



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Aline Libério Braga Rodrigues

Resposta imune da mucosa gástrica de pacientes com infecção por *Helicobacter pylori* e
forma digestiva da doença de Chagas

Uberaba

2015

Aline Libério Braga Rodrigues

Resposta imune da mucosa gástrica de pacientes com infecção por *Helicobacter pylori* e
forma digestiva da doença de Chagas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, como requisito parcial para
a obtenção do título de mestre em Ciências
Fisiológicas. Área de Concentração II:
Parasitologia, Imunologia e Microbiologia.
Orientador: Prof. Dra. Adriana Gonçalves de
Oliveira

Uberaba

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

R611r Rodrigues, Aline Libério Braga
Resposta imune da mucosa gástrica de pacientes com infecção por
Helicobacter pylori e forma digestiva da doença de Chagas / Aline Libério
Braga Rodrigues. -- 2015.
41 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientadora: Profª Drª Adriana Gonçalves de Oliveira

1. Doença de chagas. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Citocinas. I. Oliveira,
Adriana Gonçalves de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.
Título.

CDU 616.937

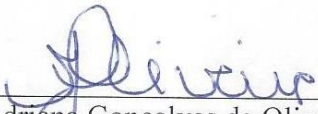
Aline Libério Braga Rodrigues

Resposta imune da mucosa gástrica de pacientes com infecção por *Helicobacter pylori* e
forma digestiva da doença de Chagas

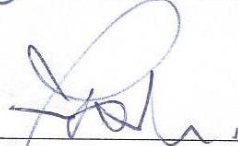
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, como requisito parcial para
a obtenção do título de mestre em Ciências
Fisiológicas. Área de Concentração II:
Parasitologia, Imunologia e Microbiologia.

16 de Dezembro de 2015.

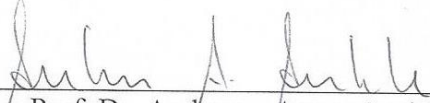
Banca Examinadora:



Prof.^a. Dr.^a. Adriana Gonçalves de Oliveira – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dr. José Roberto Mineo
Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Wanda (in memoriam) e Jorge,
e ao meu irmão Aristóteles, que dignamente me apresentaram
a importância da família e o caminho da honestidade e persistência*

*Ao meu noivo Wendell, pelo apoio incondicional
em todos os momentos, principalmente os de incerteza,
muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, coragem e força para concluir mais esta etapa em minha vida e que durante os momentos de desânimo me guiou fazendo com que eu continuasse a persistir nos meus objetivos.

Aos pacientes que gentilmente aceitaram participar deste trabalho e sem os quais, a realização do mesmo não seria possível.

À Profa. Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira pela orientação, disponibilidade, respeito, amizade, persistência, convivência e ensinamentos. Agradeço a confiança e a forma com a qual me recebeu em seu laboratório.

À Dr^a. Renata Margarida Etchebehere, Dr^a Iracema Saldanha Junqueira, Dr. Daurin Narciso da Fonseca, Dr. Eduardo Crema, Dr. Artur Assunção Araújo e ao Dr. Athos Vargas Silva, pela imensa colaboração neste estudo, realizando os exames histopatológicos dos fragmentos de mucosa gástrica, endoscopia digestiva alta nos pacientes incluídos e acompanhamento destes pacientes. Agradeço ainda pela convivência e aprendizado no dia-a-dia.

À Profa. Dra. Cristina Ribeiro Barros Cardoso pelos ensinamentos em imunologia e biologia molecular, pela disponibilidade em ajudar em todos os momentos, competência e dedicação.

À Fernanda Machado Fonseca e Jacqueline Batista Sousa por terem acompanhado de perto e participado em vários momentos, sempre contribuindo de forma positiva, com incentivo, boa vontade e amizade.

À Sônia Caiado, Leila Nunes (*in memoriam*), Miguela Freitas, Celso Tadeu, Luciene Bessa e Sueli Abrão pelo carinho, amizade construída ao longo destes anos e por tornarem mais descontraídos os momentos dentro do laboratório.

Agradeço às colegas da pós-graduação Larissa Beatriz Silva, Beatriz Virgínia da Silva, Ana Carolina B. Dulgheroff, Renata Beatriz Silva, Patrícia Borges Peixoto, Maxelle Martins Teixeira e Natália Conceição pelo companheirismo, convivência diária e exemplo de trabalho em equipe.

Às enfermeiras e funcionários do Serviço de Endoscopia do Ambulatório Maria da Glória pela contribuição durante as coletas e em especial à Cristina, Stephania e Mônica.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva, por todos os esforços para a manutenção dessa Pós-graduação, por sua competência profissional e entusiasmo pela pesquisa científica.

A todos os professores dessa Pós-Graduação que, de alguma forma, contribuíram para meu aprendizado.

À bibliotecária e também secretária da Pós-graduação, Elizabeth Perez Caramori Ambrósio, pela disposição em ajudar em todos os momentos, com sua alegria contagiante.

A CAPES pelos incentivos à pesquisa. À FAPEMIG e ao CNPQ pelos recursos disponibilizados para a realização desse projeto.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram durante a realização desta dissertação e que não foram citados anteriormente.

“Os nossos conhecimentos são a reunião do raciocínio e experiência de numerosas mentes.”

