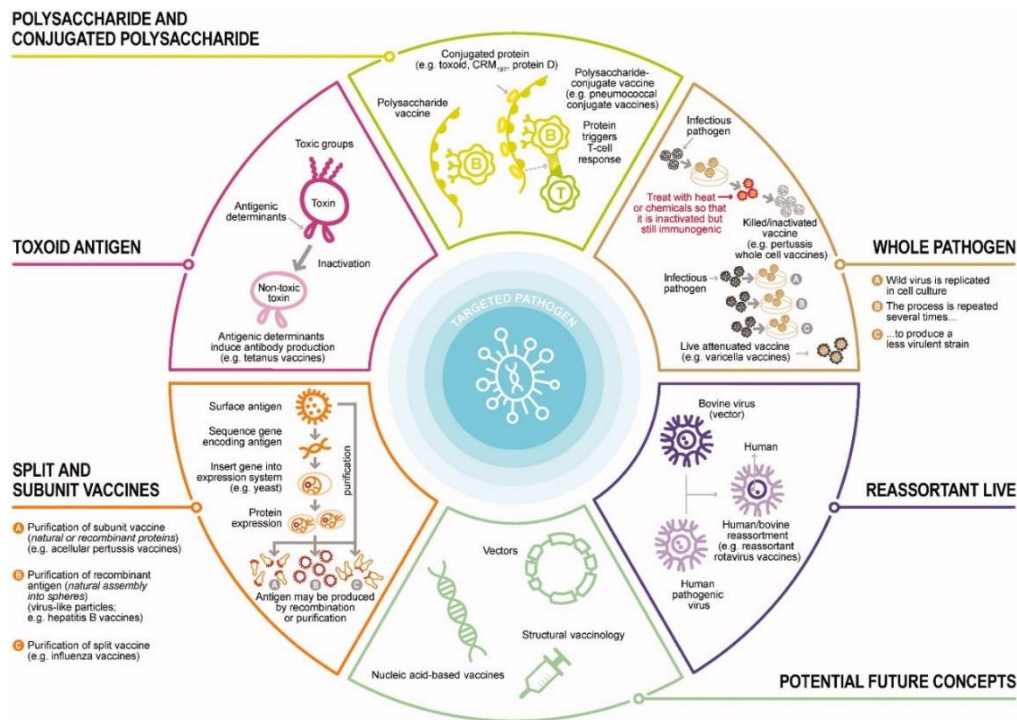


Figura 3 – Diferentes tipos de vacina. As vacinas podem ser produzidas utilizando diferentes processos. Adaptado de (26)

## 5.2 Vias de Administração

Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidas vias de administrações diferentes, com o intuito de tirar o maior proveito da farmacocinética da vacina. As vias de administração mais comuns são: Via Oral e Via Intramuscular:

### 5.2.1 Via Oral

A administração por via oral é a preferida dos pacientes, uma vez que é a mais conveniente, económica e fácil de administrar, permite a automedicação, evitando o deslocamento dos pacientes e aumentando, assim, a adesão à terapêutica. São capazes de estimular o MALT (tecido linfóide associado à mucosa), localizado no trato digestivo e o GALT (tecido linfóide associado ao intestino), ambos relevantes na indução de uma resposta da mucosa eficaz contra os agentes infecciosos. A vacina pode ser administrada em muitas formas farmacêuticas diferentes, tais como, líquidos, cápsulas, comprimidos entre outros. Contudo, as vacinas orais possuem alguns obstáculos. Para promover uma resposta imune robusta, os antígenos necessitam ultrapassar um conjunto de barreiras físico-químicas e biológicas no trato gastrointestinal. Entre elas, destaca-se a barreira biológica do intestino e as suas camadas secretoras de muco, cuja função consiste em digerir os nutrientes, para a absorção e proteger o organismo contra a invasão de ameaças patogénicas. Um outro grande obstáculo no desenvolvimento dessas vacinas deve-se ao facto de ser necessária uma dose superior de antígeno para desencadear uma resposta imunológica adequada, comparativamente às vacinas administradas pela via parenteral (38,39).

### 5.2.2 Via Intramuscular

É a via mais usada atualmente. As vacinas administradas pela via intramuscular não estão sujeitas ao efeito de primeira passagem, nem tão pouco necessitam de doses elevadas de antígenos para desencadear uma resposta adequada. Todavia apresentam algumas desvantagens, como por exemplo a dor, drenagem ou sangramento no local da injeção, o edema e a eritema. Também são suscetíveis de provocar fortes dores de cabeça, hipertensão, gastroenterite e broncoespasmo. É uma via invasiva, e que requer mão de obra qualificada. Podem desencadear no paciente reações alérgicas e ansiedade (38).

## 6. Seleção de Antígenos para Vacina contra *H. Pylori*

Na elaboração de uma vacina que não possui na sua constituição o agente patogénico, é indispensável a seleção dos antígenos com a capacidade de garantir a eficácia da vacina, tornando-se assim num passo crucial para assegurar a efetividade da mesma (9).

De acordo com alguns estudos, a seleção deve basear-se nos seguintes critérios: exibidos à superfície, abundantes, preservado entre as diferentes estirpes e ser um importante fator de virulência (moléculas produzidas por patogénicos que contribuem para colonização) na origem da infeção, obviar a utilização de antígenos homólogos a antígenos do hospedeiro, pois, tais opções poderão provocar uma resposta auto-imune (9,40).

Nos últimos anos, inúmeras vacinas têm sido testadas em modelos animais, sendo os antígenos mais comuns a UreB, a VacA e a CagA, caracterizados na tabela 3 (41), frequentemente associados à virulência das estirpes (42,43).

### 6.1 VacA

A citotoxina VacA representa uma patogenicidade importante com interações extremamente complexas, entre *H. Pylori* e as células epiteliais da mucosa gástrica.

Constituída por uma proteína multifuncional com cerca de 860 resíduo de aminoácidos (aa), exhibe um conjunto de características estruturais e funcionais diferentes das toxinas bacterianas conhecidas atualmente (44).

