

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



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

Bruno José dos Santos Duarte Lopes Celestino

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



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

Bruno José dos Santos Duarte Lopes Celestino

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Orientadora: Professora Doutora Lídia Maria Diogo Gonçalves

2019

Resumo

A presente monografia tem como objetivo dar a conhecer a bactéria *Helicobacter pylori* no geral e, mais especificamente, as principais estratégias utilizadas até agora no desenvolvimento de uma vacina capaz de a erradicar.

Este microrganismo, uma bactéria helicoidal *gram* negativa, ainda que necessite de um meio bastante específico para crescer, tem conseguido sobreviver ao ambiente ácido do estômago que até à descoberta desta bactéria era considerado estéril. Através do seu mecanismo fisiopatológico desencadeia uma intensa resposta imune por parte do hospedeiro, provocando um conjunto de patologias tanto gástricas como não gástricas, sendo a consequência mais grave o cancro gástrico, considerado a terceira causa mais frequente de morte provocada por cancro.

O *Helicobacter pylori* apresenta uma distribuição mundial, com maior prevalência nos países em desenvolvimento. O tratamento preconizado para a sua erradicação engloba a utilização de antibióticos em concomitância com inibidores da bomba de prótons, sendo considerado de difícil execução pois uma elevada taxa de doentes submetidos à terapêutica não obtém o sucesso pretendido, em grande parte por desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos utilizados.

Por tal motivo, surgem iniciativas de desenvolvimento de uma vacina capaz de erradicar este organismo bacteriano. As diversas tentativas realizadas têm-se focado fundamentalmente em encontrar a melhor via de administração possível, assim como os melhores adjuvantes e antigénios, que possam favorecer a indução de uma resposta imunitária forte por parte do hospedeiro. A vacina poderá ser profilática ou utilizada enquanto terapêutica após infeção. Até à data não existe nenhuma comercializada para este efeito, ainda que muitos ensaios clínicos tenham vindo a ser desenvolvidos. Uma vacina chegou à fase III dos ensaios clínicos, mas posteriormente foi descontinuada, tendo sido até agora a abordagem mais próxima de uma vacina chegar ao mercado.

Finalmente, como se conclui na presente monografia, grande parte do desenvolvimento existente até agora tem sido efetuado por pequenos laboratórios. Onde, revelando-se necessário um maior investimento por parte da indústria farmacêutica para a realização de ensaios clínicos mais satisfatórios e conclusivos que possam culminar numa vacina capaz de erradicar o *Helicobacter pylori*.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*; Ensaio clínico; Vacina; Cancro gástrico

Abstract

The present monograph has the purpose to present the generality of *Helicobacter pylori* bacteria, and more specifically the main strategies used on the development of a vaccine capable of eradicate the bacteria.

Even though this helical gram negative microorganism requires an extremely specific environment to grow, it has been able to survive the gastric acid environment, considered as sterile until the discovery of *Helicobacter pylori*. By the means of its pathophysiological mechanism, an immune response is going to be triggered in the host, leading to a set of gastric and non gastric diseases. The gastric cancer is undoubtedly the worst possible consequence, being the third most frequent cause of death by cancer.

The *Helicobacter pylori* has a worldwide spread and its prevalence rates are higher in the undeveloped countries. The standard treatment for the bacteria eradication incorporates antibiotics and proton pump inhibitors. This treatment is considered hard to be successful by the increased rate of ill patients exposed to the treatment, wich do not have the desired success.

The initiative of developing a vaccine capable of eradicate the bacterial organism arises. Most of the attempts have the main focus of finding the best route of administration as well as the best antigens and adjuvants that may increase the induction of a strong host immune response. This vaccine might be prophylactic or used as therapeutic after infection. So far there is none commercialized for this effect even though many clinical trials are being developed. Only one vaccine achieved the phase III of clinical trials, but it was later discontinued and that was the closest approach so far from an effective vaccine.

Finally, on this monograph we conclude that much of the development available so far has been carried by small laboratories. It is need a bigger investment from the pharmaceutical industry to provide more satisfactory and conclusive clinical trials that may result on a vaccine capable of eliminate the *Helicobacter pylori*.

Key words: *Helicobacter pylori*; Clinical trial; Vaccine; Gastric cancer

Índice

RESUMO	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3 HELICOBACTER PYLORI	12
3.1 CARACTERIZAÇÃO.....	12
3.2 EPIDEMIOLOGIA.....	12
3.2.1 <i>Prevalência em Portugal e no mundo</i>	12
3.2.2 <i>Transmissão</i>	14
3.3 ADAPTAÇÃO AO AMBIENTE GÁSTRICO.....	15
3.3.1 <i>Fisiopatologia</i>	15
3.3.2 <i>Resposta imune</i>	17
3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	18
3.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	19
3.6 TRATAMENTO.....	21
3.6.1 <i>Esquemas terapêuticos</i>	22
3.6.1 a) Primeira linha de tratamento.....	22
3.6.1 b) Segunda linha de tratamento	23
3.6.1 c) Terceira linha de tratamento	23
3.6.2 <i>Resistências bacterianas aos antibióticos</i>	24
3.6.3 <i>Probióticos</i>	25
4 ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO.....	26
4.1 INTRODUÇÃO À VACINAÇÃO.....	26
4.2 ANTIGÉNIOS.....	26
4.3 ADJUVANTES	27
4.4 VACINAÇÃO EM HELICOBACTER PYLORI.....	28
4.4.1 <i>Modelos animais</i>	29
4.4.2 <i>Ensaio clínicos</i>	31
5 CONCLUSÕES E DISCUSSÃO	33
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

Índice de figuras

FIGURA 1 - MAPA MUNDO COM AS DIFERENTES TAXAS DE PREVALÊNCIA	14
FIGURA 2 - PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PROVOCADA POR <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	15
FIGURA 3 - CARCINOGENESE GÁSTRICA.....	19
FIGURA 4 – IMAGENS DE ENDOSCOPIAS REALIZADAS AO ESTÔMAGO.	20
FIGURA 5 - MAPA MUNDO E AS DIFERENTES TAXAS DE RESISTÊNCIA (34).....	24
FIGURA 6 - ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO E RESPECTIVOS LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO.....	33

Índice de tabelas

TABELA 1 - REGIME UTILIZADO EM PRIMEIRA LINHA DE TRATAMENTO COM OS FÁRMACOS E RESPETIVAS POSOLOGIAS, PARA REGIÕES COM BAIXAS TAXAS DE RESISTÊNCIA A CLARITROMICINA.....	22
TABELA 2 –PRINCIPAIS VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MODELOS ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	30
TABELA 3 –ESTADO DE DESENVOLVIMENTO DOS ENSAIOS CLÍNICOS PARA VACINAS CANDIDATAS ATUALMENTE AO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA BACTÉRIA <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	31

1 Introdução

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou o microrganismo *Helicobacter pylori* (Hp) como um agente carcinogéneo do Grupo 1, havendo uma associação direta desta bactéria ao desenvolvimento de adenocarcinomas gástricos e, por esse motivo, o seu tratamento e erradicação são uma prioridade (1).

No entanto, existem vários fatores que dificultam o tratamento e a erradicação da infeção por Hp: cada vez mais são relatados desenvolvimentos de resistências a antibióticos; A ação dos antimicrobianos no estômago é dificultada pelo ambiente gástrico ácido e pela sua extensão, que acaba por dificultar uma distribuição uniforme dos fármacos; A não adesão dos doentes à terapêutica; Os tratamentos feitos hoje em dia serem menos acessíveis para as populações dos países em desenvolvimento (2). Todos estes fatores contribuem para a elevada prevalência da bactéria em Portugal e no Mundo, estimando-se que aproximadamente 50% da população mundial esteja infetada (3).

O conjunto das circunstâncias acima descritas sugere a necessidade de novas opções terapêuticas e uma solução para o problema seria o desenvolvimento de uma vacina que fosse eficaz a nível de prevenção ou tratamento.

O objetivo da presente monografia é então o de reunir as principais estratégias utilizadas até agora nas tentativas de desenvolvimento de tal vacina e de dar a conhecer os principais, e mais promissores, ensaios clínicos realizados tendo em conta o mecanismo fisiopatológico do *Helicobacter pylori* e a respetiva resposta imune desencadeada no organismo do hospedeiro.

2 Materiais e métodos

No desenvolvimento desta monografia, uma revisão bibliográfica, foram utilizadas as bases de dados PubMed, NCBI e Google Scholar, utilizando as seguintes palavras e expressões para a pesquisa de artigos científicos de revisão, ensaios clínicos e relatórios: “*H. pylori*”, “gastric cancer”, “bacteriology”, “infection”, “eradication”, “virulence factors”, “diagnosis”, “treatment”, “vaccination”, “clinical trials”, “transmission”. Estes termos foram muitas vezes utilizados em associação com outros termos mais específicos do assunto em estudo. A pesquisa foi elaborada entre fevereiro e agosto de 2019, procurando limitar a utilização de artigos publicados antes de 2000, salvo raras exceções, primando sempre pela relevância da informação. As fontes consultadas encontram-se escritas em Inglês na sua maioria, ainda que alguns artigos sejam de origem nacional e apresentados em português. Alguma da informação relativamente à vacinação foi também consultada nas plataformas online da Direção Geral da Saúde e da Organização Mundial da Saúde.

A gestão das referências bibliográficas e, posteriormente, a inserção da bibliografia foram realizadas utilizando a aplicação *Mendeley Desktop*, dando seguimento às normas do formato Vancouver.

3 Helicobacter Pylori

3.1 Caracterização

O género *Helicobacter* pertence à subdivisão *ípsilon*, do filo das *Proteobacterias*, ordem *Campylobacterales*, família *Helicobacteraceae*. Este género apresenta mais de 20 espécies, sendo que muitas delas ainda aguardam o seu reconhecimento formal (4). O *Helicobacter pylori*, uma das espécies, é uma bactéria *gram* negativa (2), que apresenta uma forma helicoidal, que lhe permite uma boa mobilidade e uma colonização com sucesso (5). Apresentando de 2 a 4 µm em comprimento e cerca de 0,5 a 1 µm em largura, por vezes, em vez da sua forma predominantemente espiral, pode surgir em formas cocóides ou de haste, após períodos prolongados em cultura *in vitro* ou após tratamento prolongado com recurso a antibióticos. Este organismo apresenta de 2 a 6 flagelos, com aproximadamente 3 µm de comprimento cada, que fornecem à bactéria capacidade para se movimentar em soluções viscosas como a mucosa que reveste o lúmen gástrico (4). Esta bactéria flagelada move-se por quimiotaxia, uma locomoção orientada e unidirecional ao longo de um gradiente químico, que lhe permite controlar a sua trajetória em resposta a estímulos químicos extracelulares (5). O genoma desta espécie apresenta aproximadamente 1,7 Mbp e cerca de 1587 genes, apresentando por norma um conteúdo em Guanina e Citosina entre 35 e 40% (4)

Esta espécie é microaerófila com crescimento ótimo quando os níveis de oxigénio se encontram entre os 2 e os 5% e os níveis de dióxido de carbono entre os 5 e os 10%, de preferência, associado a um ambiente bastante húmido. Relativamente às condições ideais de temperatura, o crescimento é favorecido entre os 34 e os 40 °C, sendo a temperatura ótima 37 °C. O *Helicobacter pylori* consegue ainda sobreviver a breves exposições a ambientes com valor de pH inferior a 4, mas o seu desenvolvimento ocorre preferencialmente a valores de pH mais neutros (entre os 5,5 e os 8,0) (6). Este organismo bacteriano é urease, catalase e oxidase positiva, características que são diversas vezes utilizadas para a sua identificação, e as suas colónias caracterizam-se por ser pequenas e translúcidas, podendo ser observadas desde o terceiro até ao décimo quarto dia, após isolamento (4).