Ralph Emerson

RESUMO

Revisão: A presença de co-infecção pode alterar a resposta imune ao *Helicobacter pylori* e influenciar no aparecimento das lesões gástricas provocadas pela bactéria. Este estudo avaliou as alterações na expressão gênica das citocinas IFN γ , IL-1 β , IL-17 e IL-10, além da intensidade e atividade da gastrite em fragmentos de mucosa do antro gástrico de pacientes com forma digestiva da doença de Chagas e infecção por *H. pylori*. **Métodos:** Foram incluídos trinta e seis pacientes submetidos à esofagogastroduodenoscopia diagnóstica, divididos em mono infectados por *H. pylori* (n=13), co-infectados (n=8), chagásicos *H. pylori*-negativos (n=5) e controles não infectados (n=10). A análise histopatológica realizada de acordo com a classificação de Sidney. A expressão gênica das citocinas foi determinada pela PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção *Taqman* e método de quantificação relativa. Também foi realizada a PCR para detecção do gene *CagA* nas amostras de pacientes *H. pylori*-positivos. **Resultados:** Os pacientes mono infectados *H. pylori* apresentaram expressão de IFN- γ , IL-17 e IL-10 significativamente maior que os controles não infectados, além de maior grau de intensidade e atividade da gastrite. Pacientes co-infectados apresentaram redução significativa na expressão de IL-17 e na atividade da gastrite na comparação com os mono infectados por *H. pylori*. **Conclusões:** As citocinas dos perfis Th1 e Th17 representam um papel importante na resposta imune ao *H. pylori* e a presença de co-infecção por *T. cruzi* parece influenciar na resposta th17 ao *H.pylori*, evidenciada pela diminuição da expressão da IL17 nos pacientes co-infectados.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, Doença de Chagas, Citocinas

ABSTRACT

Review: *Helicobacter pylori* infection is well known recognized for gastric lesion and cancer. Co-infection with other microorganisms may alter the immune response against *H. pylori* and influence the appearance of the gastric lesions. In order to evaluate the influence of co-infection in gastric mucosa of patients infected by *H. pylori* we assessed gene expression of cytokines IFN γ , IL-1 β , IL-17 and IL-10, and the level of gastritis activity in antrum fragments of gastric mucosa of patients with digestive form of Chagas disease. **Methods:** Thirty six patients undergoing esophagogastroduodenoscopy were studied. They were divided into monoinfected by *H. pylori* (n = 13), co-infected *H. pylori/Trypanosoma cruzi* (n = 8), chagasic *H. pylori*-negative (n = 5) and non-infected controls (n = 10). Histopathological analysis was performed according to the updated Sydney classification. The expression of gene cytokines was determined by Real-Time PCR using the *Taqman* detection system and the method of relative quantification. PCR was also performed to detect *cagA* gene in samples of *H. pylori*-positive patients. **Results:** The monoinfected *H. pylori*-positive patients showed a significantly higher expression of IFN- γ , IL-17, and IL-10, even as more severe activity of gastritis than non-infected controls. The co-infected patients had a significant reduction in IL-17 expression and activity of gastritis compared to the *H. pylori* monoinfected patients. **Conclusion:** The cytokine of Th1 and Th17 profiles performs a major role in the immune response against to *H. pylori* and the presence of co-infection by *T. cruzi* seems to influence Th17 response to *H.pylori*, as evidenced by decreased expression of IL17 in patients co-infected.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, Interleukin-17, cytokines

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características de gênero e idade dos diferentes grupos de pacientes com infecção por <i>H. pylori</i> , forma digestiva da doença de Chagas e grupo controle.	38
---	-----------

FIGURA 1. Comparação da expressão gênica de citocinas em fragmentos da região **39**
do antro gástrico nos diferentes grupos de pacientes com infecção por
H. pylori, forma digestiva da doença de Chagas e grupo controle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BALB/c - Linhagem genética do camundongo albino

¹³C - Carbono 13

Cag A – *Citotoxi-Associated gene A*

Cag- PAI - *Pathogenicity Island*

Células G – Células produtoras de gastrina

C_T – *Thershold Cicle*

DC - doença de Chagas

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

Fig- Figura

GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

et al - E colaboradores

H. pylori - *Helicobacter pylori*

Hp - *Helicobacter pylori*

IFN - Interferon

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

Kb - Kilobase

MALT - *Mucosa-associated lymphoid tissue*

mg - Miligrama

MG - Minas Gerais

mL - Mililitro

µg - Micrograma

µm - Micrômetro

PBMC - Células Mononucleares do Sangue Periférico

P - Probabilidade de significância estatística

pb - Pares de bases

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

Receptores H₂ - Receptores Histaminérgicos do tipo 2

RNA - Ácido Nibonucleico

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TGF - Fator Transformante de Crescimento

Treg - Célula T reguladora

Th – Célula T Helper

TNF- Fator de Necrose Tumoral

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UFTM- Universidade Federal do Triângulo Mineiro

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA.....	10
REFERÊNCIAS.....	17
APÊNDICE A – MANUSCRITO	22
COMPROVANTE DE SUBMISSÃO.....	40
PARTICIPAÇÃO DE CO-AUTORES DO ARTIGO.....	41

Revisão da literatura

A bactéria *Helicobacter pylori* foi isolada pela primeira, em 1982, a partir de fragmentos de mucosa gástrica de pacientes com gastrite (Marshall & Warren, 1984). Estudos subsequentes confirmaram a hipótese inicial de que a bactéria estaria associada à gastrite crônica e à úlcera péptica (Megraud et al., 1992; Blaser, 1995). Posteriormente, a infecção pelo *H. pylori* também foi associada ao linfoma gástrico do tipo MALT (tecido linfoide associado à mucosa) e, em 1994, o microrganismo foi considerado pela Organização Mundial de Saúde como um fator essencial na patogênese do carcinoma gástrico (WHO, 1994).

Não obstante muitos aspectos da epidemiologia da infecção pelo *H. pylori* ainda não tenham sido esclarecidos, há evidências de que a aquisição ocorre geralmente na infância, na idade pré-escolar, geralmente pela via oral-oral ou fecal-oral, persistindo por toda a vida do indivíduo (Lee, 1994; Cave, 1996; Rocha et al., 2003).

Sabe-se, atualmente, que cerca de metade da população mundial apresenta a bactéria no estômago. Em populações da América do Norte e Norte Europeu, cerca de um terço dos adultos estão infectados, enquanto que no sul e leste da Europa, América do Sul e Ásia, a prevalência de infecção por *H. pylori* é, em geral, maior do que 50% (Eusebi et al., 2014).

No Brasil, a prevalência da infecção por esse microrganismo é bastante variável devido o fato de ser um país continental composto por diversas etnias, hábitos culturais e níveis socioeconômicos (Souto et al., 1998). Em geral, as taxas mais elevadas são encontradas em regiões de nível socioeconômico mais baixo. Recentemente, Pachecho et al. (2013) compararam vários testes de diagnóstico e relataram uma prevalência de infecção por *H. pylori* de 41,1% em indivíduos com idade entre 2-19 anos de idade no estado de São Paulo.