Está presente em todas as estirpes de *H. pylori*, porém, apenas é expressa em 50-60% das estirpes. Codifica uma pro-toxina de 140kDa com 1287 resíduos de aminoácidos (aa) sendo proteoliticamente processado, produzindo a toxina ativa de 90 kDa com 821 resíduos (figura 4). Este gene apresenta na sua estrutura duas regiões variáveis, a região sinal (s) e a região média (m). Os alelos presentes na região s podem ser do tipo s1 ou s2, de igual forma, na região m podemos encontrar os tipos m1 e m2. A virulência do gene VacA é conferida pela junção dos tipos s/m, sendo a combinação s1/m1 considerada a mais virulenta uma vez que incita um maior dano nas células epiteliais devido a uma maior expressão do gene (45).

A toxina do gene VacA pode interagir com uma variedade de células de mamíferos, exercendo múltiplas atividades celulares, nomeadamente a formação em massa de vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais, indução de canais membranares, apoptose celular através da interação com a membrana mitocondrial, a inflamação e a modulação do SI por interferência com as vias de transdução de sinais envolvidas na regulação da proliferação de células T (46).

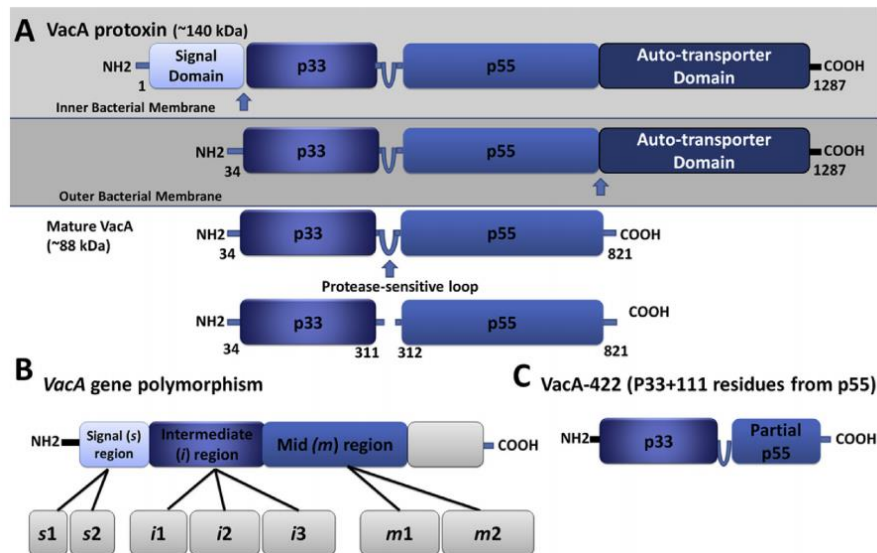


Figura 4 – Estrutura do gene VacA. (A); Região de Sequência de Sinal (B); Estrutura do N-terminal (C)

## Cag A

A Cag-PAI é formada por um conjunto de aproximadamente 32 genes, estando fortemente ligada ao aparecimento de cancro gástrico e úlcera pancreática.

Dentre estes, 18 apresentam componentes do sistema de secreção do tipo IV (TFSS), que possibilita a penetração da proteína CagA, de peptidoglicanos e outros fatores bacterianos, no citosol das células epiteliais gástricas (9).

O CagA é considerado por muitos autores, uma proteína intensamente imunogénica, uma vez que é o gene que mais se destaca pela sua virulência no conjunto que forma a Cag-PAI (47).

Recorrendo ao sistema de secreção, a proteína CagA é introduzida nas células por meio de canais membranares criados pelo TFSS. Posteriormente a proteína é fosforilada na tirosina

pela ação das células quinases do hospedeiro, tornando-se ativa. Em seguida, esta interage com as moléculas de sinalização das células, provocando uma anormal proliferação celular (associado ao processo de carcinogénese), secreção da IL-8 e alterações morfológicas, nomeadamente a disrupção das junções celulares e rearranjo do citoesqueleto (9,48).

O TFSS é composto por um conjunto de proteínas supramoleculares que serve como um canal de translocação de substrato abrangendo as membranas interna e externa de bactérias gram-negativas, com estrutura semelhante a agulhas, facilitando o transporte do CagA (48).

## 6.2 Urease

No processo de colonização do estômago por parte da *H. pylori*, um fator crítico é a resistência às condições extremas do ácido gástrico do estômago. Para combater o pH ácido, *H. pylori* produz a urease que vai converter a ureia em amoníaco e dióxido de carbono, que neutralizam o ácido do estomago. A urease tem sido caracterizada como a proteína mais expressa na *H. pylori*. Esta proteína localiza-se tanto no citoplasma como na superfície das células da *H. pylori*, sendo constituída por duas subunidades estruturais, UreA e UreB (49).

No que respeita à imunogenicidade da Urease, existe uma grande controvérsia no meio científico uma vez que alguns autores defendem que apenas a UreB é imunogénica enquanto outros consideram que são ambas. Entretanto, esta proteína poderá ser uma grande candidata para o desenvolvimento de uma vacina, usando somente epitopos desta, desencadeando assim anticorpos específicos inibidores da atividade enzimática da urease (50,51).

Tabela 3 – Antígenos mais promissores para uma vacina contra *H. pylori*. Adaptado de (44)

Step	Antigen	Feature	Relevant reference
1. Adhering and colonizing	Urease B - UreB	Neutralizes the acidic pH.	Wang et al., 2010
	Heat shock protein - HspA	In nickel sequestration and as a specialized nickel donor protein for urease.	Schauer et al., 2010
	<i>H. pylori</i> adhesin A - HpaA	Adherence to gastric surface acceptors.	Nyström and Svennerholm, 2007
2. Evading and attenuating	Neutrophil-activating protein A - NapA	Promotes mucosal inflammation, cell activator, evades immune response.	Amedei et al., 2006.
3. Invading and damaging	Cytotoxin-associated antigen - CagA	Injects toxins, promotes inflammation, ulcers and carcinogenesis.	Stein et al., 2013
	Vacuolating cytotoxin - VacA	Toxic vacuoles that form pores in cells, promotes apoptosis.	Junaid et al., 2016
	$\gamma$ -glutamyl transpeptidase - GGT	Induces apoptosis and cell cycle arrest.	Zhang et al., 2015.