3.2 Epidemiologia

3.2.1 Prevalência em Portugal e no mundo

A presença da bactéria no estômago de mamíferos começou a ser isolada desde o século XIX (7), ainda que só tenha sido descrita em 1983 por Barry Marshal e Robin Warren, que a reportaram pela primeira vez na Austrália, através de biópsias gástricas (8). Inicialmente a bactéria era descrita com os nomes “*Campylobacter-like organism*”, “*gastric Campylobacter-like organism*”, “*Campylobacter pyloridis*” e ainda “*Campylobacter pylori*”. Em 1994, este microrganismo veio a ser classificado como um carcinogéneo tipo 1 pela IARC (International Agency for Research on Cancer) (1). Após o seu estudo, em 2005, Marshal e Warren receberam o prémio Nobel em Fisiologia ou Medicina pelo seu trabalho “descoberta da bactéria

Helicobacter pylori e o seu papel na gastrite e na úlcera péptica.” (7). Cedo se percebeu que esta bactéria era capaz de causar gastrite crónica e que, em certos casos, poderia evoluir para condições mais preocupantes como úlcera péptica e ainda adenocarcinomas e linfomas gástricos (4).

Desde então muitos estudos têm sido realizados, em modelos animais, para a infeção de *Helicobacter pylori* e os mesmos têm sido muito importantes no desenvolvimento de estratégias de imunização. Desde os primeiros estudos ficou demonstrado que seria possível reduzir a colonização da bactéria, por intermédio de vacinas, utilizando antigénios e adjuvantes. Surgem assim várias formulações de vacinas, na tentativa de desenvolver uma que seja verdadeiramente eficaz (9).

A infeção pela bactéria *Helicobacter pylori* é bastante comum por todo o Mundo, variando a sua prevalência de acordo com a área geográfica (ver figura 1). Estima-se que cerca de 50% da população humana mundial esteja infetada, abrangendo todas as faixas etárias (3). A prevalência da bactéria varia bastante geograficamente. Nos países desenvolvidos, geralmente, menos de 40% da população está infetada pelo microrganismo e este valor é consideravelmente mais baixo em crianças e adolescentes (4). Já nos países em desenvolvimento este valor é bem mais elevado (10), estimando-se que mais de 80% da população esteja infetada, abrangendo mesmo as idades mais jovens (4). Em Portugal, a prevalência da infeção pela bactéria é de cerca de 84,2% em adultos, 66,2% em adolescentes e 31,6% em crianças (11,12).

Além da área geográfica, a prevalência neste caso é também inversamente proporcional relativamente às condições socioeconómicas. A melhoria das condições de saneamento e higiene e o tratamento antimicrobiano são fundamentais para a redução destas taxas (4).

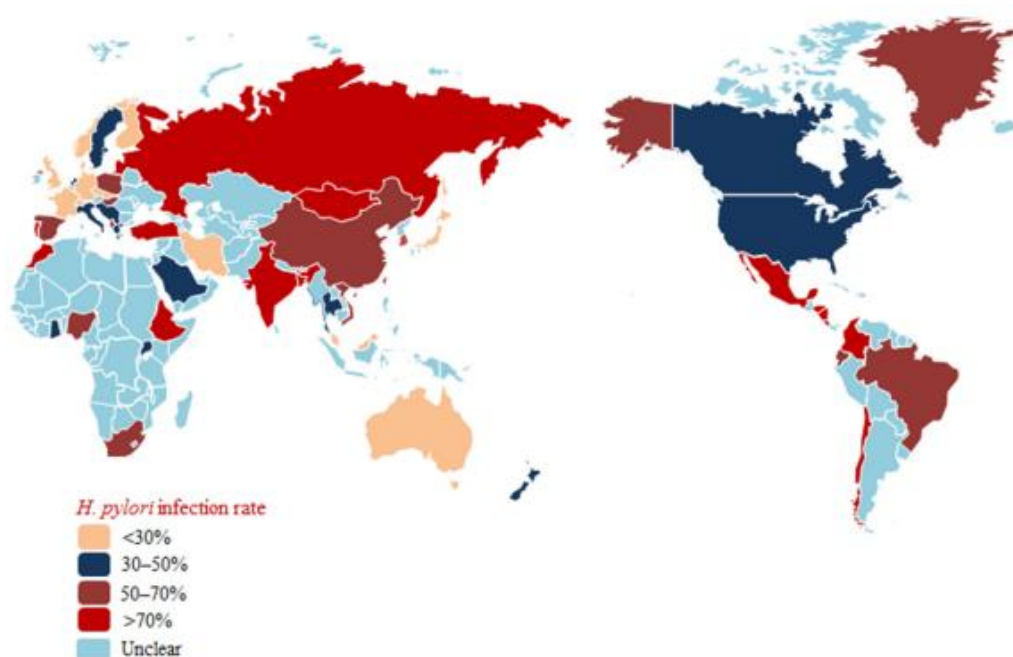


Figura 1 - Mapa Mundo, representado as diferentes taxas de prevalência ao longo do globo de infeção por *Helicobacter pylori*. Adaptado de Yi Hu, Yin Zhu e Nong Hua Lu, de 2017 (13)

3.2.2 Transmissão

O mecanismo exato pelo qual a bactéria *Helicobacter pylori* é adquirida ainda é desconhecido. Podemos distinguir dois tipos diferentes de transmissão: vertical ou horizontal. O modelo de transmissão vertical caracteriza-se pela propagação da infeção ao descendente através da mãe, enquanto o modelo horizontal envolve contágio, através do contacto com outros indivíduos ou com o ambiente envolvente (14).

Esta bactéria apresenta uma quantidade restrita de hospedeiros, sendo encontrada quase exclusivamente em humanos e em poucos primatas não humanos (4). A bactéria já foi isolada de outros animais, mas até agora não há evidências conclusivas de que possa existir uma transmissão zoonótica, sendo que as novas infeções provavelmente ocorrem como consequência de transmissão humano-humano (4). A infeção é predominantemente adquirida em idades jovens, durante a infância e, normalmente, persiste ao longo da vida do hospedeiro se não for realizado um tratamento (10,14). É recorrente a transmissão no seio familiar, pois, o contacto interpessoal próximo, característico do ambiente da família, facilita o contágio, existe partilha de uma predisposição genética para a infeção e ainda, os membros da família estão expostos aos mesmo agentes e partilham as mesmas condições socioeconómicas (14). É possível isolar o microrganismo de vômito, o que sugere que a sua transmissão seja feita por via oral. Ainda assim, o modelo de transmissão da bactéria permanece um tema bastante controverso. É possível que exista também uma transmissão oro-fecal, principalmente em áreas com condições sanitárias mais fracas (10). Além do vômito, ela também é encontrada em

saliva, refluxo gástrico, fezes (4) e, bem assim, já foi detetada em água e no leite. Isto sugere que possivelmente possam ainda existir outros mecanismos de transmissão (7).

3.3 Adaptação ao ambiente gástrico

3.3.1 Fisiopatologia

O mecanismo fisiopatológico da bactéria pode ser descrito como um processo dividido em várias fases (Ver figura 2). Iniciando-se pela entrada e colonização da bactéria na mucosa gástrica com posterior evasão da resposta imunitária do hospedeiro, ela vai produzir toxinas e adaptar-se ao ambiente do estômago. Finalmente, já adaptada, o microrganismo vai-se multiplicar mediante condições específicas de oxigénio, dióxido de carbono, humidade, temperatura e valor de pH (15). A atividade da urease e a mobilidade providenciada pelo flagelo, facilitam a sobrevivência da bactéria e o seu movimento em direção à camada epitelial. Esta ação, é seguida pela adesão a esta camada, através da interação de proteínas ligantes, adesinas e outras proteínas da membrana externa com recetores das células epiteliais do hospedeiro. Após colonização, toxinas como a CagA e VacA vão induzir dano nos tecidos alvo e farão a sua replicação no interior destas células

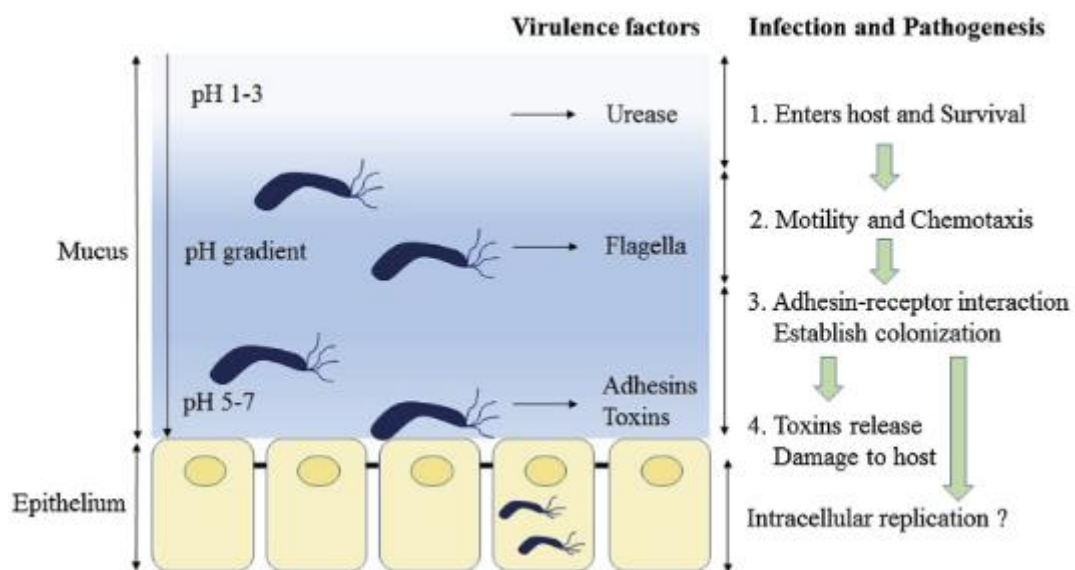


Figura 2 - Diagrama esquemático da infecção provocada pela bactéria *Helicobacter pylori* e respetiva patogénese. Adaptado de Cheng-Yen Kao (15).