Uma vez que a mucosa gástrica é colonizada, a bactéria pode permanecer por décadas ou por toda a vida no hospedeiro. No entanto, a maioria dos indivíduos permanece assintomática à infecção (HSu et al., 2002; Yamaoka et al., 2010). A infecção pelo *H. pylori* está sempre associada à presença de gastrite, que se caracteriza por reação inflamatória da mucosa com infiltração de leucócitos mono e polimorfo nucleares, em proporção e intensidade variáveis (Israel & Peek, 2001). Por outro lado, as doenças graves associadas à infecção tais como úlcera péptica e a gastrite atrófica, que pode evoluir para o câncer gástrico, ocorrem apenas em cerca de 10-20% dos indivíduos *H. pylori*-positivos. Estudos demonstram que a gênese destas doenças é multifatorial e depende das características de virulência da bactéria, da resposta imune do hospedeiro e do ambiente (Israel & Peek, 2001).

A capacidade de persistência e adaptação do *H. pylori* ao ambiente gástrico se deve a alguns fatores de virulência, comuns a todas as amostras. Dentre esses fatores está a enzima urease capaz de converter a ureia presente em condições fisiológicas no suco gástrico em amônia, promovendo a alcalinização do ambiente gástrico e protegendo a bactéria dos efeitos deletérios da acidez estomacal (Weekes et al., 2001). Além disso, para atravessar a camada de muco e estabelecer o contato íntimo com o epitélio o microrganismo conta com a morfologia em forma de espiral, flagelos e a produção de lipases e proteases que degradam a camada de muco e facilitam sua progressão (Jenks & Kusters, 2000). Outras enzimas sintetizadas pela bactéria tais como superóxido dismutase, catalase e arginase conferem proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (Hazell et al., 1991).

Outros fatores de virulência, presentes somente em algumas amostras de *H. pylori*, parecem estar relacionados ao surgimento das doenças mais graves associadas à infecção. Um desses fatores é a proteína *CagA* (*cytotoxin-associated gene A*) cujo gene se encontra localizado em uma região importante do genoma do *H. pylori* denominada de *cag*-PAI (*pathogenicity island*), contém aproximadamente 37 kb e cerca de 28 genes (Fischer et al., 2001; Suzuki et al., 2012). A presença da proteína *CagA* está associada ao aumento da secreção de interleucina 8 (IL-8), que é importante para a quimiotaxia e para a ativação de neutrófilos (Hsu et al., 2002). Esta proteína é transferida para dentro da célula hospedeira através de um sistema de secreção tipo IV, sendo responsável por remodelações na superfície celular, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, o que resulta em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas (Asahi et al., 2000; Watada et al., 2011; Odenbreit et al., 2000).

Quanto ao papel da resposta imune do hospedeiro na patogenia das lesões associadas à infecção pelo *H. pylori*, foi demonstrado que há uma intensa resposta inflamatória frente à bactéria com a participação de células T e B que induzem a liberação de várias citocinas e produção de anticorpos locais e sistêmicos. Apesar da magnitude da resposta imune, o microrganismo raramente é eliminado e a inflamação da mucosa gástrica se perpetua na ausência de tratamento (Blaser & Atherton, 2004).

Na resposta imune adaptativa é esperada uma resposta do tipo Th2 frente infecção por *H. pylori*, visto se tratar de uma bactéria considerada até então como extracelular, no entanto, o que se observa é um predomínio da resposta Th1 (Bamford et al., 1998; Sommer et al., 1998). Essa resposta do tipo Th1 tem sido relacionada com a ocorrência de lesões mais graves associadas à infecção pela bactéria. Na análise de biópsias da região do antro de indivíduos com úlcera foram detectados altos níveis do RNAm de IFN- γ e TNF- α , citocinas do padrão Th1, sem detecção de IL-4, de padrão Th2. Enquanto que em biópsias de pacientes

com gastrite sem úlcera houve detecção do RNAm da IL-4 (D'Elis et al., 1997; Orsini et al., 2003).

A alta produção de citocinas pró-inflamatórias na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* tem papel importante na interrupção da homeostase da produção de ácido na mucosa gástrica. A alta produção de IL-1 β e TNF- α induzem um estado de hipocloridria pela inibição da secreção ácida pelas células parietais e a produção de gastrina pelas células G é estimulada pelas citocinas IL-8, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α (Wilson & Crabtree, 2007)

Também tem sido demonstrado o envolvimento das células Th17 na resposta imune ao *H. pylori*. Alguns autores têm demonstrado a produção de altos níveis de IL-17 em consequência da infecção pelo microrganismo, e sugerido o papel das células Th17 no processo inflamatório característico da infecção pela bactéria (Mizuno et al., 2005). A IL-17 estimula a liberação pelas células epiteliais gástricas de IL-8, que é um potente fator de ativação de neutrófilos e quimiocinas cujos seus níveis estão diretamente relacionados com a gravidade da gastrite (Luzza, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado que as infecções por outros agentes infecciosos que ocorrem paralelamente à infecção por *H. pylori* podem modular a resposta imune produzida frente à bactéria e, dessa forma, determinar o aparecimento de lesões maior ou de menor gravidade, dependendo do balanço entre as respostas Th1 e Th2. Estes estudos foram realizados na busca de uma explicação para as variações geográficas de incidência do câncer gástrico em seres humanos (Whary et al., 2005; Du et al., 2005; Stoicov et al., 2004).

Entre pacientes colombianos da região de Pasto observa-se alta ocorrência de câncer gástrico apesar da baixa taxa de infecção por *H. pylori*, o inverso ocorre na região de Tumaco onde há baixa ocorrência do câncer gástrico, mesmo com elevadas taxas de infecção pela bactéria. Um estudo com pacientes das duas regiões usou os níveis séricos das subclasses de IgG específicas para *H. pylori* como uma evidência indireta do perfil da resposta imune

celular. Entre os pacientes de Tumaco foram detectados níveis mais elevados de IgG1 que está associada a uma resposta Th2 predominante, quando comparado com os pacientes de Pasto. Esses efeitos foram atribuídos a maior taxa de infecção por helmintos detectada nos pacientes da região de Tumaco (Whary et al., 2005).