### 6.3 Adjuvantes

Proveniente do latim, a palavra adjuvante deriva de *adjuvare*, cujo significado é “ajudar” ou “auxiliar” (52).

Descritos pela primeira vez por Ramon como sendo substâncias que potencializam a resposta imune a um antigénio, são, hoje em dia, definidos como substâncias capazes de aumentar a resposta imune específica e auxiliar o antigénio a desencadear uma resposta imune precoce, elevada e duradoura (52).

Ultimamente o interesse à volta dos adjuvantes tem tido um enorme crescimento, causado pelo desenvolvimento de vacinas sintéticas e purificadas, baseadas no uso de antigénios, uma vez que estes são imunologicamente fracos, necessitando por isso da presença dos adjuvantes para desencadear uma resposta imunológica mais potente (52).

Caracterizados por possuir uma grande variedade de mecanismos de ação, os adjuvantes devem ser selecionados de acordo com a via de administração e na imunidade necessária a cada tipo de vacina em particular. A escolha de um determinado adjuvante deve ter como base o balanço entre os níveis de efeitos adversos possíveis e a capacidade de potencializar uma forte resposta imunológica (52).

O uso dos adjuvantes numa vacina humana pode ser acompanhado de um leque variado de objetivos, tais como, aumentar a imunogenicidade, reduzir a quantidade necessária de antigénio, agilizar a resposta imune, reduzir o número de imunizações necessárias, aumentar a duração da proteção, ou ainda, otimizar a eficácia da imunização em neonatos e idosos (52).

No âmbito das vacinas contra *H. pylori*, os principais adjuvantes usados, tanto para imunizações terapêuticas, como para profilática, têm sido a toxina da cólera (CT) e a enterotoxina termolábil (LT) da *E. coli*, bem como alguns outros derivados dessas toxinas (53).

Embora as toxinas CT e LT sejam extremamente potentes como adjuvantes, nenhuma das duas pode ser usada, devido à sua elevada toxicidade. Tendo em conta esta limitação, muitos esforços foram empreendidos na tentativa de contruir mutantes de CT e LT, modificando o sítio ativo da subunidade A da toxina (53).

Recentemente foram testadas outras abordagens para melhorar a imunogenicidade dos antigénios candidatos a vacina. Dentro destes, podemos destacar o DNA bacteriano ou oligodesoxinucleotícos (ODN) contendo CpG, com regiões com capacidade para ativar

macrófagos, células dendríticas e células B, regulando assim as moléculas MHC I e II de forma positiva.

Os CpG são descritos como oligonucleótidos sintéticos, formados por citosina e guanina sem o grupo metilo, com a função de estimular o sistema imunitário. Tem como vantagem o número reduzido de efeitos adversos em comparação a CT e a LT (54).

Foi possível demonstrar, através de alguns estudos, que a administração de CpG pode estimular a produção de citocinas na mucosa gástrica, bem como reduzir a colonização bacteriana em murganhos infetados com *H. pylori*, mesmo na ausência de antígenos (53).

## 7. Modelos Animais

A necessidade do uso de modelos de animais no estudo de tratamentos contra *H. pylori* ficou clara imediatamente após a associação desta a doenças gástricas graves. A maioria dos conhecimentos adquiridos até a data relativamente à infecção, deriva dos estudos efetuados em indivíduos com infecção crónica (55).

Modelos animais reproduzindo os diferentes aspetos patológicos e da resposta imune induzida por *H. pylori* seriam extremamente úteis na percepção das interações cinéticas entre a bactéria e o hospedeiro. Além disso, os modelos animais são bastante importantes na busca de terapias antimicrobianas, na análise de fatores de potenciais virulência in vivo, na disseção das respostas imunes durante a infecção ou após o indivíduo ter sido imunizado, e no fornecimento de informações para o desenvolvimento de novas terapêuticas contra *H. pylori*, nomeadamente as vacinas (55).

Até agora, não foi encontrado nenhum modelo animal ideal, que reproduz todos os diferentes aspetos de infecção e doença presentes nos humanos. Isto dá-se também por não sabermos todos os aspetos cinéticos da infecção que ocorrem nos humanos (55).

Contudo, os modelos animais representam uma ferramenta necessária para selecionar potenciais candidatos a vacinas (55).

Nos próximos parágrafos vão estar resumidas as características principais dos modelos animais mais comumente utilizados nos estudos de desenvolvimento de vacinas contra *H. pylori*.

## 7.1 Ratos e outros roedores

A primeira colonização com sucesso do estômago de murganhos foi relatada em 1990 por A. Lee. O uso deste modelo passou a ser bastante popular e vários estudos foram feitos a partir deste. Este modelo reproduz vários aspectos da infecção humana, e foi usado para investigar vários aspectos das interações entre o hospedeiro e as bactérias, bem como a possibilidade de selecionar potenciais candidatos a vacinas (55).

## 7.2 Porcos Gnotobióticos

Este modelo foi utilizado para a primeira demonstração, in vivo, da urease como fator de violência. Alguns estudos também recorreram a estes animais para mostrar a possibilidade de ocorrerem infecções mistas com os tipos I e II das cepas de *H. pylori*. Contudo, este modelo enfrenta algumas limitações tanto no nível patológico, uma vez que as lesões patológicas se diferem das dos humanos, como na logística complexa necessária a abrigar e seguir estes animais (55).

## 7.3 Primatas

O *H. pylori* também é descrito como sendo capaz de infectar, espontaneamente, alguns primatas, para além dos humanos. Alguns estudos apontam que dentro de várias colônias, 60% dos macacos rhesus foram infectados com apenas 2 anos de idade, e 90% na idade de 11 anos ou mais, com alterações patológicas muito semelhantes às observadas em humanos (55).

Apesar das grandes semelhanças destes primatas aos humanos, o custo destes e as altas taxas de infecção espontâneas limitam o uso deste modelo em grande escala (55).

## 7.4 Caninos e Felinos

A infecção natural em gatos com *H. pylori* foi relatada em alguns estudos. Estes animais desenvolvem uma gastrite linfocítica, mas com poucos neutrófilos infiltrando a mucosa (55).