A urease, uma proteína abundantemente presente na estrutura do *Helicobacter pylori*, é essencial para o processo de colonização e mecanismo fisiopatológico do organismo bacteriano (16). A urease está dividida em duas unidades, UreA (27 kDa) e UreB (62 kDa) e constitui mais de 10% do conteúdo proteico total da bactéria. Esta catalisa a conversão de ureia a dióxido de carbono e amónia no estômago. A amónia, através da sua transformação em hidróxido de amónia, vai neutralizar o ácido adjacente à bactéria, aumentando o pH e reduzindo a

viscosidade, promovendo assim a sobrevivência da bactéria no estômago (7). A bactéria penetra a camada gástrica, mas não é capaz de atravessar a barreira epitelial. Sendo assim, este organismo vive livremente na mucosa do estômago e por vezes, adere também à superfície das células epiteliais (2,16). A mobilidade que permite a penetração na camada mucosa é conferida pelo flagelo, que é composto por várias subunidades proteicas (2) e constituído por três partes: o corpo basal, a junção e o filamento (17).

O cagPAI, (cag pathogenicity Island) é conhecido como o fator patogénico mais importante da infeção por *Helicobacter pylori* e está associado a um maior risco de cancro gástrico(5). Este codifica o gene CagA, que durante a infeção por *Helicobacter pylori* penetra o interior das células do hospedeiro e ativa diversas vias oncogénicas (5). Já no interior das células do hospedeiro, este gene é capaz de fosforilar, ocorrendo efeitos celulares dependentes da fosforilação da tirosina. Além disso, este gene consegue também provocar efeitos não dependentes da sua fosforilação, nomeadamente a secreção de IL-8. As estirpes que se apresentam positivas para a presença do CagA, são consideradas mais virulentas e estão mais vezes associadas à presença de úlceras pépticas e adenocarcinoma gástrico (18). A proteína VacA (Vacuolating Cytotoxin), designada desta maneira pela sua capacidade de induzir a formação de vacúolos in vitro (18), também codificada pelo cagPAI, é também um dos mais importantes fatores de virulência na patogénese da infeção. Esta está presente na maioria das estirpes e, ainda que não seja conhecido o seu mecanismo de ação, é conhecida pela sua capacidade de secreção de toxinas (5). É composta por hexâmeros ou heptâmeros de 88 kDa e cada uma destas subunidades é composta por duas porções distintas, a p33 e a p55. A p55 é necessária para a fixação às células alvo, enquanto que a porção p33 é necessária para a entrada da toxina nas mesmas (7). A citotoxina VacA, além de intoxicar as células epiteliais gástricas, também é capaz de o fazer com granulócitos, células dendríticas e linfócitos B e T, in vitro (3). A NAP (Neutrophil activating protein) é constituída por várias subunidades proteicas de 17 kDa. Esta induz a quimiotaxia e ativação direta e indireta de monócitos e neutrófilos, através da produção de radicais de Oxigénio. É então um factor inflamatório e imunomodulador de extrema importância na fisiopatologia da *Helicobacter pylori* (7).

A bactéria apresenta ainda lipopolissacarídeos na constituição da sua parede celular e um elevado número de adesinas. Estes constituintes bacterianos são responsáveis pelo acoplamento da bactéria às células epiteliais e pela indução de uma resposta inflamatória forte (4)

As bactérias de estirpes tipo 1, diferem das estirpes tipo 2. Enquanto as de tipo 1 têm na sua composição a presença da função cag-PAI funcional e intacta, produzindo VacA ativo, as de estirpe 2 normalmente apresentam deleções parciais ou completas no gene cagA, ou outras sequências essenciais de cag-PAI, expressando um gene VacA não funcional. Nos humanos, as estirpes 1 estão associadas a colonizações com maiores fatores de virulência acoplados. Esta estirpe é ainda capaz de resistir à morte provocada pela fagocitose, sendo a mais difícil de erradicar, mesmo através da utilização de terapêutica com antibióticos (3). Além de interferir, modulando a resposta imunitária do organismo do hospedeiro, a colonização por *Helicobacter pylori*, está também associada a alterações a nível genético. Uma das alterações mais prevalentes é a metilação de DNA nas células infetadas, promovendo uma inativação de

determinados genes, nomeadamente o p53. O p53 é uma proteína, que desempenha um papel importante na atividade de supressão tumoral, sendo crítica na prevenção de mutações genéticas. A inativação deste gene, estará certamente envolvida no desenvolvimento de carcinomas gástricos, caracteristicamente associados à infeção pela bactéria em estudo (19).

3.3.2 Resposta imune

Até hoje, à semelhança do mecanismo fisiopatológico, o conhecimento da resposta imunitária face à infeção por esta bactéria ainda se encontra bastante incompleto (20). A bactéria *Helicobacter pylori*, tem a capacidade de colonizar a camada gástrica, provocando uma ativação imunológica intensa numa primeira fase da infeção (21). A resposta imune direcionada para a infeção provocada por este organismo bacteriano foi primeiramente estudada em indivíduos infetados cronicamente, onde foi possível detetar que os humanos persistentemente colonizados pela bactéria, apresentam um grande aumento da concentração de diversos tipos de leucócitos, na biópsia da mucosa gástrica, quando comparados com indivíduos não infetados. Linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos, normalmente estão presentes nessas biópsias e aparecem aumentados. As citocinas (IFN- γ , TNF- α , -1 β , -6, -7, -8, -10, -18) também são mais predominantes no estômago dos infetados (2).

A infeção resulta da indução de uma resposta polarizada de Th1 (Células T helper 1) (22) que, no entanto, não leva à erradicação da bactéria. As células do sistema imunitário inato vão responder a uma variedade de estímulos (bacterianos, virais, parasíticos ou fúngicos) através dos Toll Like Receptors (TLR). Estes são recetores transmembranares que estabelecem uma ligação entre a resposta imune inata e a adaptativa (23), sendo que o *Helicobacter pylori* é reconhecido pelos TLR-2, -4, -6, -7, -8, -9 (24). Os TLR, presentes no hospedeiro, conservam estruturas de reconhecimento molecular do agente patogénico. Tais estruturas são denominadas '*pathogen-associated molecular patterns*' (PAMPs) e englobam lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, lipoproteínas, flagelinas e RNAs de cadeia dupla (21).

As células T reguladoras (Treg), são populações de células CD4⁺ e CD25⁺, e desempenham um papel importante na colonização pela bactéria. Apresentam a capacidade de suprimir a ativação ou a proliferação de outras células T. As Treg desempenham um papel fisiológico fulcral na proteção de patologias autoimunes, suprimindo a resposta das restantes células T a autoantígenos, controlando assim a sua resposta imunitária. A sua presença na mucosa gástrica de indivíduos infetados sugere o seu envolvimento na supressão da resposta imune, contribuindo para a persistência da infeção. Sendo assim, as Treg, poderão estar associadas a uma prevenção do cancro gástrico, mas por outro lado, poderão contribuir para o prolongamento da gastrite associada à colonização pelo microrganismo (20).

Além da resposta celular existente pós infeção, ocorre também uma resposta imunitária humoral. Vários antígenos da bactéria são alvo de anticorpos produzidos no corpo do hospedeiro. Os sujeitos infetados apresentam maior secreção de imunoglobulina A (IgA), a qual reage com a membrana, o flagelo, a urease e outras proteínas deste microrganismo,

apresentando também aumentos consideráveis relativamente à imunoglobulina M (IgM). Já a frequência de secreção da imunoglobulina G (IgG) é relativamente semelhante nos dois grupos (infetados e não infetados) (2).

Num estudo de Graham, D. Y. et al, em 2004, 20 voluntários humanos foram colonizados com a bactéria. Aí, foi possível obter dados e provas de que a inflamação gástrica se desenvolve num curto espaço de tempo após a colonização. Em apenas duas semanas na biópsia da mucosa gástrica foram detetados linfócitos e monócitos, juntamente com níveis elevados das interleucinas IL-1 β , -8, -6 no antro gástrico (2,25). Ainda, quatro semanas após a infeção, os níveis de CD⁴⁺ e CD⁸⁺ encontravam-se elevados, aquando duma comparação feita com os valores pré infeção. (25)

3.4 Manifestações Clínicas

O *Helicobacter pylori* apresenta características bastante específicas que lhe permitem hospedar o estômago humano. Após fixação, ele aumenta a suscetibilidade do hospedeiro a patologias tanto gastrointestinais como não gastrointestinais (9). Esta bactéria, a nível gastrointestinal apresenta-se como sendo o principal agente etiológico de gastrites, úlceras tanto gástricas como duodenais e ainda pode ser causadora de cancro gástrico e linfoma associado a tecido linfoide da mucosa (MALT) (2,16). A nível não gastrointestinal, estudos realizados em África, na Ásia e na América do Sul demonstraram que a colonização pela bactéria numa idade ainda jovem poderá provocar atrasos no crescimento do hospedeiro, aumentar surtos diarreicos e favorecer infeções entéricas como a cólera e a febre tifoide (26). Ainda que não atue como a principal causa etiológica das patologias, é também provável que exista uma associação entre a colonização realizada por esta bactéria e doenças coronárias, doenças de foro dermatológico, como a rosácea e a urticária idiopática, doença autoimune da tireoide, anemia ferropénica, enxaquecas e doenças neurológicas. Esta possível associação estará relacionada com a ativação crónica e lenta da cascata de coagulação, provocada pela infeção do microrganismo, uma aceleração no processo de aterosclerose e a semelhança antigénica entre o *Helicobacter pylori* e os epítomos do hospedeiro que desencadeiam respostas autoimunes (4,27). Existe ainda evidência desta infeção estar associada a alguns casos relatados de púrpura trombocitopénica imune (10).