Outro estudo, realizado com pacientes chineses, avaliou o efeito da co-infecção por *Schistosoma japonicum* sobre o perfil da resposta imune e a ocorrência de atrofia associada à infecção por *H. pylori* (Du et al., 2005). Nesse estudo, os indivíduos co-infectados apresentaram níveis mais elevados de IgG1 sérica para *H. pylori*, evidenciando a polarização da resposta imune para o tipo Th2. Além disso, ainda foi detectado um menor grau de atrofia gástrica representada pela elevada da razão entre pepsinogênio I/II séricos, quando comparado com indivíduos infectados apenas por *H. pylori*.

Os efeitos da ocorrência de infecção por microrganismos intracelulares, que induzem resposta Th1, concomitantemente a infecção por *H. pylori* nunca foram avaliados em seres humanos. Todavia, em um modelo experimental de infecção por *Helicobacter felis* e o parasita intracelular *Toxoplasma gondii* observou-se que os animais co-infectados desenvolveram inflamação mais intensa da mucosa gástrica, perda das células parietais e alterações metaplásicas em decorrência da intensificação da resposta Th1, evidenciada pelo perfil de produção de citocinas na mucosa gástrica (Stoicov et al., 2004).

Apesar de alguns estudos terem evidenciado uma alta prevalência de *H. pylori* em pacientes com doença de Chagas crônica (Fonseca et al., 2012; Pinazo et al., 2010; Oliveira et al., 1997; Nascimento et al. 2002), os fatores que predispõem os chagásicos a desenvolverem a infecção por essa bactéria ainda não são conhecidos e nem as alterações da resposta imune que possam ocorrer na vigência de co-infecção por esses importantes patógenos.

A doença de Chagas é uma enfermidade crônica que afeta cerca de 8 a 10 milhões de pessoas em todo mundo, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi* que transmitido principalmente pela via vetorial (Rassi et al., 2010). A evolução clínica da doença é altamente variável. Após a contaminação, o indivíduo desenvolve a fase aguda da doença com duração média entre 3 a 8 semanas, que se caracteriza pelo alto parasitismo. Nos indivíduos não tratados, instala-se a fase crônica, de longa duração, caracterizada por baixa parasitemia e pela presença de resposta imune anti-*T. cruzi* com grande diversidade de manifestações clínicas (Prata, 1999; Prata, 2001). Nessa fase crônica da doença, distinguem-se diferentes formas anatomoclínicas, dentre elas, a forma indeterminada, cardíaca, digestiva e mista.

Atualmente, acredita-se que a resposta imune dirigida contra o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, ou contra componentes do próprio hospedeiro possa desempenhar um papel importante na patogênese das formas crônicas da doença de Chagas. No entanto, o papel da resposta imune na patogênese da doença de Chagas seja pouco estudado.

Estudos experimentais realizados em camundongos demonstram que uma resposta imune Th1, caracterizada pela produção de interferon IFN- γ e TNF- α é importante no controle do parasitismo (Alibert et al.; 1996; Martins et al., 1999; Silva et al., 1998), enquanto a produção das interleucinas IL-4 e IL-10 está relacionada ao parasitismo sustentado (Abrahamsohn et al., 1996; Reed et al., 1994). No entanto, a alta produção de óxido nítrico estimulada por TNF- α está envolvida na denervação do plexo mioentérico na fase aguda em camundongos infectados com *T. cruzi* (Oliveira et al., 1999).

Outro estudo com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) derivadas de indivíduos com as formas clínicas digestiva e indeterminada revelou um aumento na produção basal de IFN- γ nas células de indivíduos com a forma digestiva em comparação com a forma indeterminada (Ribeiro et al., 2008). O balanço das citocinas Th1/Th2, representado pelos níveis de IFN- γ e IL-4, foi favorável ao IFN- γ que apresentou maiores níveis que IL-4 e o balanço inflamatório avaliado com base nas taxas de TNF- α e IL-10, tanto na forma digestiva quanto na forma indeterminada, foi favorável a IL-10. No entanto, o balanço inflamatório foi significativamente maior nos pacientes com a forma digestiva em comparação com a forma indeterminada. Esses resultados indicam o papel da resposta inflamatória no desenvolvimento das lesões da forma digestiva.

Referências

- Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Medicine*. 2000;191(14):593-602.
- Abrahamssohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. 1996;84:231-44.
- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzineli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin 12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*. 1996;6:961-67.
- Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterol*. 1998;114:482-92.
- Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? *Annals Med*. 1995;27:559-63.
- Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*. 2004;113:321-33.
- Cave DR. Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Am J Med*. 1996;100:12S-18S.
- D'Élios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burroni D, et al. Th1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol*. 1997;158:962-67.
- Du Y, Agnew A, Ye XP, Robinson PA, Forman D, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* and *Schistosoma japonicum* co-infection in a Chinese population: helminth infection alters humoral responses to *H. pylori* and serum pepsinogen I/II ratio. *Microb Infect*. 2006; 8(1):52-60.

- Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014 doi:10.1111/hel.12165
- Fonseca FM, Queiroz DMM, Rocha AMC, Prata A, Crema E, Rodrigues Jr V, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chagasics and non-chagasic patients from the same geographical region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*.2012;45(2):194-98.
- Hazell SL, Evans DJ, Graham DY. *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol*.1991;137(1):57-61.
- Hsu PI, Hwang IR, Citty D, Lai KH, El-Zimaity HM, Gutierrez O, et al. Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Am J Gastroenterol*.2002;97(9):2231-2238.
- Israel DA, Peek RM. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther*.2001; 5(9):1271-1290.
- Jenks PJ, Kusters JG. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Gastroenterol*.2000;16:11-18.
- Lee A. The microbiology and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol*.1994;29(S201):2-6.
- Luzza F, Parrello T, Monteleone G, Sebkova L, Romano M, Zarrilli R, et al. Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa.*J Immunol* 2000;165:5332-37.
- Martins GA, Viera LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun*. 1999;67:3864-67.
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*.1984;323(8390):1311-15.