Contudo, a infecção natural de cães não foi relatada, embora alguns estudos tenham relatado a possibilidade de os animais de estimação representarem uma fonte de infecção. Recentemente foi demonstrado que pode ser estabelecida a infecção experimental por *H. pylori* em cães Beagle convencionais, usando uma cepa adaptada dos murganhos, o que permitiria acompanhar os animais sem a necessidade de necropsia, como em caso de animais menores (55).

Curiosamente, os cães com infecção aguda apresentam sintomas clínicos, como vômitos e diarreia, muito semelhantes aquelas observadas nos poucos casos de infecções agudas relatadas em humanos (55).

Potenciais fórmulas de vacinas estão agora a serem testados neste modelo para fins profiláticos e terapêuticos da vacinação (55).

Na tabela 4 temos listado um conjunto de comparações das vantagens e desvantagens dos diferentes modelos animais usados nos estudos de desenvolvimento de vacinas contra *H. pylori*.

Tabela 4 - Tabela com as principais vantagens e desvantagens de cada um dos modelos animais utilizados. Adaptada de (54)

Animal	Colonizado por:	Vantagens	Desvantagens
Primatas não humanos	<i>H. pylori</i>	Espécie animal mais próxima da espécie humana; possibilidade de endoscopia; fisiologia gástrica semelhante à humana	Custos elevados; colonização por estirpes endémicas
Porcos	<i>H. pylori</i>	Modelo de colonização semelhante à do humano; fisiologia gástrica semelhante à humana observação de úlceras	Presença apenas de gastrite crónica; custos elevados; modelo para experiências de período reduzido
Furões	<i>H. mustelae</i>	Infeção natural; fisiologia gástrica semelhante à humana; utilidade para estudos com vacinas	Modelo de colonização varia para humanos; presença predominantemente de apenas gastrite crónica
Cães e gatos	<i>H. pylori e H. felis</i>	Fisiologia gástrica semelhante à humana	Custos elevados; colonização por estirpes endémicas
Porquinho da Índia	<i>H. pylori</i>	Homologia com IL-8; gastrite crónica ativa	Uso limitado e conhecimento limitado
Murganhos	<i>H. pylori, H. felis e H. heilmannii</i>	Económico; viável para o estudo de vacinas e antimicrobianos; várias estirpes colonizantes disponíveis	Doses não mimetizam a patologia humana; infeção não natural
Gerbils	<i>H. pylori</i>	Gastrite crónica ativa, indução de adenocarcinoma pela infeção	Falta de reagentes imunológicos; falta de outras estirpes colonizantes

## 8. Vacinas desenvolvidas contra *H. pylori*

Ao longo dos anos vários investigadores dedicaram-se ao desenvolvimento de vacinas, todavia ainda não obtiveram muito sucesso.

### 8.1 Vacinas inativadas de bactérias de células inteiras

Como primeira abordagem, a utilização de células inteiras da bactéria é eficaz para a prevenção e para o tratamento. No contexto da prescrição de vacinas inteiras inativas,

especialmente sobre bactérias gram-negativas como a *H. pylori*, a presença de lipopolissacarídeos (LPS) como um componente bacteriano severamente tóxico apresenta-se eticamente correto. A semelhança entre epitopos bacterianos LPS e humanos, como epitopos Lewis presentes nas células sanguíneas e nas células epiteliais gástricas, podem provocar um fenómeno de reação cruzada de anticorpos. No entanto, a vacinação foi efetuada em ensaios clínicos fase I e mostrou-se eficaz na proteção nos voluntários vacinados (4).

## 8.2 Vacinas enzimáticas catalases recombinantes

Assim como outras bactérias, *H. pylori* possui enzimas protetoras tais como a catalase e o superóxido dismutase. A enzima superóxido bacteriana converte a molécula tóxica do hospedeiro, o anião superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Posteriormente, a enzima cliva as moléculas  $H_2O_2$ , produzindo  $H_2O$  e  $O_2$ . A administração da vacina foi feita em ratos BALB/c por via oral. Os resultados deste estudo mostram que a vacina recombinante conseguiu estimular a resposta dos anticorpos do hospedeiro e que o soro IgG e os anticorpos da saliva protegeram os ratos contra *H. pylori* (56). Na tabela 5 encontram-se exemplificados algumas vacinas formuladas a partir de catalases recombinantes.

Tabela 5 – Lista de Vacinas recombinantes baseados em enzimas de catalase. Adaptado de (4)

Vaccine component(s)	Administration route(s)	Expression host	Protective response(s)	Animal/ Human	Reference
Catalase, CT	Oral	<i>E. coli</i> XL0LR	IgG, IgA	BALB/c mice	Radcliff et al. (1997)
Kat DNA vaccine	Intranasal, intracutaneous	<i>E. coli</i> JM109	IgG, IgA	C57BL/6 mice	Miyashita et al. (2002)
GST-KatA	Oral	<i>S. typhimurium</i> SL3261	IgG, IgA, Th1	C57BL/6 mice	M. Chen et al. (2003)
Catalase ISCOMATRIX™	Oral	<i>E. coli</i>	IgG, IgA, Th1	BALB/c mice	Skene, Doidge, and Sutton (2008)
HBsAg-KatA	Oral	HuH7	IgG, Th1, Th2	C57BL/6 mice	Kotiw et al. (2012)

## 8.3 Vacinas recombinantes de urease

A enzima urease, devido ao seu papel na infeção pelo *H. pylori*, é uma grande candidata na construção de uma vacina. Estudos realizados com esta enzima mostram que a vacina, administrada oralmente em adultos, induziu fortemente a produção de anticorpos IgA tanto no soro como na saliva (4). Na tabela 6 podemos observar alguns exemplos de vacinas de urease.