A infeção por *Helicobacter pylori* resulta numa sequência típica de eventos que, em último caso, poderá culminar em cancro gástrico (ver figura 3). Este organismo provoca a inflamação da mucosa gástrica em todos os indivíduos infetados, mas, apenas cerca de 15% dessa população apresenta manifestações clínicas (2). As quais podem ser mais ou menos graves, consoante determinados fatores: a genética do hospedeiro e a respetiva reação imunitária, fatores bacterianos (sua virulência) (2,24,28) e ainda fatores externos tais como o

consumo de sal e tabaco, além das próprias condições de vida (5). Em primeiro lugar, ocorre uma gastrite aguda inicial, que com o tempo origina uma gastrite crônica ativa, que poderá durar para a vida em caso de omissão de tratamento (22). A gastrite, na maior parte das pessoas, trata-se de uma patologia que é assintomática durante anos, podendo mesmo ser durante décadas (24,29). Uma vez que a *Helicobacter pylori* não é uma bactéria com patogenicidade

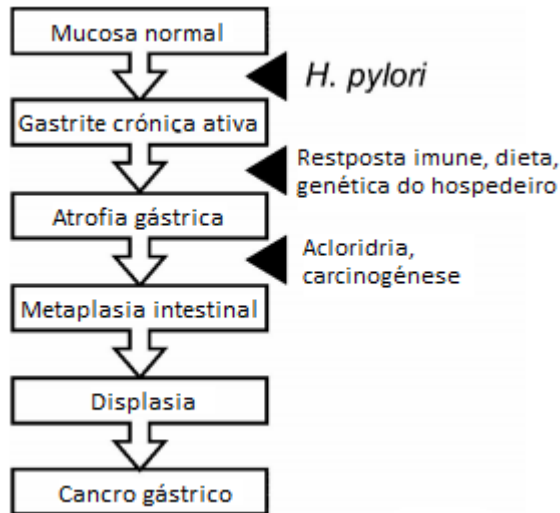


Figura 3 - Modelo representativo do papel da *Helicobacter pylori* e outros fatores externos, na carcinogênese gástrica. Adaptada do estudo de Kusters, J.G., et al., (2006)

intracelular, a resposta inflamatória do hospedeiro vai provocar mais danos nas suas próprias células epiteliais do que promover uma correta erradicação do organismo patogénico. Sendo assim, a presença persistente da bactéria provoca uma reação inflamatória contínua e conseqüentemente um dano celular. Inicia-se assim a cascata apresentada na figura 3, que apresenta a evolução dos danos celulares causados ao longo da infecção (22). A consequência mais grave da infecção provocada pela bactéria é, sem dúvida, o cancro gástrico, sendo este a terceira causa mais frequente de morte provocada por cancro (10). Juntamente

com a úlcera péptica, estas duas patologias são responsáveis por mais de um milhão de mortes por ano, a nível mundial (30).

3.5 Métodos de diagnóstico

Um diagnóstico preciso e exato da infecção por *Helicobacter pylori*, é crucial para se fazer uma gestão efetiva, na prática clínica, de muitas doenças gastrointestinais (30). Os testes disponíveis para a deteção desta bactéria estão divididos em invasivos ou não invasivos. Os testes invasivos têm por base a utilização de endoscopia, como veículo para obtenção de tecido para análises histológicas, testes rápidos de urease, PCR (polymerase chain reaction) ou cultura. Os testes não invasivos fazem uso de amostras periféricas tais como o sangue, amostras respiratórias, urina, fezes e saliva para a deteção de anticorpos e antigénios provenientes da bactéria ou ainda, atividade da urease (4). Ainda que existam diversos testes de diagnóstico disponíveis, cada um destes métodos é diferente e apresenta as suas próprias vantagens, desvantagens e limitações. É necessário avaliar, qual dos testes é mais apropriado para determinada situação, para que se possa proceder à sua escolha. Esta escolha, vai depender de diversos fatores, tais como: a disponibilidade e acessibilidade do teste, as condições clínicas do suposto hospedeiro e a precisão e exatidão do método de diagnóstico em diferentes circunstâncias clínicas (30).

A endoscopia é realizada para diagnosticar doenças associadas à colonização por *Helicobacter pylori* ou para obter amostras, normalmente da mucosa gástrica, para futuros estudos de diagnóstico como a histologia, a cultura e métodos moleculares. Este método invasivo é recorrente em grupos de risco que incluem pessoas com mais de 45 anos, com presença de anemia, vômitos ou perda de peso, evidência de hemorragia e ainda histórico de úlceras anteriores. Na figura 4 podemos observar imagens provenientes de endoscopias realizadas em estômago saudável e em estômago colonizado. O exame histológico, poderá ser considerado como o gold standard na detecção direta de *Helicobacter pylori*, tendo sido também o primeiro método utilizado. No entanto, o local, o tamanho, o número das biópsias e ainda a utilização ou não de inibidores da bomba de prótons, podem influenciar negativamente os resultados deste teste. O antro gástrico será o melhor local para se realizar a biópsia, ou então, o corpo do estômago, em situações de possível atrofia do antro, de modo a evitar resultados falsos negativos. A distribuição irregular da bactéria ao longo de todo o estômago poderá proporcionar também erros de detecção e diagnóstico. (30). O método da cultura já não é considerado como imprescindível para a confirmação do organismo bacteriano, mas a sua utilização ainda tem bastante aplicação pela sua capacidade de testar a resistência da cultura bacteriana a determinado tipo de antibióticos (27).

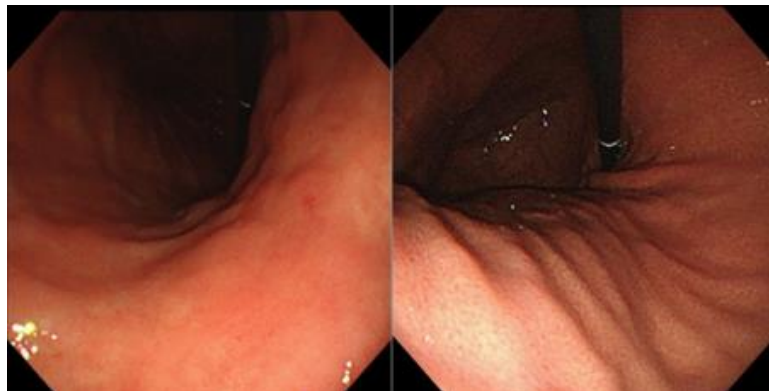


Figura 4 – Imagens representativas de endoscopias realizadas ao estômago. Do lado esquerdo é apresentada uma imagem correspondente à presença de colonização da bactéria *Helicobacter pylori*, onde é possível observar vermelhidão e atrofia da mucosa. Do lado direito a colonização não existe e o estômago apresenta uma fisionomia considerada regular. Adaptado de (31)

O teste respiratório (Urea Breath Test) é o método de diagnóstico não invasivo mais preciso, apresentando cerca de 95% de sensibilidade e especificidade em adultos, sendo que o valor decresce ligeiramente em crianças de idade inferior a 6 anos. Este método apresenta diversas vantagens. É um método bastante seguro, uma vez que não é invasivo, e simples de se realizar, requerendo apenas duas amostras respiratórias, antes da ingestão de uma solução contendo o substrato ^{13}C -ureia e de 15 a 30 minutos após essa mesma ingestão. O princípio deste teste baseia-se na detecção da proteína urease, ou seja, estando a bactéria a colonizar o

hospedeiro, ela vai hidrolisar a ureia, sinalizada na solução ingerida, em amônia. E, após a liberação do Carbono 13C, este vai ser exalado através da respiração. A comparação da quantidade de Carbono 13C ingerida através da solução com a quantidade de Carbono exalada reflete a atividade da urease bacteriana presente a nível do estômago (32). O teste de antigénios fecais apresenta custos relativamente baixos e é um método simples, apesar de alguns pacientes se apresentarem algo relutantes em colher as suas fezes. Este método utiliza antigénios monoclonais ou policlonais, para a deteção de antigénios contra a bactéria em amostras fecais através de imunoensaios. Apesar de ser um teste bastante sensível, pode apresentar os seus valores alterados pela presença de distúrbios gastrointestinais, utilização de fármacos, nomeadamente inibidores das bombas de protões, e úlcera hemorrágica (32)

3.6 Tratamento

Compreendendo a interação da bactéria com o hospedeiro, poderemos eventualmente, conseguir prever, prevenir e tratar a infeção por *Helicobacter pylori* (24). Como já foi referido anteriormente, a infeção provocada por este microrganismo ocorre durante a infância (2,16) e há relatos de algumas crianças que ficaram livres da mesma espontaneamente. Este resultado poderá estar associado à utilização de antibióticos no tratamento de outras patologias, originando também a erradicação da bactéria, não havendo ainda evidência concreta de uma cura natural (10).

Devido às elevadas taxas de resistências bacterianas aos antibióticos e ao preço relativamente elevado, que não permite um grande acesso aos tratamentos, levando à não adesão de muitos doentes, principalmente nos países em desenvolvimento, 20% das tentativas de tratamento da infeção acabam por não obter sucesso. Além das resistências reportadas e da não, outro fator limitativo do tratamento deve-se ao ambiente gástrico pois, devido ao seu baixo pH e à dificuldade na distribuição homogénea de fármacos em toda a extensão do seu lúmen, a ação dos antibióticos é dificultada (2).

O tratamento normalmente requer a utilização de antibióticos aos quais a bactéria seja suscetível, em associação com inibidores das bombas de protões (16). A antibioterapia, apesar de ser bem sucedida, apresentando uma taxa de sucesso próxima dos 80% (2), não previne a reinfeção ainda que esta ocorra a taxas reduzidas, em humanos de idade adulta (10). Os inibidores da bomba de protões são pró-fármacos que requerem um ambiente ácido para que se possa dar a sua ativação. Como o nome indica, eles vão inibir a bomba de protões nas células parietais do estômago. A bomba de protões é necessária no processo da secreção de ácido gástrico, sendo diretamente responsável pela secreção de iões de Hidrogénio no lúmen estomacal. Assim, vão bloquear a secreção de ácido no estômago. Os mais utilizados são Omeprazol, Lansoprazol, Esomeprazol, Pantoprazol e Rabeprazol (8).

Uma vez que a degradação causada a nível do estômago é progressiva, o tratamento do organismo bacteriano numa fase já tardia da infeção poderá representar, danos irreversíveis. Sendo assim, a terapêutica utilizada para a erradicação da bactéria deverá ser escolhida

mediante a análise de vários fatores: a prevalência da infecção, as respectivas patologias associadas e resistências características de cada região geográfica, os custos associados e disponibilidade do regime terapêutico, possíveis alergias e intolerâncias do doente, as doses e duração do tratamento e, ainda deve ser tido em conta, possíveis tratamentos prévios e os respetivos resultados. (16)

3.6.1 Esquemas terapêuticos

Os antibióticos mais utilizados para o tratamento da patologia normalmente são a claritromicina, a amoxicilina, o metronidazole, a tetraciclina, a levofloxacina, a furazolidona e o bismuto. E, assim como em outras contaminações, a terapia deveria ser ajustada com base em testes de suscetibilidade. No entanto, muitas vezes estes testes de suscetibilidade não são realizados, iniciando-se a primeira linha de tratamento. Se se observar resistência por parte de bactérias ao regime escolhido primeiramente para o tratamento da colonização, o regime terapêutico utilizado deve ser alterado para um diferente e o qual mantenha uma boa resposta e elevados níveis de erradicação. (16)

3.6.1 a) Primeira linha de tratamento

Nas últimas duas décadas o tratamento recomendado para a erradicação deste organismo bacteriano tem sido a terapia tripla (tabela 1), sendo considerada a primeira linha de tratamento. A qual combina uma associação de amoxicilina com claritromicina e um inibidor da bomba de prótons. Trata-se do regime mais prescrito a nível mundial (1) e é recomendado para regiões com baixas resistências relatadas relativamente à claritromicina (inferiores a 15%) (33). Para regiões onde a resistência seja maior, ou para doentes que apresentem hipersensibilidade à penicilina, a alternativa com metronidazol em vez de amoxicilina é bastante recomendada. Uma vez que a terapêutica utilizada em primeira linha apresenta muitas vezes uma taxa de insucesso bastante acima do ideal, muitas das vezes tem de se recorrer à segunda linha de tratamento (1,28). Por tal motivo, a terapia tripla com claritromicina tem vindo a deixar de ser a melhor opção para o tratamento de *Helicobacter pylori*. Este fator ganha ainda mais peso quando nos referimos a alguns países onde se fazem notar maiores taxas de resistência, podendo atingir valores superiores a 20% (2,28).