- Mégraud F, Lamouliatte H. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Dig Dis Sci.1992; 37(5):769-772.
- Mizuno T, Ando T, Nobata K, Tsuzuki T, Maeda O, Watanabe O, et al. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. World J Gastroenterol. 2005;11:6305-11.
- Nascimento RS, Valente SR, Oliveira LCM. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chronic chagasic patients, and in the rural and urban population from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.2002;44(5):251-254.
- Oliveira LC, Borges MM, Leal RC, Assreuy J, Kloetzel JK. Nitric oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Calomys callosus* and Swiss mice. Parasitol Res.1999;83:762-70.
- Odenbreit S PJ, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science. 2000; 287(5457):1497-1500.
- Orsini B, Ottanelli B, Amedei A, Surrenti E, Capanni M, Del Prete G, et al. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island is associated with reduced expression of IL-4 mRNA and modulation of IL-4 α 2 mRNA isoform in human gastric mucosa. Infect Immun.2003; 71:6664–67.
- Pacheco SL, Ogata SK, Machado RS, Patrício FRS, Pardo MLE, Kawakami, E. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by Means of Reduced-Dose 13C-Urea Breath Test and Early Sampling of Exhaled Breath. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2013;57:607-611.
- Pinazo MJ, Elizalde JI, Posada EJ, Gascón J. Co-infection with two emergent old pathogens: *Trypanosoma cruzi* and *Helicobacter pylori*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:751-52.
- Prata A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its Discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz.1999;94 (suppl. I): 81-88.

- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(2): 92-100.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas Disease. *Lancet* 2010;375:1388-1402.
- Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 1994;73:135-40.
- Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues Jr V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chaga's disease. *Human Immunol.* 2008; 69:484-489.
- Rocha GA, Oliveira AMR, Queiroz DMM, Mendes SEM, Moura SB, Oliveira CA, et al. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by Cobas Core ELISA in adults from Minas Gerais, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(10):1263-68.
- Silva JS, Alibert JCS, Martins MA, Souto JT, Padua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:111-15.
- Sommer F, Faller G, Konturek P, Kirchner T, Hahn EG, Zeus J, et al. Antrum and corpus mucosa-infiltrating CD4+ lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect Immun.* 1998;66: 5543-46.
- Souto JJD, Fontes CJF, Rocha AG, Oliveira AMR, Mendes EN, Queiroz DMM. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in a Rural Area of the State of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998; 93(2):171-174.
- Stoicov C, Whary M, Rogers AB, Lee FS et al. Coinfection modulates inflammatory responses and clinical outcome of *Helicobacter felis* and *Toxoplasma gondii* infections. *J Immunol.* 2010; 173:3329-36.
- Watada M, Shiota S, Matsunari O, Suzuki R, Murakami K, Fujioka T, et al. Association between *Helicobacter pylori cagA* related genes and clinical outcomes in Colombia and Japan. *BMC Gastroenterol.* 2011;11(1):141.

Weeks DL, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Microbiol.*2001;40(6):1249-89.

Whary MT, Sundina N, Bravo LE, Correa P, Quinones F, Caro F, et al. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*2005;14(6):1464-1469.

Yamaoka, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*2010;7(11):629-641.

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

WHO-World Health Organization. The evaluation of carcinogenic risks to humans. Report. Lyon, France; 1994. (WHO- International Agency for Research in Cancer Monographs, 61).

APÊNDICE A***Helicobacter pylori* and *Trypanosoma cruzi* co-infection decrease IL-17 expression in gastric mucosa****Running title:** IL-17 decrease expression in *H. pylori* and *T. cruzi* in co-infectionAline Libério Braga Rodrigues¹Fernanda Machado Fonseca^{1, 6}Jacqueline Batista Sousa¹Renata Margarida Etchebehere²Iracema Saldanha Junqueira⁴Dulciene Maria de Magalhães Queiroz⁵Adriana Gonçalves de Oliveira^{1*}

¹Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, ²Serviço de Patologia Cirúrgica, ³Serviço de Endoscopia, e ⁴Serviço de Gastroenterologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

⁵Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil.⁶

***Autor correspondente:**

¹Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Praça Manoel Terra, 330, 38015-050, Uberaba, MG, Brasil. E-mail: agoliveira@deb.uftm.edu.br

Abstract

We assessed the gene expression of IFN γ , IL-1 β , IL-17 and IL-10, and the level of gastritis activity in gastric mucosa of chagasic patients with the digestive form coinfecting with *H. pylori*. Thirty six patients were divided into *H. pylori* monoinfected (n=13), coinfecting *H. pylori/T. cruzi* (n=8), chagasic *H. pylori*-negative (n=5) and uninfected (n=10) group. Histological analysis was performed according to the Updated Sydney System. Gene expressions of cytokines were measured by quantitative real-time PCR. The expression of IFN- γ , IL-17, and IL-10 was significantly higher, even as the activity of gastritis in *H. pylori*-positive patients than in uninfected. The coinfecting patients had a significant reduction in IL-17 expression and activity of gastritis. Th1 and Th17 cytokines perform a major role in the immune response against to *H. pylori* and the coinfection by *T. cruzi* seems to influence Th17 response to *H.pylori*, as evidenced by decreased expression of IL17 in patients coinfecting.

Keywords: *Helicobacter pylori*; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Interleukin-17; cytokines; coinfection.

Introduction

Helicobacter pylori colonizes the gastric mucosa in half of the world population and if not treated, persists throughout life of the individual. Its presence in the stomach is always associated with chronic gastritis, remaining asymptomatic in most cases and in some instances may progress to peptic ulcer and gastric cancer. The genesis of gastric diseases is multifactorial and depends on the virulence of bacteria, the host immune response and the environment [1].