Tabela 6 - Lista de Vacinas Recombinantes Baseadas na Enzima Urease. Adaptado de (4)

Vaccine component(s)	Administration route (s)	Expression host	Protective response(s)	Animal/Human	Reference
Urease, LT	Oral	<i>E. coli</i>	IgG, IgA	Human	Michetti et al. (1999)
Urease	Nasal	<i>S. typhimurium phoP<sup>f</sup></i>	IgG, IgA, Th1, Th2	BALB/c mice	Corthésy-Theulaz et al. (1998)
Urease subunit B	Oral	<i>L. lactis</i> MG1363	IgG, IgA	C57BL/6 mice	Lee, Roussel, Wilks, and Tabaqchali (2001)
CFAdE (Urease-Lpp20-HpaA-CagL)	Oral	<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	IgG, IgA	BALB/c mice	Guo, Yin et al. (2017)
CotC-CTB-UreB	Oral	<i>B. subtilis</i> WB6	IgG, IgA, Th1, Th2	BALB/c mice	Z. Zhou et al. (2017)
CWAE (Urease-HpaA-Hsp60-NAP)	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th17	BALB/c mice	Guo, Yang et al. (2017)
rUH (UreB-HpaA)	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG	New Zealand white rabbits	Chirani et al. (2018)
CTB-UreI-UreB	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th2, Th17	BALB/c mice	Yang et al. (2015)
HUEpi-LTB	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th2	BALB/c mice	W.-Y. Zhou et al. (2009)
urease and HP0231	Oral	<i>S. enterica</i> Typhi Ty21a	Th1	Human	Aebischer et al. (2008)
UreB-IL-2 DNA vaccine	Oral	<i>S. typhimurium</i> SL7207	Effective protection	C57BL/6 mice	Xu et al. (2007)
UreB DNA vaccine	Oral	Poliovirus	IgG, Th1	C57BL/6 mice	Smythies et al. (2005)
CTB-UA	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th2, Th17	C57BL/6 mice	Guo et al. (2012)
CTUBE	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th2, Th17	BALB/c mice	Guo et al. (2013)
HSBP-CTB	Oral	Synthesized	IgG, IgA	BALB/c mice	Ruiz-Bustos, Sierra-Beltran, Romero, Rodriguez-Jaramillo, and Ascencio (2000)
HspA-HpaA-UreB414	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th2	BALB/c mice	L. Wang et al. (2010)
UreB138	Subcutaneous	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA	C57BL/6 mice	Morihara, Fujii, Hifumi, Nishizono, and Uda (2007)
CTB-UE-CF (CCF)	Oral	<i>E. coli</i>	IgG, IgA	BALB/c mice	Song et al. (2015)
HP55/PLGA-CCF	Oral	<i>E. coli</i>	IgG, IgA, Th1, Th17	BALB/c mice	Tan et al. (2017)
HP55/PBCA-CCF	Oral	<i>E. coli</i>	IgG, IgA, Th1, Th17	BALB/c mice	H. Liu et al. (2018)
CUE-GEM	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA	BALB/c mice	W. Liu et al. (2016)
CTB-HUUC	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th2, Th17	BALB/c mice	(Pan et al. (2018)
rFIID	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA	C57BL/6 mice	Ghasemi, Mohammad, Mautner, Karsabet, Ardjmand et al. (2018)
rFUVL (FIID-UreB-VacA-CagL)	Oral	<i>E. coli</i> BL21	IgG, IgA, Th1, Th2, Th17	C57BL/6 mice	Ghasemi, Mohammad, Mautner, Karsabet, Amani et al. (2018)

## 8.4 Vacinas recombinantes de proteínas CagA e VacA

Estas proteínas demonstram ter um papel essencial na patogênese de *H. pylori* na úlcera péptica e no cancro gástrico. Portanto, a construção de vacinas recombinantes com base nestas proteínas, induz significativamente uma forte resposta imune contra a infecção de *H. pylori* (57). As vacinas com uma maior relevância para os estudos feitos até ao momento encontram-se descritas na tabela 7.

Tabela 7 - Lista de vacinas recombinantes baseadas nas proteínas CagA e/ou VacA. Adaptado de (4)

Vaccine component(s)	Administration route(s)	Expression host	Protective Response(s)	Animal/Human	Reference
CagA-VacA-UreB	Oral	<i>S. typhimurium</i> X4550	IgG, IgA, Th1	BALB/c mice	K.-Y. Liu et al. (2011)
HP3 (VacA, CagA, NAP)	Intramuscular	<i>E. coli</i>	IgG, Th1	Human	Malfertheiner et al. (2008)
Brucella OMPs-CagA	Subcutaneous	<i>E. coli</i> BL21	IgG, Th1	BALB/c mice	Abadi et al. (2018)

Abbreviations: CagA, cytotoxin-associated gene A; NAP, neutrophil-activating protein; OMPs, outer membrane proteins; VacA, vacuolating cytotoxin A.

## 8.5 Situação atual dos ensaios clínicos de potenciais candidatos a vacina

Após extensos estudos pré-clínicos que exploraram um conjunto de abordagens com a visão de alcançar um design estável de uma vacina contra *H. pylori*, apenas três vacinas candidatas progrediram para a fase de ensaios clínicos (58). Estas encontram-se listadas na tabela 8.

Tabela 8 - Vacinas candidatas em estudo de ensaios clínicos. Adaptado de (49)

Vaccine component(s)	Administration route (s)	Used adjuvant	Clinical trial phase	Reference
Whole-Cell	Oral	LT toxin	Phase 1	Kotloff et al. (2001)
HP3 (VacA, CagA, NAP)	Intramuscular	Aluminum hydroxide	Phase 1/2	Malfertheiner et al. (2018)
Urease B	Oral	LT toxin	Phase 3	Zeng et al. (2015)
Ty21a (urease or HP0231)	Oral	None	Phase 1	Aebischer et al. (2008)

Infelizmente, todas as três abordagens falharam em fornecer um potencial candidato para mais estudos de desenvolvimento. Isto deve-se em parte por um conjunto de contratempos não antecipados no decorrer dos testes, mesmo estes serem baseados em dados pré-clínicos (58).

A vacina contendo a toxina LT como adjuvante, desencadeou efeitos adversos, tal como a diarreia, numa grande porção da população de voluntários. Um dos outros fatores que contribuíram para o insucesso desta vacina foi o facto da colonização por parte de *H. pylori* não ter sido estudada devidamente, constituindo assim numa incógnita relativamente à eficácia a longo prazo da vacina (58).