Tabela 1 - Regime utilizado em primeira linha de tratamento com os fármacos e respetivas posologias, para regiões com reduzidas resistências relatadas à claritromicina. Adaptado de (34).

Fármacos	Posologia
Lansoprazol	30 mg de 12 em 12 horas
Omeprazol	20 mg de 12 em 12 horas
Pantoprazol	40 mg de 12 em 12 horas
Rabeprazol	20 mg de 12 em 12 horas

Esomeprazol	40 mg de 24 em 24 horas
Claritromicina	500 mg de 12 em 12 horas
Amoxicilina	1000 mg de 12 em 12 horas

Para as regiões onde as resistências à claritromicina são maiores, existem algumas alternativas terapêuticas: A terapia sequencial é baseada nos mesmo antibióticos que a terapia tripla, sendo todavia consumidos de forma sequencial: iniciando com amoxicilina, juntamente com um inibidor da bomba de prótons, durante cinco dias e, seguidamente, também durante cinco dias, um inibidor da bomba de prótons em concomitância com claritromicina e amoxicilina (28). A terapia quádrupla com bismuto consiste na concomitância de bismuto, tetraciclina, metronidazol e um inibidor da bomba de prótons (16), durante 14 dias. Este tratamento é preferível como primeira linha para zonas demográficas com grande incidência de resistências relatadas à claritromicina ou, em segunda linha, quando o tratamento com terapia tripla não obteve sucesso. A utilização de metronidazol em grandes dosagens, durante tempo prolongado, permite uma redução significativa relativamente ao impacto causado pelas resistências a este antibiótico (28); A terapia concomitante, que envolve os três antibióticos metronidazol, amoxicilina e claritromicina com um inibidor da bomba de prótons; Por fim, a terapia híbrida que passa por um primeiro tratamento com um inibidor da bomba de prótons em concomitância com a amoxicilina, durante 7 dias, seguido de um outro novamente com um inibidor da bomba de prótons com amoxicilina, metronidazol e claritromicina durante outros 7 dias (35).

Em 2010, Luther et al, com o seu estudo comparando a terapia tripla com a terapia quádrupla com bismuto, concluiu que a taxa de erradicação de ambas é bastante aproximada (cerca de 77% para a tripla e 78,3% para a quádrupla). Enquanto segunda linha, a terapia quádrupla com bismuto apresentou ainda uma taxa de 77% de erradicação após falha da terapia tripla (36). Um estudo português (37), sobre as resistências ao tratamento com antibióticos em Portugal, sugere que a terapia quádrupla, com ou sem bismuto, deveria ser utilizada como primeira linha no tratamento da colonização por *Helicobacter pylori* na população adulta. Para a população pediátrica, sugere a terapia tripla com amoxicilina e metronidazol ou a terapia quádrupla com bismuto, como preferenciais para o tratamento.

3.6.1 b) Segunda linha de tratamento

Se por algum motivo for necessário recorrer à segunda linha de tratamento, tal contempla duas opções, alternativas. A terapia quádrupla com bismuto durante 10 a 14 dias, descrita acima, e a terapia tripla com levofloxacina. Esta última consiste na utilização de um inibidor da bomba de prótons, em associação com amoxicilina (500 mg de 12 em 12 horas) e levofloxacina (500 mg de 12 em 12 horas), durante 10 dias (35)

3.6.1 c) Terceira linha de tratamento

Devido aos inúmeros efeitos secundários reportados utilizando a segunda linha de tratamento, houve a necessidade de desenvolver ainda uma terceira linha de tratamento. Esta

linha de tratamento exige que sejam efetuados testes de suscetibilidade antimicrobiana pré tratamento, de forma a determinar os melhores antibióticos a associar a um inibidor da bomba de prótons (1). As alternativas como terceira linha de tratamento passam por uma terapia quadrupla envolvendo levofloxacina, amoxicilina, bismuto e rabeprazol durante 10 dias, a associação de rifabutina, amoxicilina e ciprofloxacina durante 14 dias ou ainda, uma terapia quadrupla envolvendo furazolidona, tetraciclina e bismuto, associados a um inibidor da bomba de prótons (35).

3.6.2 Resistências bacterianas aos antibióticos

Uma vez que as resistências aos antibióticos são o fator mais importante para a falha de um regime de erradicação, é crucial que haja um conhecimento das resistências típicas de cada região, por forma a poder recorrer ao tratamento mais eficaz possível (11,13). No caso do *Helicobacter pylori*, à semelhança de tantas outras bactérias, a nossa capacidade para combater este microrganismo está a ser bastante afetada pelas crescentes taxas de resistências aos antibióticos (1). Existe uma disparidade nos valores das taxas de resistência aos antibióticos ao longo de todo o globo, que estará relacionada com as diferentes políticas relativas ao consumo de determinado antimicrobiano. Um exemplo flagrante é o caso da claritromicina. Em certas zonas de Espanha a taxa de resistência ronda os 49%, enquanto em algumas zonas da Holanda essa taxa aproxima-se de 1% (28). Outro exemplo, é o metronidazol. A sua resistência varia dos 17%, na Europa, para os 44% na América (38). Na figura 5 podemos constatar as maiores taxas de resistência aos antimicrobianos, associadas ao tratamento da infeção por *Helicobacter pylori*, ao longo do Mundo, dividido por continentes (34).

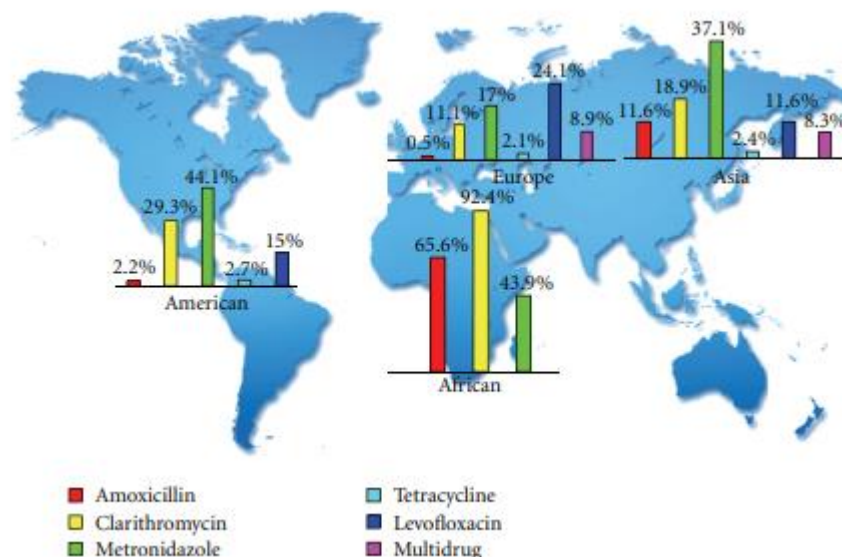


Figura 5 - Mapacom as diferentes taxas de resistência a determinados antimicrobianos em diferentes continentes. Adaptado de Wu Wenming, et al, de 2012 (34).

As elevadas taxas de resistência reportadas relativamente ao metronidazol estão relacionadas com a sua vasta utilização em países desenvolvidos, no tratamento de parasitoses vaginais (28), enquanto as taxas de claritromicina estão relacionadas com a sua elevada utilização no tratamento de infeções do trato respiratório (8). Tendo em conta estas elevadas taxas, face a dois dos principais antibióticos utilizados na terapia tripla (claritromicina e metronidazol) (28), este regime não deveria ser utilizado de forma empírica. Sempre que possível devem ser realizados estudos de suscetibilidade para se ajustar a terapia a cada caso (16,28). Em Portugal, as taxas de resistência à claritromicina, levofloxacina e metronidazol são de, respetivamente, 31,5%, 26.3% e 33.3% (11).

A aquisição de resistências e, conseqüentemente a falha na erradicação da bactéria poderão estar relacionadas com a ocorrência de mutações cromossómicas ou com a aquisição de genes que provoquem uma alteração no local de ação de determinado antimicrobiano, não sendo possível reverter este efeito pelo aumento da dose de fármaco ou pela extensão no tempo de tratamento (34).

3.6.3 Probióticos

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como espécies microbianas vivas que podem apresentar funções anti-inflamatórias e/ou antioxidantes, podendo assim melhorar a saúde dos hospedeiros, quando administrados em quantidades adequadas (28). O interesse na atividade dos probióticos contra o *Helicobacter pylori* e a sua possível inclusão na terapia para erradicar a bactéria tem vindo a aumentar, uma vez que esta opção representa custos reduzidos e é uma solução alternativa de larga escala, para prevenir ou reduzir a colonização (21). Para além da sua vasta utilização em distúrbios gastrointestinais, são também utilizados na prevenção de cancro e doenças inflamatórias através da estabilização do ambiente microbiota do intestino (39). Podem ser provenientes de bactérias ou leveduras e estão geralmente associados ao trato gastrointestinal, sendo as espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as mais utilizadas (28), seguindo-se outras espécies bacterianas bacilares e enterococcus (39). Os probióticos têm a capacidade de digerir sacarídeos e produzir ácido láctico em meio anaeróbio. Fazem uso da sua capacidade de resistir a valores de pH bastante reduzidos e da sua adaptabilidade a diferentes tipos de temperatura, habitando, além do trato digestivo, a membrana da mucosa da boca e ainda o trato genital tanto em humanos como em animais (28).

Durante o tratamento por antibioterapia, efetuado na infeção por esta bactéria, vão ocorrer modificações consideráveis relativamente ao ambiente microbiota do estômago e as alterações provocadas vão depender do tipo de antibióticos utilizados, da respetiva dosagem e tempo de administração, ação farmacológica e bactéria alvo (40). Além da medicação utilizada, outros fatores vão também afetar a microbiota: a dieta, a idade, o nível de atividade física, fatores genéticos e ainda fatores externos. Posto isto, os probióticos tomam então um papel relevante no restabelecimento deste meio (40), tornando-se assim uma ferramenta importante na melhoria da taxa de erradicação e redução dos sintomas provocados pela infeção por *Helicobacter pylori* (8).