The gastritis associated to *H. pylori* infection results of a complex interaction between T cell subpopulations [2]. Because it is an extracellular organism, a Th2 response against *H. pylori* was expected, however, the balance of the cell response is benefiting Th1 and Th17 cells that have been identified as responsible for the support of an intense inflammatory response, unable to eliminate the organism and directly involved in tissue damage [3]. The role of regulatory T cells (Tregs) is still controversial, once the local response of Tregs can protect the gastric mucosa of exacerbated inflammation and tissue damage, even as can represent an escape mechanism of bacteria through limiting inflammatory response [4]. Studies have shown that the protective phenotype is Th2, since the transfer of Th2 lymphocytes of animals immunized against *Helicobacter felis* to the non-immunized caused an intense decrease in the density of infection, as occurred an increase in the number of bacteria in IL-4 knockout mice [5].

The use of experimental models have shown that the presence of coinfection can change the balance Th1/Th2 produced in presence of *H. pylori*, influencing the appearance of lesions and favoring the growth of bacteria in stomach of these animals [6,7,8]. Changes in humoral response opposite to *H. pylori* in humans coinfecting with intestinal parasites [9] and *Schistosoma japonicum* [10] have also been described.

To date, it is not clear why some populations with a high prevalence of *H. pylori* infection presents low occurrence of severe injuries, but it is well known that the virulence factors and genetic characteristics of the bacteria that can modulate the host immune response [11]. Previous studies have shown a high prevalence of *H. pylori* infection in patients with Chagas disease [12,13], although the changes in immune response in the presence of the coinfection *H. pylori/T. cruzi* have not been investigated yet.

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered endemic in Latin America affecting about 8-10 million people worldwide [14]. The transmission occurs mainly via vector; once the individual acquires the parasite, infection course starts with an acute phase, followed by chronic phase that can be a symptomatic or asymptomatic [15]. In this study, we evaluated the expression of cytokines IL-1 β , IFN- γ , IL-17 and IL-10, as well as the level and activity of gastritis on gastric mucosa of patients with digestive form of Chagas disease coinfecting with *H. pylori*.

Methods

This study was approved (protocol 687) by the Ethics Committee of the Triângulo Mineiro Federal University (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brazil and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients signed the written informed consent forms and answered a socio-demographic questionnaire. The clinical information was obtained by reviewing the patients' medical records.

Clinical samples. Were included adult outpatients who underwent esophagogastroduodenoscopy at the Endoscopic Service of UFTM, for an evaluation of dyspeptic symptoms, follow-up for chagasic megaesophagus, and as a preoperative requirement for bariatric surgery (control group). The patients were divided in groups according to the *H. pylori* status and the presence of digestive form of Chagas disease (CD).

The biopsy specimens were obtained from the gastric antrum for histological and molecular analysis. Additionally, a sample of blood was collected for the serological diagnosis of CD. Were excluded patients with infectious disease beyond of *H. pylori* and the digestive form of CD, autoimmune disease, immunosuppression, pregnancy, coagulation disorders, perforation and/or gastric bleeding, anatomical impediment to examination, esophageal varices, concomitant serious disease, and those who received antimicrobial drugs, anti-cholinergic, anti-inflammatory or proton pump inhibitors for at least 30 days before endoscopy.

Chagas disease diagnosis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Chagatest ELISA, Wiener Laboratories, Rosario, Argentina), hemagglutination (Chagatest HAI, Wiener Laboratories, Rosario, Argentina) and immunofluorescence (Immuno-Con Chagas, WAMA Diagnóstica, São Carlos, Brazil) tests were performed. The chagasic patients showed positive reactions to at least two serological tests. The digestive form of CD was diagnosed based on

the electrocardiogram results and radiographic contrast examination of the esophagus and colon.

Diagnosis of *H. pylori* infection. Histological analysis, urea breath test and PCR to 16S rRNA region was performed. The diagnosis of *H. pylori* infection was considered positive when at least two tests were positive.

¹³C-Urea breath test. After 6 hours of fasting, a breath sample of patient was collected in a suitable container (basal sample). Then, an oral dose of 75mg of ¹³C-urea dissolved in 200mL of orange juice was administered. After 30 minutes, an additional breath sample was collected (sample test). The ¹³C concentration was determined using an infrared spectrometer detector isotope (IRIS analyser Wagner Analysen Technik, Worspswede, Germany). An increase of 4% in the ¹³C content of the test sample compared to the basal sample was considered positive to *H. pylori* [16].

***H. pylori* 16S RNA gene.** The DNA extraction from gastric fragment was performed using QIamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The *H. pylori* DNA was detected by the amplification of 16S rRNA gene by PCR using specific primers [17].

Histological analysis. The antrum gastric fragments were fixed in formalin, dehydrated in alcohol and xylene, and embedded in paraffin. Then, each paraffin block was sliced to 4- μ m thickness and stained with hematoxylin and eosin for examination. The degrees of gastritis (mononuclear cells) and of gastritis activity (polymorphonuclear cells) were assessed in accordance with the Updated Sydney System [18]. *H. pylori* was detected using Warthin-Starry staining.

***cagA* gene detection.** The *cagA* status of *H. pylori* was determined by the PCR method, as described previously [19].

Real Time PCR. The RNA was extracted from the antral mucosa fragments using the SV Total RNA Isolation kit (Promega, Madison, USA) and its concentrations were determined by

spectrophotometer. The reverse transcription was performed from 1µg RNA using oligo (dT) 15 primer (Promega, Madison, EUA) and moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, EUA). The reactions were carried out in duplicate using 1µg of cDNA in the 7500 Real-Time PCR System Fast (Applied Biosystems, Foster City, USA) using Taqman® Fast Universal PCR Master Mix for the probes GAPDH, IL1β, IFN-γ, IL-10 and IL-17 (Applied Biosystems; references: 4333764f, Hs01555410_m1, Hs00989291_m1, Hs99999035_m1, and Hs99999082_m1, respectively). The relative expression of cytokines was determined according to method $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [20]. The results were normalized using GAPDH and a pool of samples of uninfected patients was used as calibrator.