A vacina baseada em *S. Typhimurium* Ty21a, embora tenha provado ser seguro e ter sido bem-sucedida em desencadear fortes respostas imunológicas por parte do hospedeiro, inesperadamente produziu fracas respostas imunes ao antígeno urease e apenas diminuiu a carga bacteriana em alguns voluntários. Outro aspeto a ter em consideração nesta abordagem, é a existência de uma imunidade à *Salmonella*, dificultando a absorção desta durante as imunizações de reforço (58).

As duas abordagens descritas acima, basearam-se na administração por via mucosa. Malfertheiner e os seus colegas decidiram investigar uma via de administração diferente. Resolveram apostar na administração parental de uma mistura de antígenos (CagA, VacA e

NapA), usando como adjuvante o hidróxido de alumínio. Esta abordagem resultou numa forte resposta imune em voluntários saudáveis, não contaminados (58).

Com base nestes resultados encorajadores, alguns investigadores iniciaram um estudo clínico com a mesma imunização intramuscular combinado com CagA + Baylor strain 300. Tendo como alicerce os dados provenientes desses estudos, podemos concluir que, em comparação com o placebo, esta abordagem não conferiu nenhuma proteção adicional contra a infeção por *H. pylori*, apesar da forte indução de anticorpos específicos do antigénio e células T. Foi também detetada uma grande eliminação espontânea da infeção nos voluntários adultos, concluindo que estes não são indivíduos ideais para testar a eficácia da vacina (58).

Posto isto, Malfetheriner e alguns colegas sugeriram a realização dos próximos ensaios em crianças infetadas naturalmente.

Esta proposta foi aplicada num ensaio de fase III realizado em Nanjing, China entre os anos 2005 e 2007. Apesar de ser uma forte candidata, esta vacina foi posta de lado devido a alguns empecilhos por parte dos voluntários, e tendo em conta que o mesmo foi realizado há mais de 10 anos, o futuro desta vacina permanece obscuro (58).

## 8.6 Estratégias de design para uma nova geração de vacinas candidatas contra *H. pylori*

As vacinas baseadas em um único antigénio provaram ser menos propensas a induzirem uma proteção amplamente eficaz. Posto isto, torna-se claro a razão pela escolha de vacinas de múltiplos antígenos (58).

Existem dois principais desafios a ter em conta no design de uma vacina universal contra *H. pylori* para aplicação global:

1. A variação das estirpes de *H. pylori* em diferentes regiões do globo implica a inclusão de uma ampla gama de antígenos para cobrir todas elas (58);
2. As vacinas de subunidades terão de ser cuidadosamente projetadas de forma a ter em conta o largo espectro das diferentes estirpes (58).

O segundo desafio pode ser superado pelo uso da abordagem das vacinas de células inteiras, porém, ainda não está claro se mesmo estas conseguem induzir proteção contra todas as estirpes (58).

Ali e alguns colegas tentaram trazer alternativas para ultrapassar essas barreiras, usando uma abordagem genômica e patogénica comparativa. O estudo selecionou regiões conservadas do genoma e usando mecanismos computacionais tentaram identificar proteínas que podem ser usadas como potenciais alvos terapêuticos (58).

Embora o fundamento desta abordagem seja sólido, os desafios surgidos indicam a necessidade de uma nova abordagem (58).

## 9. Discussão

Nesta presente monografia foram abordadas inúmeras estratégias de desenvolvimento de vacinas contra *H. pylori*. Não obstante, nenhuma conseguiu chegar ao mercado comercial atualmente. Ao que se deve este impasse nas investigações?

Existe disponível uma grande variedade de modelos animais para serem usados nos ensaios clínicos. Os modelos de eleição são os ratos devido ao seu curto ciclo de vida. Contudo, apresentam algumas limitações (5).

Algumas vacinas que apresentam eficácia em ratos, falham em demonstrar esta mesma eficácia em humanos. Pode ser devido à indução insuficiente de proteção nos ratos ou, pode ainda refletir uma má transferência da eficácia relativamente à proteção, entre ratos e humanos, não podendo excluir as limitações dos estudos da vacina em humanos (5).

Entretanto, existem benefícios potenciais em usar outros animais como intermediário para confirmar as observações feitas nos ratos, antes de se passar para os ensaios clínicos. O *Rhesus macaque* (*Macaca Mulatta*) demonstra ser um modelo primata não humano de qualidade, uma vez que são facilmente (se não já) infetados com *H. pylori*, podendo ser usados para rastrear vacinas candidatas. Tais estudos forneceriam dados importantes para aprovação clínica/regulamentar, antes de ensaios em humanos (59).

Um outro aspeto crítico no desenvolvimento da vacina consiste no facto desta ser dada como forma de prevenção ou de tratamento. Um fator chave a considerar é que enquanto a infeção inicia-se predominantemente muito cedo na vida das pessoas, o cancro gástrico desenvolve-se habitualmente a partir dos 50 anos. Portanto, uma vacina profilática iria provavelmente precisar de ser administrada em crianças nos primeiros dias de vida, a fim de se conseguir alcançar um elevado grau de proteção (5).

No entanto, uma vacina terapêutica eficaz poderia ser administrada em quase todas as faixas etárias e ainda assim ser capaz de proteger do cancro gástrico, embora seja preferível a administração antes dos 40 anos para aumentar as hipóteses de prevenção do cancro (60).

A escolha entre prevenção e tratamento é de extrema importância uma vez que *H. pylori* pode induzir um vasto leque de efeitos imunossupressores que ajuda a facilitar a sua colonização. Tais características opor-se-iam potencialmente à eficácia de uma vacina

terapêutica. Por esta razão, a proteção após a vacinação terapêutica é geralmente considerada mais difícil de alcançar do que a vacinação profilática (5).

Em suma, existe uma necessidade considerável de uma vacina para proteção contra doenças associadas à infecção por *H. pylori*, e especificamente o cancro gástrico.