4 Estratégias de Vacinação

4.1 Introdução à vacinação

A vacinação é um dos principais métodos para o controlo de doenças infecciosas, providenciando uma proteção direta contra agentes patogénicos, através do fornecimento de memória imunológica de longa duração (41). A vacina é uma preparação de antígenos, que é administrada a um indivíduo, provocando uma resposta imunitária específica de um ou mais agentes infecciosos. Existem diferentes tipos de vacinas, agrupadas de acordo com o seu modo de atuação (3). Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), podemos encontrar vacinas vivas atenuadas, inativadas inteiras e vacinas de subunidades. As vacinas vivas atenuadas são produzidas a partir da modificação de bactérias ou vírus, em laboratório, através de culturas sucessivas ou por engenharia genética. Neste caso, o microrganismo continua a ter a capacidade de se replicar no organismo, induzindo uma resposta imunológica semelhante à da infeção que, possivelmente, poderá provocar reações adversas graves. Estas vacinas, além de conferirem imunidade a longo prazo, fazem-no através de uma única dose, sendo assim, geralmente, bastante eficazes. As vacinas inativadas inteiras, são constituídas por bactérias ou vírus inativados laboratorialmente, através de calor ou por tratamento químico, permanecendo o microrganismo intacto e completo, ainda que sem a capacidade de se replicar. Este tipo de vacinas induz uma resposta imunitária predominantemente humoral, sendo menos eficazes que as vacinas vivas. Uma vez que a concentração de anticorpos produzidos pelo indivíduo vacinado vai diminuindo ao longo do tempo, são necessárias múltiplas doses para se atingir a imunidade pretendida. Por fim, temos as vacinas de subunidades, as quais são desenvolvidas utilizando apenas os antígenos que produzem imunidade protetora. De um modo geral, as vacinas podem ainda apresentar componentes como antígenos, adjuvantes, conservantes, estabilizadores, emulsionantes e resíduos.

4.2 Antígenos

Os antígenos são entidades estranhas ao organismo, que são administrados a um indivíduo, provocando uma resposta imunitária protetora específica. Aquando dos estudos realizados na vacinação de *Helicobacter pylori*, vários antígenos têm sido testados. A urease, primeira proteína que despertou interesse como potencial antígeno (26), é uma proteína que se encontra abundantemente presente na estrutura de *Helicobacter pylori* e é essencial para o processo de colonização e mecanismo fisiopatológico do organismo bacteriano, como já foi referido anteriormente (2). Além disso, a urease é conservada entre as diferentes espécies *Helicobacter*. Diversas vias de administração como oral, intranasal, rectal e intramuscular foram testadas utilizando a urease juntamente com diversos adjuvantes. Mediante resultados positivos, foi demonstrado que é possível proteger ou curar infeções por *Helicobacter felis* ou *Helicobacter pylori* em ratos e em furões (2). VacA, CagA e NAP são também candidatos antígenos para possíveis vacinas, uma vez que demonstraram ser eficazes na indução de

resposta imunitária pela colonização feita no estômago de murganhos (2,42). Ao contrário da urease, algumas estirpes não apresentam expressão destes antígenos, diminuindo assim substancialmente o seu potencial quando utilizados isoladamente numa vacina. (42)

As HSP (Heat shock proteins) são proteínas conservadas tanto em procariotas como em eucariotas, sendo induzidas em situações de stress como a temperatura, alterações de pH, isquemia e infecções microbianas. No caso da colonização por *Helicobacter pylori*, são produzidos maioritariamente dois tipos de Heat shock proteins: HspA e HspB. Também estas demonstraram poder vir a ser utilizadas enquanto antígenos numa possível formulação, à semelhança das lipoproteínas da membrana externa. (15).

Os antígenos mais promissores para o desenvolvimento de uma vacina são a Urease, a VacA, o CagA, os NAP, as HSP e as lipoproteínas da membrana externa (43).

4.3 Adjuvantes

Adjuvantes são componentes imunomoduladores, que atuam a nível do sistema imunológico, aumentando a sua sensibilidade a fatores extrínsecos específicos. Estão presentes nas formulações das vacinas e vão conferir uma resposta aumentada à presença de antígenos. Os adjuvantes aumentam a imunogenicidade aos antígenos, predominantemente pela estimulação do sistema imunitário inato (23). Um adjuvante ideal deve despoletar uma resposta imune de elevada qualidade a um determinado antígeno, mantendo-se no entanto não tóxico, económico, de produção fácil e preferencialmente, biodegradável (44)

Uma vez que a colonização por *Helicobacter pylori* ocorre a nível da mucosa gástrica, a imunização por via oral adquire maior interesse relativamente a outras alternativas de administração, sendo então recomendada a utilização de fortes adjuvantes da mucosa. A toxina da cólera (CT) e a enterotoxina termolábil da *E. coli* (LT) são dois dos mais fortes adjuvantes da mucosa, mas a sua utilização está limitada, uma vez que estão muitas das vezes associados a episódios de desregulação gastrointestinal como a diarreia, aquando da sua utilização em humanos. Numa tentativa de minimização destes efeitos adversos, estão em desenvolvimento neste momento, por modificação genética, mutantes derivados destas toxinas. A sua aplicação revelou reduções nos efeitos secundários e tem apresentado algum sucesso em novos casos de estudo (7). A melhor alternativa a estes fortes adjuvantes da mucosa, em estudos em humanos, é a utilização de Hidróxido de Alumínio, que foi aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) (21). O hidróxido de Alumínio, $Al(OH)_3$, é o adjuvante mais utilizado em vacinas, com décadas de experiências com segurança clínica. No entanto, este adjuvante também tem sido considerado como tóxico, estando associado a patologias como a esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de alzheimer e demência, devido à sua acumulação tóxica no organismo (44).

O adjuvante de Freund, outro adjuvante convencional, é composto por uma emulsão oleosa em água contendo a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* inativada pela ação do calor, ou componentes da sua parede celular. Ele é efetivo na potenciação da resposta imune humoral e celular contra antígenos administrados concomitantemente. O adjuvante pode apresentar-se

na sua forma completa ou incompleta. Tanto uma como a outra providenciam proteção parcial na infecção de *Helicobacter pylori*, quando a vacina é administrada por via subcutânea (44).

Os CpG são oligonucleótidos sintetizados, constituídos por Citosina e Guanina não metiladas, que estimulam o sistema imunitário. Estes provocam menos efeitos secundários que a CT e a LT e têm sido alvo de estudos na vacinação contra *Helicobacter pylori*, onde já foi comprovado que a imunização em murganhos com a aplicação deste adjuvante induz a formação de uma quantidade elevada de anticorpos específicos e uma resposta imune local elevada (44).

Além dos adjuvantes acima descritos, muitos outros têm sido alvo de estudos e testes. Destacam-se: os “Bacterial Ghosts”, que são invólucros celulares vazios derivados de bactérias gram negativas, apresentando boas propriedades enquanto adjuvantes; o alginato de sódio que foi testado para a libertação controlada da vacina, apresentando propriedades muco-adesivas que o tornam ideal enquanto transportador do conteúdo da mesma (9); vacinas de DNA e outros sistemas de entrega englobando vetores vivos de salmonela ou poliovírus (7,9).

4.4 Vacinação em *Helicobacter pylori*.

Como já foi referido anteriormente, o tratamento desta infecção depende do sucesso ou não da terapêutica com. Este tratamento além de não ser fiável, relativamente à prevenção de reinfeção da bactéria, apresenta um custo elevado e normalmente está associado a diversos efeitos secundários (9).

O desenvolvimento duma vacina seria uma opção bastante aliciante, no que toca à relação custo-efetividade, implicando no entanto, a necessidade de mais estudos e pesquisa científica, conducentes a melhorias na sua eficácia (24). O maior desafio será desenvolver uma vacina que produza uma resposta do sistema imunitário contra a bactéria e que posteriormente, proteja o hospedeiro de futuras possíveis colonizações (43). O público alvo para a utilização de uma vacina profilática ou uma vacina terapêutica é diferente (9). A vacina profilática, preferencialmente, teria de ser administrada em crianças, cedo, para originar um nível elevado de proteção. Vindo a ser eficaz, esta seria certamente uma opção promotora da redução da prevalência da infecção pelo organismo bacteriano *Helicobacter pylori* e, conseqüentemente, os casos de úlcera péptica e cancro gástrico também iriam sofrer uma redução drástica, revelando-se dessa via uma grande mais valia em termos de saúde pública (2). Já a vacina terapêutica, poderia ser administrada em qualquer idade, estando mais indicada para doentes sintomáticos e, potencialmente, ainda poderia prevenir o aparecimento de cancro gástrico (10). Esta última será de complicada produção uma vez que a bactéria em causa apresenta mutações com bastante frequência e existe sempre o risco iminente de se agravar a infecção, devido à resposta imunológica do hospedeiro, que poderá contribuir para o agravamento da patologia. Em modelos animais, nomeadamente no modelo em murganhos, ficou demonstrado que tanto a vacina profilática como a terapêutica poderão vir a ser eficazes pois, em alguns casos, foi induzida a ativação do sistema imunitário e inclusive uma redução da carga bacteriana (9). Grande parte dos avanços e muito do trabalho inicial em modelos animais tem sido efetuado

por pequenos grupos laboratoriais, em universidades, ou institutos médicos. É necessário um investimento de capital maior para a existência de ensaios clínicos mais conclusivos e estudos mais aprofundados, o que seria facilitado pela cooperação da indústria (45).

As diversas tentativas realizadas para se obter uma vacina eficaz contra o *Helicobacter pylori*, têm-se focado fundamentalmente, em encontrar a melhor via de administração possível, assim como os melhores adjuvantes e antigénios, que possam favorecer a indução de uma resposta imunitária. Uma vez que esta bactéria tem ação a nível extracelular, grande parte das tentativas de vacinação foram desenvolvidas com a perspectiva de imunizar a mucosa gástrica (21) e por isso, a vacinação por via oral é preferível (24). Ainda que muitos estudos realizados em modelos animais comprovem viabilidade no tratamento e prevenção da infeção por esta bactéria, o mecanismo de proteção induzido por vacinação ainda é pouco conhecido (3). Um foco de diversos estudos imunológicos realizados recentemente nesta temática são as células CD4⁺, as quais são responsáveis pelo controlo de crescimento da colónia de *Helicobacter pylori* (24). Acredita-se ainda, que a possibilidade de existir uma vacina efetiva, está dependente da indução duma resposta imune humoral e das células Th2 (4).

4.4.1 Modelos animais

Logo após a descoberta de Marshall e Warren se percebeu que era necessário recorrer aos modelos animais, de modo a ser obtida informação mais relevante e elucidativa sobre os mecanismos por trás do desenvolvimento da patologia associada à colonização pela investigada bactéria e as respetivas propriedades patogénicas. Além do mais, os modelos animais fornecem-nos ainda informação acerca dos possíveis efeitos associados a diferentes doses terapêuticas e aos diferentes tipos de vacinas. Contudo, a escolha do modelo animal mais apropriado é bastante dificultada, pois todos os modelos testados até agora apresentam falhas, que se podem traduzir num avolumar de dificuldade aquando da passagem dos modelos animais para os humanos (4).