Data analysis. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (version 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. The differences regarding gender and presence of the *cagA* gene were compared by chi-square or Fisher's exact test. The differences between the age groups were compared by analysis of variance (ANOVA). The intensity (mononuclear cell), activity (polymorphonuclear cell) of gastritis and genic expression of cytokines were compared by the Mann-Whitney U test. Analysis with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Thirty six patients were included. Of these, 13 (36.1%) patients were *H. pylori*-positive (HP+ CD-), eight (22.2%) coinfecting patients (HP+ CD+), five (13.8%) chagasic *H. pylori*-negative (HP- CD+) and 10 (27.7%) uninfected (HP- CD-).

No difference regarding the age was observed between the *H. pylori*-positive and *H. pylori*-negative groups, but, the mean age of chagasic patients was higher (65.0 ± 9.29 years) than non-chagasic (49.8 ± 7.01 years) ($p < 0.05$). *cagA* gene was detected in three (23.1%) patients of HP+CD- group and in five (62.5%) of HP+CD+ group ($p=0.16$).

The mononuclear cell infiltration was significantly higher in HP+CD- and HP+CD+ groups than in HP-CD- ($p<0.01$) as well as when compared the HP-CD+ group with uninfected controls ($p<0.05$) (Table1). The polymorphonuclear cell infiltration was higher in HP+CD- group than in uninfected ($p<0.01$). Additionally, there was a significantly reduction of PMN cells in HP+CD+ when compared to HP+CD- ($p=0.03$).

The expression of IFN- γ , IL-10 and IL-17 gene was higher in HP+CD- group than in uninfected ($p<0.05$). However, the expression of IL-1 β gene has also been increased but not significant ($p=0.15$). The patient group HP+CD+ group had an increased expression of all cytokines when compared with HP-CD-, however, a significant result was only observed for IL-17. Among the HP-CD+ group, the expression of IL-10 and IFN- γ cytokines in gastric mucosa was higher when compared to HP-CD- group ($p<0.05$).

IL-17 expression was significantly higher in the group monoinfected by *H. pylori* than in HP+CD+ group ($p<0.01$). There was also a decrease in IFN- γ expression in HP+CD+ group compared to HP+CD- but the difference lacked statistical support ($p>0.05$).

Discussion

Despite being an extracellular organism, the immune response elicited by *H. pylori* is mediated mainly by Th1/Th17 cells, characterized by high levels of IFN- γ and IL-17 in the gastric mucosa of infected individuals [21,22,23], besides the production of IL-10 and TGF- β by regulatory lymphocytes [24]. The IL-4 produced by Th2 cells, is not usually detected in the gastric mucosa of *H. pylori* infected individuals [25].

Our results have shown that HP+CD- group present significant higher expression levels of the cytokines IL-17, IL-10 and IFN- γ in comparison with the uninfected group (HP-CD-). A higher expression of IL-17 and IFN- γ in the gastric mucosa of *H. pylori*-positive subjects has been found in adults from Bangladeshi and Sweden compared to uninfected controls [26], even as higher levels of IL-17A and expression of IL-17A mRNA also were observed in the gastric mucosa of *H. pylori*-positive adults from Italy [23]. In Brazil, higher levels of IL-17, IL-10 and IL-1 β were found in gastric mucosa of adults and children *H. pylori*-positive, by ELISA, when compared to *H. pylori*-negative [27].

The high levels of expression of Th1 and Th17 cytokines found in the gastric mucosa of HP+CD- group are in agreement with the results of the histopathological analysis, where these patients showed levels of PMN and mononuclear infiltrate significantly higher than uninfected patients (Table 1). IL-17 and IFN- γ contributes to the protection against *H. pylori* due to stimulating the production of chemoquines responsible for the recruitment of polymorphonuclear and mononuclear cells to the site of infection [26].

In the cardiac form of CD, the predominant immune response is Th1 [28], however, the profile of immune response of digestive form still has been poorly studied. PISSET et al. (2009) compared the plasma levels of IFN- γ , IL-10, TNF- α and of immunoglobulin IgG3 and IgG4 among patients with different clinical forms of CD and uninfected controls by ELISA. In chagasic patients with the digestive form, higher levels of IL-10 and IgG4 compared to the

non-chagasic controls were found, which was attributed to the fact that increased IL-10 may contribute to the higher levels of IgG4 by inhibition of IFN- γ and favoring, indirectly, a Th2 profile deviation [29]. Furthermore, increase in IL-10 could regulate the inflammatory process due to its immunomodulatory properties or allowing the escape of the parasite. In other studies that evaluated the production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells of patients digestive form, it was found higher IFN- γ levels, as compared to the controls [30, 31].

The presence of coinfection *Helicobacter felis/Toxoplasma gondii* resulted in an increase in IFN- γ and IL-12 expression, and a reduction of IL-10 in the BALB/c mice coinfecting. These changes were associated with intense inflammation of the gastric mucosa, destruction of the parietal cells, atrophy and metaplastic changes [7]. Despite being an infection by intracellular protozoan, changes caused by *T. cruzi* in patients with the digestive form of CD were different from those found in the experimental model of coinfection with *T. gondii*. Thus, the profile proinflammatory cytokines Th17 present in *H. pylori* infection and the Th1 profile, present in both infections, were decreased while the IL-10 regulatory profile remained unchanged. According to these results, it is possible to suppose that the changes observed in coinfecting patients might be due to the action of regulatory T lymphocytes, as evidenced by the high production of IL-10. Other studies evaluating different cytokines and specific markers for regulatory T cells, as well as other subpopulations of T cells, are required and thus this hypothesis can be further investigated.

The results of this study confirm the involvement of cytokines of Th1 and Th17 profiles in the gastric mucosa of patients infected by *H. pylori*. Additionally, the coinfection *H. pylori/T. cruzi* in patients with digestive form of CD seems to influence the response of Th17 cells in gastric mucosa of patients infected by *H. pylori*, since the IL-17 expression was decreased while the IL-10 remained unchanged.

Acknowledgments

We thank all the patients for their contribution with the clinical samples.