Uma observação interessante que surgiu na última década foi que a infecção por *H. pylori* pode proteger contra várias doenças aparentemente não relacionadas. Embora as evidências ainda estejam em processo de estudo e não serem completamente certas, um papel protetor da infecção por *H. pylori* parece ser possível para uma grande variedade de condições, incluindo a doença do refluxo esofágico e cancro de esófago (possivelmente mediado pela supressão da secreção do ácido gástrico por parte da bactéria *H. pylori*), doença inflamatória intestinal e asma. Posto isto, será de extrema importância a monitorização de quaisquer efeitos negativos que a remoção da proteção de *H. pylori* provavelmente possa provocar, caso seja desenvolvida e implementada uma vacina eficaz contra a mesma (5).

## 10. Conclusão

*H. pylori* é um agente patogénico fortemente associado a uma grande variedade de doenças do foro gástrico, sendo algumas delas letais para o hospedeiro humano, como por exemplo, o cancro gástrico, e que afeta uma elevada porção da população mundial. Ao longo dos anos, esta bactéria tem contribuído para um decréscimo dos níveis da saúde mundial, constituindo assim, uma ameaça aos diferentes sistemas de saúde ao redor do mundo, tornando-se assim num alvo a combater.

Embora a bactéria tenha sido descoberta há mais de 30 anos, a única terapêutica existente para o tratamento da *H. pylori* baseia-se numa combinação de antibióticos e bombas inibidores de prótons. Este tipo de terapêutica está associado a um grande leque de problemas, sendo os mais preocupantes a resistência a antibióticos e a não prevenção a reinfeção. Perante o aumento constante da ineficácia da terapêutica usada atualmente, torna-se bastante evidente a necessidade de se desenvolver uma vacina eficaz contra a *H. pylori*.

Nos últimos anos, a *H. pylori* tem sido alvo de estudos intensos a fim de se perceber qual o tipo de imunidade eficiente na erradicação da mesma. Contudo, o desenvolvimento de tal vacina encontrou problemas significativos, que refletem na situação vivida atualmente, onde não existe um programa avançado de estudo por parte das grandes indústrias farmacêuticas. Posto isto, torna-se muito claro a necessidade de investimento nesta área de estudo, com o objetivo de se desenvolver abordagens inovadoras para superar as barreiras encontradas ao longo desses anos de investigação.

O farmacêutico desempenha um papel muito importante quer na sensibilização do doente e na orientação e acompanhamento do tratamento, bem como no contributo à investigação e desenvolvimento de vacinas eficazes contra a infeção da bactéria.

Neste trabalho tentamos abordar as principais características relacionadas a *H. pylori* e ao desenvolvimento de novas abordagens de terapêuticas, com o intuito de dar a conhecer as grandes conquistas e descobertas feitas até o dia de hoje, bem como as estratégias e os desafios futuros.

## 11. Referencias Bibliográficas

1. Pasala C, Chilamakuri CSR, Katari SK, Nalamolu RM, Bitla AR, Umamaheswari A. An in silico study: Novel targets for potential drug and vaccine design against drug resistant *H. pylori*. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;122(May):156–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.037>
2. Chen J, Li N, She F. *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein DNA vaccine-loaded bacterial ghost enhances immune protective efficacy in C57BL/6 mice. *Vaccine* [Internet]. 2014;32(46):6054–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.014>
3. Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):449–90.
4. Keikha M, Eslami M, Yousefi B, Ghasemian A, Karbalaee M. Potential antigen candidates for subunit vaccine development against *Helicobacter pylori* infection. *J Cell Physiol*. 2019;234(12):21460–70.
5. Sutton P, Boag JM. Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori*. *Vaccine* [Internet]. 2019;37(50):7295–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.001>
6. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* [Internet]. 2017;153(2):420–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
7. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*. 2009 May; Bone. 2011;23(1):1–7.
8. Covacci A, Rappuoli R. *Helicobacter pylori*: After the genomes, back to biology. *J Exp Med*. 2003;197(7):807–11.
9. Vaz SMR. Melhoramento de uma vacina multi-antigénica contra a *Helicobacter pylori*. Melhoramento de uma vacina multi-antigénica contra a *Helicobacter pylori*. 2014;
10. Kayali S, Manfredi M, Gaiani F, Bianchi L, Bizzarri B, Leandro G, et al. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: State of the art. *Acta Biomed*. 2018;89(6):72–6.
11. Weyermann M, Rothenbacher D, Brenner H. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in early childhood: Independent contributions of infected mothers, fathers, and siblings. *Am J Gastroenterol*. 2009;104(1):182–9.
12. Bürgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller KA, Lehn N, et al. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *Eur J Oral Sci*. 2008;116(4):297–304.
13. Gebara ECE, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MPA, Lima LAPA. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J Clin Periodontol*. 2006;33(5):329–33.
14. Queralt N, Bartolomé R, Araujo R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J Appl*

- Microbiol. 2005;98(4):889–95.
15. Oderda G, Rapa A, Ronchi B, Lerro P, Pastore M, Staiano A, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by non-invasive antigen enzyme immunoassay in children : multicentre Italian study Effect of hormone replacement therapy on the pathological stage of breast cancer : population based , cross sectional st. 2000;320(February).
  16. Bizri ARN, Nuwayhid IA, Hamadeh GN, Steitieh SW, Choukair AM, Musharrafieh UM. Association between hepatitis A virus and *Helicobacter pylori* in a developing country: The saga continues. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(10):1615–21.
  17. Vale FF, Vítor JMB. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010;138(1–2):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.016>
  18. Zhang YY, Xia HHX, Zhuang ZH, Zhong J. Review article: “True” re-infection of *Helicobacter pylori* after successful eradication - Worldwide annual rates, risk factors and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29(2):145–60.
  19. Leal YA, Flores LL, Fuentes-Pananá EM, Cedillo-Rivera R, Torres J. 13C-Urea Breath Test for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Helicobacter.* 2011;16(4):327–37.
  20. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther Suppl.* 2002;16(1):16–23.
  21. Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: Review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr.* 2010;169(1):15–25.
  22. Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.* 2012;17(SUPPL.1):1–8.
  23. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(2):280–322.
  24. Granstrom M, Lehours P, Bengtsson C, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2008;13(SUPPL.1):7–12.
  25. Chen J, Lin M, Li N, Lin L, She F. Therapeutic vaccination with Salmonella-delivered codon-optimized outer inflammatory protein DNA vaccine enhances protection in *Helicobacter pylori* infected mice. *Vaccine* [Internet]. 2012;30(36):5310–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.052>
  26. Abadi ATB. Vaccine against *Helicobacter pylori*: Inevitable approach. *World J Gastroenterol.* 2016;22(11):3150–7.
  27. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann Med* [Internet]. 2018;50(2):110–20. Available from: <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035>
  28. Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis.* 2011;3(1):73–8.
  29. Stanley Plotkin Walter Orenstein Paul Offit. *Vaccines.* 2012.
  30. Kim TH, Johnstone J, Loeb M. Vaccine herd effect. *Scand J Infect Dis.* 2011;43(9):683–9.