Em 1990, Lee et al (46), com o seu trabalho utilizando murganhos saudáveis e a bactéria *Helicobacter felis*, uma bactéria também da família *Helicobacteraceae*, que naturalmente infeta cães e gatos, conseguiu com sucesso a colonização e posteriormente a indução de gastrite em murganhos. Dessa forma, este modelo ganhou bastante popularidade e começaram a ser desenvolvidos imensos estudos utilizando a associação de murganhos à bactéria *Helicobacter felis*. Desde então, conseguiu-se proceder à colonização do *Helicobacter pylori* com sucesso em murganhos, ratos, porquinhos da índia, gerbils, porcos, gatos e cães. Na maior parte destes modelos animais foi possível comprovar que a infeção pelo microrganismo poderia ser prevenida, através de uma vacina profilática, ou tratada por intermédio de uma vacina terapêutica (2). Na Tabela 2, podemos comparar as principais vantagens e desvantagens associadas aos diferentes modelos animais supra descritos.

Tabela 2 – Tabela com as principais vantagens e desvantagens de cada um dos modelos animais utilizados. Adaptada de (47)

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 endêmicas
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 endêmicas
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

Ainda que os murganhos não sejam infetados naturalmente pela bactéria, esta adapta-se ao estômago do roedor, sendo este o modelo animal mais utilizado *in vivo*. Os murganhos normalmente tendem a não desenvolver úlcera péptica ou carcinoma gástrico, sendo as gastrites bastante mais comuns nesta espécie, dependendo também da estirpe envolvida e do respetivo hospedeiro. Em termos de resposta, os gerbils mongolianos são uma espécie mais semelhante aos humanos, mas em termos de biblioteca genómica e outras ferramentas de manipulação genética não está tao desenvolvida quanto o modelo em murganhos, sendo assim menos utilizada (3). O modelo em primatas é o que se assemelha em maior escala aos humanos, todavia os elevados custos que lhe estão associados inculcam a tendência para a sua utilização em pequena escala (4).

4.4.2 Ensaios clínicos

Os ensaios clínicos iniciais focaram-se predominantemente em vacinas baseadas no antigénio Urease em combinação com um adjuvante, administrados oralmente. O primeiro ensaio clínico testou a eficácia terapêutica de uma vacina contra o *Helicobacter pylori*, em indivíduos colonizados por este microrganismo. Foram administradas doses de 180 mg, 60 mg e 20 mg de urease em associação com 5 µg ou 10 µg de Enterotoxina termolábil de E.coli (LT) (48). A imunogenicidade foi determinada, quantificando o número de anticorpos específicos de urease presentes no sangue. No entanto, neste ensaio, a erradicação não foi observada nos indivíduos vacinados, ainda que tenha existido uma redução da concentração bacteriana, em indivíduos administrados com 20 mg de urease. Além disso, foi ainda possível constatar que o adjuvante LT, administrado tanto em 5µg como em 10 µg, induziu episódios diarreicos em mais de 60% dos indivíduos, após a administração de apenas uma dose (48,49). Em combinação com diferentes doses do antigénio urease da *Helicobacter pylori*, uma dose de 2.5 µg de LT seria suficiente para alcançar a imunogenicidade, mas tal dosagem ainda é capaz de provocar os episódios de diarreia (49). Desde então, diversos ensaios clínicos foram realizados em voluntários saudáveis utilizando urease administrada oralmente como uma proteína solúvel ou com expressão em vetores bacterianos, mas apresentaram quase sempre resultados limitados (26).

Na tabela 3, podemos observar o estado de desenvolvimento dos ensaios clínicos de vacinas promissoras em vigor, juntamente com a sua identificação e o local de investigação.

Tabela 3 – Tabela com a indicação do estado de desenvolvimento dos ensaios clínicos para vacinas candidatas atualmente, ao tratamento e prevenção da bactéria *Helicobacter pylori*. Adaptado de (10)

Identificação da vacina candidata	Fase clínica
Wuhu kangwei technology UreB - LTB fusion vaccine	Fase III (descontinuada)
Imevax - IMX101	Fase I
Epivax – <i>Helicobacter pylori</i> vaccine	Fase 0 ou pré-clínica
Helicovaxor	Fase 0 ou pré-clínica
Sichuan University – Urease epitope vaccine	Fase 0 ou pré-clínica
Southern Medical University – Lp220 vaccine	Fase 0 ou pré-clínica
China Pharmaceutical University – Probiotic vaccine delivery	Fase 0 ou pré-clínica
MCRI – Gastric Cancer Vaccine	Fase 0 ou pré-clínica

A *Helicobacter pylori* vaccine da Epivax é uma vacina em fase pré-clínica baseada em epítomos, envolvendo inicialmente uma vacina de DNA, seguida de um lipossoma péptido. A mesma demonstrou ser efetiva, conferindo proteção em murganhos. A vacina Helicovaxor, que também se encontra neste momento em fase pré-clínica, apresenta duas abordagens distintas. Uma delas, envolve uma estirpe de *Vibrio cholerae* não patogénica, utilizada para expressar determinados antigénios como a HspA e a urease da bactéria *Helicobacter pylori*. A outra, utiliza uma estirpe de *Helicobacter pylori* inativa (10).

Mais recentemente, outros dois estudos em fase pré-clínica foram realizados, utilizando vacinas baseadas em epítomos. Um deles, proveniente da Sichuan University, utilizando as subunidades da urease, enquanto o outro, proveniente de Southern Medical University, utiliza a lipoproteína Lp 220 (10).

Uma vacina, com uma abordagem algo distinta, estudada na China Pharmaceutical University, utilizou os probióticos como sistema de entrega de fármacos. Esta conferiu alguma proteção em murganhos contra a infecção, ainda que não tenha apresentado melhorias nos resultados quando comparada com as abordagens mais comuns com antigénios recombinantes (10).

A Murdoch Children's Research Institute (MCRI), encontra-se neste momento a desenvolver uma vacina, cujo foco não se centra apenas na erradicação do microrganismo. Além disso, está desenvolvida com o intuito de diminuir a inflamação provocada pela colonização da bactéria (10).

Já em fase clínica 1, encontra-se neste momento a vacina IMX101, investigada pela Imevax. Contém o recente antigénio γ -glutamyltranspeptidase (GGT), uma proteína da membrana externa da bactéria, juntamente com um adjuvante da mucosa. Este antigénio utilizado na preparação da vacina, é um dos mecanismos mais importantes da bactéria de combate ao sistema imunitário humano, pela sua atividade imussupressiva, sendo um dos principais motivos pelos quais as outras vacinas não obtiveram uma proteção completa e eficaz (10).

Até agora, houve apenas uma vacina que chegou à fase três dos ensaios clínicos e que foi de facto testada em crianças e cujo efeito foi acompanhado durante anos. Vacina essa que seria administrada oralmente e a sua composição também teria urease. O acompanhamento do ensaio foi feito e ao fim do primeiro ano foi registada uma redução de cerca de 71,8% da infecção natural por parte da bactéria. Alguns participantes do estudo foram seguidos por mais dois anos e foi registada uma descida do valor anteriormente apresentado para os 55%. O artigo com resultados do ensaio clínico foi publicado em 2015, apesar do estudo ter sido realizado entre 2005 e 2007, e, assim, pela primeira vez tivemos provas concretas de que uma vacina pode de facto ser eficaz na prevenção da infecção natural pelo organismo bacteriano em causa. No entanto, o evidente declínio da proteção conferida contra a colonização pela bactéria com o decurso do tempo não conseguiu ser contornado e a sua utilização implicaria novas doses. O desenvolvimento da vacina acabou por ser descontinuado e desde então, nenhuma outra vacina esteve numa fase tão avançada de investigação em ensaios clínicos (10,43).

Muitos outros estudos e ensaios clínicos têm sido realizados, com melhores ou piores resultados. Na figura 6 é-nos apresentada uma ilustração com as estratégias de vacinação mais utilizadas até agora na tentativa da formulação ideal para a bactéria *Helicobacter pylori* (49).

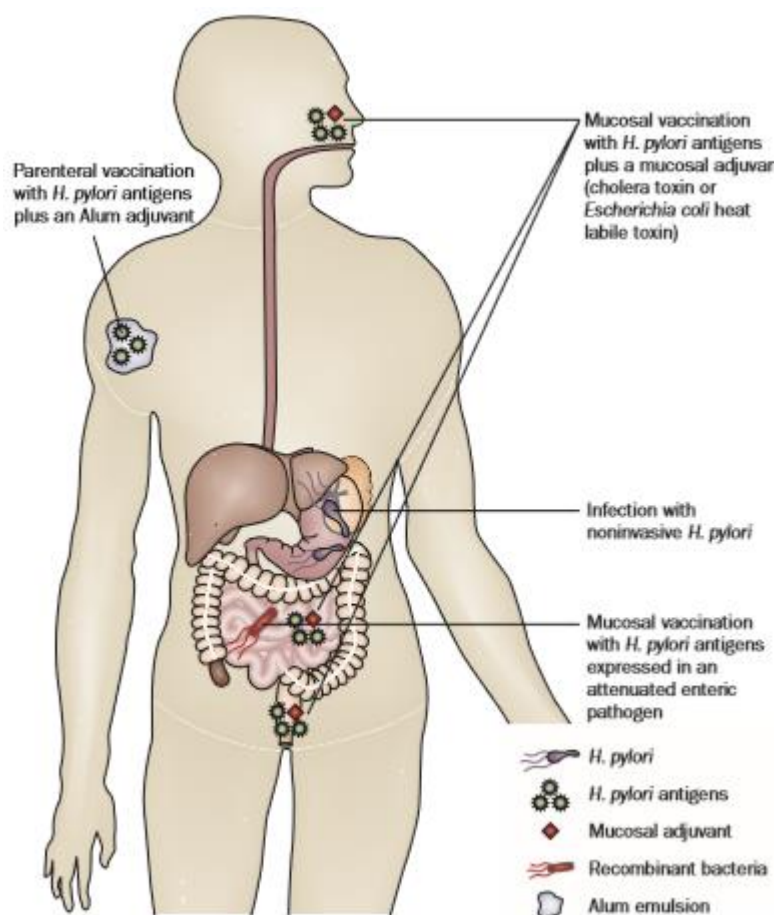


Figura 6 - Ilustração das estratégias de vacinação mais comumente testadas e respectivos locais de administração. Adaptada de (49)

5 Conclusões e discussão

Já passaram mais de 30 anos desde a descoberta da bactéria, mas, ainda assim, existem muitas questões sem resposta e que devem ser resolvidas. A existência de um conjunto de fatores de virulência bastante sofisticado permitem a infecção crônica provocada por este organismo bacteriano, um desafio para os estudos no desenvolvimento de uma vacina eficaz. Este estudo tem de ser muito profundo e bastante específico (3). Grande parte do desenvolvimento realizado até hoje tem sido fruto do trabalho de pequenos laboratórios, não havendo o investimento necessário por parte da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de ensaios clínicos mais promissores que possam dar origem a uma vacina capaz de erradicar o *Helicobacter pylori*.