31. Hajj Hussein I, Chams N, Chams S, El Sayegh S, Badran R, Raad M, et al. Vaccines Through Centuries: Major Cornerstones of Global Health. *Front Public Heal.* 2015;3(November):1–16.
32. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol* [Internet]. 2011;12(6):509–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2039>
33. Ramezanpour B, Haan I, Osterhaus A, Claassen E. Vector-based genetically modified vaccines: Exploiting Jenner’s legacy. *Vaccine* [Internet]. 2016;34(50):6436–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.059>
34. Zeng M, Mao XH, Li JX, Tong W De, Wang B, Zhang YJ, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2015;386(10002):1457–64.
35. Suganya K, Prem Kumar A, Sekar B, Sundaran B. Protection of mice against gastric colonization of *Helicobacter pylori* by therapeutic immunization with systemic whole cell inactivated vaccines. *Biologicals* [Internet]. 2017;45:39–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.10.002>
36. Li HB, Zhang JY, He YF, Chen L, Li B, Liu KY, et al. Systemic immunization with an epitope-based vaccine elicits a Th1-biased response and provides protection against *Helicobacter pylori* in mice. *Vaccine* [Internet]. 2012;31(1):120–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.091>
37. Tan Z, Liu W, Liu H, Li C, Zhang Y, Meng X, et al. Oral *Helicobacter pylori* vaccine-encapsulated acid-resistant HP55/PLGA nanoparticles promote immune protection. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2017;111:33–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.007>
38. Uddin M, Allon A, Roni MA, Kouzi S. Overview and future potential of fast dissolving buccal films as drug delivery system for vaccines. *J Pharm Pharm Sci.* 2019;22(1):388–406.
39. Morais S, Ferro A, Bastos A, Castro C, Lunet N, Peleteiro B. Trends in gastric cancer mortality and in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Portugal. *Eur J Cancer Prev.* 2016;25(4):275–81.
40. Ruggiero P, Peppoloni S, Rappuoli R, Del Giudice G. The quest for a vaccine against *Helicobacter pylori*: How to move from mouse to man? *Microbes Infect.* 2003;5(8):749–56.
41. Liu KY, Shi Y, Luo P, Yu S, Chen L, Zhao Z, et al. Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(38):6679–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.099>
42. Bauer B, Meyer TF. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease . *Ulcers.* 2011;2011:1–23.
43. Prinz C, Hafsi N, Volland P. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: Implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol.* 2003;11(3):134–8.

44. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(4):320–32.
45. Chmiela M, Kupcinskas J. Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2019;24(S1):1–5.
46. Junaid M, Linn AK, Javadi MB, Al-Gubare S, Ali N, Katzenmeier G. Vacuolating cytotoxin A (VacA) - A multi-talented pore-forming toxin from *Helicobacter pylori*. *Toxicon* [Internet]. 2016;118:27–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.04.037>
47. Stein M, Ruggiero P, Rappuoli R, Bagnoli F. *Helicobacter pylori* CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine. *Front Immunol.* 2013;4(October).
48. Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Hayashi T, Higashi H, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2010;7(5):399–411. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.04.005>
49. Schmalstig AA, Benoit SL, Misra SK, Sharp JS, Maier RJ. Noncatalytic antioxidant role for *Helicobacter pylori* urease. *J Bacteriol.* 2018;200(17):1–11.
50. Chen S, Zhang R, Duan G, Shi J. Food-grade expression of *Helicobacter pylori* UreB subunit in *Lactococcus lactis* and its immunoreactivity. *Curr Microbiol.* 2011;62(6):1726–31.
51. Meza B, Ascencio F, Sierra-Beltrán AP, Torres J, Angulo C. A novel design of a multi-antigenic, multistage and multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori*: An in silico approach. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2017;49:309–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.007>
52. Dias PCG. Avaliação da resposta imune induzida por diferentes adjuvantes e sua aplicação no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra Leptospirose. 2016;87.
53. Svennerholm AM, Lundgren A. Progress in vaccine development against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;50(2):146–56.
54. Celestino BJ dos SDL. Estratégias no desenvolvimento de vacinas contra *Helicobacter pylori*. 2019;1–38.
55. Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C RR. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* 2001;19:523–63 doi 10.1146/annurev.immunol.19.523 PMID 11244046. 40(X):1–24.
56. Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immun.* 2001;69(6):3581–90.
57. El Khadir M, Alaoui Boukhris S, Benajah DA, El Rhazi K, Adil Ibrahimi S, El Abkari M, et al. VacA and CagA status as biomarker of two opposite end outcomes of *Helicobacter pylori* infection (gastric cancer and duodenal ulcer) in a Moroccan population. *PLoS One.* 2017;12(1):1–14.
58. Walduck AK, Raghavan S. Immunity and Vaccine Development Against *Helicobacter*

- pylori. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1149:257–75.
59. Solnick J V., Canfield DR, Hansen LM, Torabian SZ. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease in specific- pathogen-free rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immun.* 2000;68(5):2560–5.
  60. Lee YC, Chiang TH, Chou CK, Tu YK, Liao WC, Wu MS, et al. Association between *Helicobacter pylori* Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* [Internet]. 2016;150(5):1113-1124.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.028>