Além do desinvestimento da grande indústria, uma das lacunas inerentes ao preconizado estudo, e presente aliás em grande parte dos ensaios clínicos, centra-se na utilização de modelos animais. Nessas situações é necessária uma adaptação clínica para infectar os animais em causa, uma vez que os mesmos não são infectados naturalmente pela espécie

Helicobacter pylori, resultando daí acrescida dificuldade na retirada de ilações aquando da aplicação ao modelo humano. Com a utilização da espécie *Helicobacter felis*, infetante natural em murganhos, é possível observar-se sintomas característicos e semelhantes aos provocados pelo *Helicobacter pylori* em humanos, pese embora tal espécie não apresentar fatores patogénicos como VacA, CagA e CagPAI que, como referido anteriormente, são importantes fatores de virulência no mecanismo fisiopatológico da bactéria. Daí ser também expectável que os eventos biológicos desencadeados possam vir a ser diferentes. (26)

Steven J. Czinn e Thomas Blanchard (49), num artigo de revisão, apontam três fatores de extrema importância para ser possível um avanço significativo, na produção de uma vacina eficaz. Em primeiro lugar, a seleção dos antígenos deverá ser feita de modo a alcançar uma vacina imunologicamente complexa, que seja capaz de originar uma resposta forte por parte dos anticorpos e, ainda mais importante, também capaz de despoletar uma forte resposta por parte das células T de memória. Porquanto o modelo em murganhos demonstra que os anticorpos desempenham um papel importante na imunidade mediada por uma vacina, mas os mesmos não são requeridos para a proteção imune do hospedeiro. Em segundo lugar, os autores consideram necessário um sistema de entrega de vacina que ultrapasse, com eficácia e segurança, as barreiras do trato gastrointestinal. Para tal, sugerem que continuem a ser realizadas tentativas de desenvolvimento de CT e LT mutantes, com menos efeitos adversos para os utilizadores, ou avanços contínuos nos veículos de entrega de vacinas vivas atenuadas. Por último, os autores alegam que, para haver maior sucesso no desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz, terá de haver também maior envolvimento por parte das indústrias farmacêuticas e biotecnológicas.

Apesar do avanço recente relativamente à compreensão da infeção provocada pelo organismo bacteriano *Helicobacter pylori*, que pode contribuir para o desenvolvimento de uma vacina (10), ainda há muitos estudos que devem ser realizados para que esta vacina se torne uma realidade. Passando da investigação à aplicação prática, teremos mudanças drásticas em termos de saúde pública, nomeadamente na incidência de gastrites e, mais importante ainda, uma grande diminuição da mortalidade provocada por cancro gástrico.

O farmacêutico, enquanto profissional de saúde, pode desempenhar um papel fundamental na erradicação desta bactéria. Além de contribuir a nível da investigação para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas como a vacinação, ele poderá ter intervenção na identificação do microrganismo e, na relação com o doente, poderá e deverá aconselhá-lo sobre a melhor maneira de seguir o regime terapêutico e ainda incentivar a que o tratamento seja feito até ao fim.

6 Referências bibliográficas

1. Talebi Bezmin Abadi A. Vaccine against *Helicobacter pylori*: Inevitable approach. *World J Gastroenterol*. 2016 Mar 21;22(11):3150–7.
2. D. V, P. M. Advances in vaccination against *Helicobacter pylori*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;4(2):157–66.
3. Hoffelner H, Rieder G, Haas R. *Helicobacter pylori* vaccine development: Optimisation of strategies and importance of challenging strain and animal model. *Int J Med Microbiol*. 2008;298(1–2):151–9.
4. Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):449–90.
5. Sgouras DN, Thi Huyen Trang T, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection HHS Public Access. 2015;(1):8–16.
6. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2002 Jul;123(1):187–95.
7. Ruggiero P, Censini S. *Helicobacter pylori*: A Brief History of a Still Lacking Vaccine. *Diseases*. 2014;
8. Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Jazayeri Moghadas A, Sadighi Moghadam B, Arabkari V, et al. Are probiotics useful for therapy of *Helicobacter pylori* diseases? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019 Jun;64:99–108.
9. Aebischer T, Schmitt A, Walduck AK, Meyer TF. *Helicobacter pylori* vaccine development: Facing the challenge. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(5):343–53.
10. Sutton P, Boag JM. Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori*. *Vaccine*. 2018;1–5.
11. Almeida N, Romãozinho JM, Donato MM, Luxo C, Cardoso O, Cipriano MA, et al. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance rates in the central region of Portugal. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(11):1127–33.
12. Bastos J, Arbara Peleteiro † B, Barros R, Is Alves L, Severo M, De F Atima Pina M, et al. Sociodemographic Determinants of Prevalence and Incidence of *Helicobacter pylori* Infection in Portuguese Adults. 2013;
13. Hu Y, Zhu Y, Lu NH. Novel and effective therapeutic regimens for *helicobacter pylori* in an era of increasing antibiotic resistance. Vol. 7, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
14. 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 [Internet]*. 2018 Dec 17 [cited 2019 Aug 15];89(8-S):72–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30561421>
15. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*. 2016.
16. Graham DY, Dore MP. *Helicobacter pylori* therapy: a paradigm shift. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(6):577–85.

17. Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Microbiol.* 74.
18. Floch P, Mégraud F, Lehours P, Crabtree JE, Wessler S. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma.
19. De Falco M, Lucariello A, Iaquinto S, Esposito V, Guerra G, De Luca A. Molecular mechanisms of *Helicobacter pylori* pathogenesis. Vol. 230, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2015. p. 1702–7.
20. Stein M, Ruggiero P, Rappuoli R, Bagnoli F, Ghosh SK. *Helicobacter pylori* CagA: from pathogenic mechanisms to its use as an anti-cancer vaccine. 2013; Available from: www.frontiersin.org
21. Ayala G, Escobedo-Hinojosa WI, Felipe De La Cruz-Herrera C, Romero I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol.* 2014;20(6):1450–69.
22. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A MODEL FOR GASTRIC CANCER EPIDEMIOLOGY. *Lancet.* 1975;
23. Hajam IA, Dar PA, Won G, Lee JH. Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Vet Res.* 2017;48(1):37.
24. Aebischer T, Meyer TF, Andersen LP. Inflammation, Immunity and Vaccines for. 2010;9:21–8.
25. Nurgalieva ZZ, Conner ME, Opekun AR, Zheng CQ, Elliott SN, Ernst PB, et al. B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infect Immun.* 2005;73(5):2999–3006.
26. Giudice G Del. Development of vaccines against *Helicobacter pylori* Witchcraft and stomach ache : Milan 1616. 2009;8(September):1037–49.
27. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(36):12781–808. Available from: <http://www.wjgnet.com/esps/HelpDesk:http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspxURL:http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i36/12781.htmDOI:http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12781>
28. Goderska K, Agudo Pena S, Alarcon T. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Jan 26;102(1):1–7.
29. Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HMT, Lee CK, Yamaoka Y, et al. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut.* 2004;53(9):1235–43.
30. Wang Y-K, Kuo F-C, Liu C-J, Wu M-C, Shih H-Y, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol.* 2015;21(40):11221–35.
31. Shichijo S, Nomura S, Aoyama K, Nishikawa Y, Miura M, Shinagawa T, et al. Application of Convolutional Neural Networks in the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection Based on Endoscopic Images. 2017; Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
32. Atkinson NSS, Braden B. *Helicobacter Pylori* Infection: Diagnostic Strategies in Primary Diagnosis and After Therapy. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2016 Jan [cited 2019 Aug 23];61(1):19–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26391269>
33. Sugimoto M, Uotani T, Sahara S, Ichikawa H, Yamade M, Sugimoto K, et al. Efficacy

- of Tailored *Helicobacter pylori* Eradication Treatment Based on Clarithromycin Susceptibility and Maintenance of Acid Secretion. *Helicobacter*. 2014 Aug;19(4):312–8.
34. Wu W, Yang Y, Sun G. Recent Insights into Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori* Eradication. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012.
 35. Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 14;20(6):1438–49.
 36. Luther J, Higgins PDR, Schoenfeld PS, Moayyedi P, Vakil N, Chey WD. Empiric Quadruple vs. Triple Therapy for Primary Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis of Efficacy and Tolerability. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jan;105(1):65–73.
 37. Lopo I, Libânio D, Pita I, Dinis-Ribeiro M, Pimentel-Nunes P. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Portugal: Systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*. 2018;23(4):1–12.
 38. Ogata SK, Godoy APO, da Silva Patricio FR, Kawakami E. High *Helicobacter pylori* Resistance to Metronidazole and Clarithromycin in Brazilian Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Jun;56(6):645–8.
 39. Aiba Y, Nakano Y, Koga Y, Takahashi K, Komatsu Y. A highly acid-resistant novel strain of *Lactobacillus johnsonii* No. 1088 has antibacterial activity, including that against *Helicobacter pylori*, and inhibits gastrin-mediated acid production in mice. *Microbiologyopen*. 2015 Jun;4(3):465–74.
 40. Pero R, Brancaccio M, Laneri S, Biasi M-G De, Lombardo B, Scudiero O. A Novel View of Human *Helicobacter pylori* Infections: Interplay between Microbiota and Beta-Defensins. *Biomolecules*. 2019 Jun 18;9(6):237.
 41. Sheerin D, Openshaw PJ, Pollard AJ. Issues in vaccinology: Present challenges and future directions. *Eur J Immunol*. 2017 Dec;47(12):2017–25.
 42. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun*. 1995;63(1):94–8.
 43. Stubljar D, Jukic T, Ihan A. How far are we from vaccination against *Helicobacter pylori* infection? *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(10):935–45.
 44. Sijun H, Yong X. *Helicobacter pylori* vaccine: mucosal adjuvant & delivery systems. *Indian J Med Res [Internet]*. 2009 Aug [cited 2019 Aug 25];130(2):115–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797807>
 45. Zawahir S, Czinn SJ, Nedrud JG, Blanchard TG. Vaccinating against *Helicobacter pylori* in the developing world. *Gut Microbes*. 2013.
 46. Lee A. Animal models of *Helicobacter* infection. *Mol Med Today [Internet]*. 1999 Nov [cited 2019 Aug 21];5(11):500–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10610202>
 47. Lee JY. Animal models of *H. pylori* infection. In: *Helicobacter pylori*. Springer Singapore; 2016. p. 537–46.
 48. P. M, C. K, K.L. K, N. P, J.-L. B, D. B, et al. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. Vol. 116, *Gastroenterology*. 1999. p. 804–12.

49. Czinn SJ, Blanchard T. Vaccinating against *Helicobacter pylori* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(3):133–40.