Financial Support

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. A.L.B.R., F.M.F., J.B.S. were fellows from CAPES.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Cellini L. *Helicobacter pylori*: a chamaleon-like approach to life. World J Gastroenterol. 2014; 20(19):5575-82.
2. Larussa T, Leone I, Suraci E, Imeneo M, Luzza F. *Helicobacter pylori* and T helper cells: mechanisms of immune escape and tolerance. J Immunol. Res. 2015; Article ID 981328.
3. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. Gastroenterol. 2007; 133(1):288-308.
4. Raghavan S, Quiding-Jarbrink M. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2012; 12(1):71-85.
5. Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N, Czinn. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: Th1 cells enhance gastritis and Th2 cells reduced bacterial load. 1997; 113(6):1848-57.
6. Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang T, Shi HN, et al. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces *helicobacter*-induced gastric atrophy. Nat Med. 2000; 6:536-42.
7. Stoicov C, Whary M, Rogers AB, Lee FS, Lee FS, Kluccevesk K, et al. Coinfection modulates inflammatory responses and clinical outcome of *Helicobacter felis* and *Toxoplasma gondii* infections. J Immuno. 2004 ;173:3329-36.
8. Martin HR, Shakya KP, Muthupalani S, Ge Z, Klei TR, Whary MT, et al. *Brugia filariasis* differentially modulates persistent *Helicobacter pylori* gastritis in the gerbil model. Microbes Infect. 2010 ;12:748-58.
9. Whary MT, Sundina M, Bravo LE, Correa P, Quinones F, Caro F, et al. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*:

possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 ; 14:1464-69.

10. Du Y, Agnew A, Ye XP, Robinson PA, Forman D, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* and *Schistosoma japonicum* coinfection in Chinese population: helminth infection alters humoral responses to *H. pylori* and serum pepsinogen I/II ratio. *Microbes Infect.* 2005 ;8:52-60.

11. Lemke LB, Ge Z, Whary MT, Feng Y, Rogers AB, Muthupalani S, et al. Concurrent *Helicobacter bilis* infection in C57BL/6 mice attenuates proinflammatory *H. pylori*-induced gastric pathology. *Infect Immun.* 2009 ;77:2147-58.

12. Nascimento RS, Valente SR, Oliveira LCM. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chronic chagasic patients, and in the rural and urban population from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2002 ;44:251-254.

13. Fonseca FM, Queiroz DMM, Rocha AMC, Prata A, Crema E, Rodrigues Jr V, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chagasis and non-chagasic patients from the same geographical region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 ;45(2):194-98.

14. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas Disease. *Lancet* 2010; 375:1388-1402.

15. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1:192-100.

16. Cardinali LCC, Rocha GA, Rocha AM, Moura SB, Figueiredo TS, Esteves AM, et al. Evaluation of ¹³C-urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):3334-35.

17. Riley LK, Franklin CL, Hook Jr RR, Besch-Williford C. Identification of murine *Helicobacters* by PCR and restriction enzyme analyses. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(4):942-46.

18. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis – the updated Sydney system. *Am J Surg Pathol*. 1996; 20:1161-81.
19. Kelly SM, Pitcher MC, Farmery SM, Gibson GR. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterol*. 2014; 107(6):1671-74.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001; 25:402-08.
21. Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterol*. 1998; 114:482–92.
22. Sommer F, Faller G, Konturek P, Kirchner T, Hahn EG, Zeus J, et al. Antrum and corpus mucosa-infiltrating CD4+ lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect Immun*. 1998; 66:5543–46.
23. Caruso R, Fina D, Paoluzi OA, Blanco VB, Stolfi C, Rizzo A, Caprioli F, Sarra M, Andrei F, Fantini MC, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. IL-23 mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Eur J Immunol*. 2008; 38:470-78.
24. Lundgren A, Trollmo C, Edebo A, Svennerholm AM, L BS. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ T cells home to and accumulate in the human *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Infect Immun*. 2005; 73:5612-19.
25. D'Élios MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burrioni D, et al. Th1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol*. 1997; 158:962–67.
26. Bhuiyan TR, Islam MMT, Uddin T, Chowdhury MI, Janzon A, Adamsson J, et al. Th1 and Th17 responses to *Helicobacter pylori* in Bangladesh infants, children and adults. *Plos One*. 2014; 9(4)e93943.

27. Melo FF, Rocha AMC, Rocha GA, Pedroso SHSS, Batista SA, Castro LPF, et al. A regulatory instead of na IL-17 T response predominates in *Helicobacter pylori*-associates gastritis in children. *Microbes Infect.* 2012; 14:341-47.
28. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun.* 2003; 71(3):1185-93.
29. Pisset CW, Correia D, Braga TT, Faria GEL, Oliveira RF, Ribeiro BM, et al. Association between the plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10 nitric oxide and specific isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(4):425-30.
30. Crema E, Monteiro IO, Gomes MGZ, Silva AA, Rodrigues Jr V. Evaluation of cytokines (MIG, IFN- γ , TNF- α , IL-4,IL-5 and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagotahy. *Clin Immuol.* 2006; 119:213-18.
31. Ribeiro MR, Crema E, Rodrigues Jr V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum. Immunol.* 2008; 69:484-89.

Table 1 - Characterization of the inflammatory infiltrate in gastric antral mucosa fragments of different groups of monoinfected patients by *H. pylori* (HP+CD-), co-infected (HP+DC+), chagasic *H. pylori*-negative (HP-DC+) and non-infected controls (HP-DC-).

Infiltrate	None	Mild	Moderate	Severe
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Mononuclear cells				
HP+CD-	0 (0.0)	2 (15.4)	11 (84.6)	0 (0.0)
HP+CD+	1 (12.5)	2 (25.0)	4 (50.0)	1 (12.5)
HP-CD+	1 (20.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	(0.0)
HP-CD-	8(80.0)	2 (20.0)	0 (0.0)	(0.0)
Polymorphonuclear cells				
HP+CD-	1 (7.7)	7 (53.8)	4 (30.8)	1 (7.7)
HP+CD+	3 (37.5)	2 (25.0)	2 (25.0)	1 (12.5)
HP-CD+	5 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
HP-CD-	10 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(0.0)

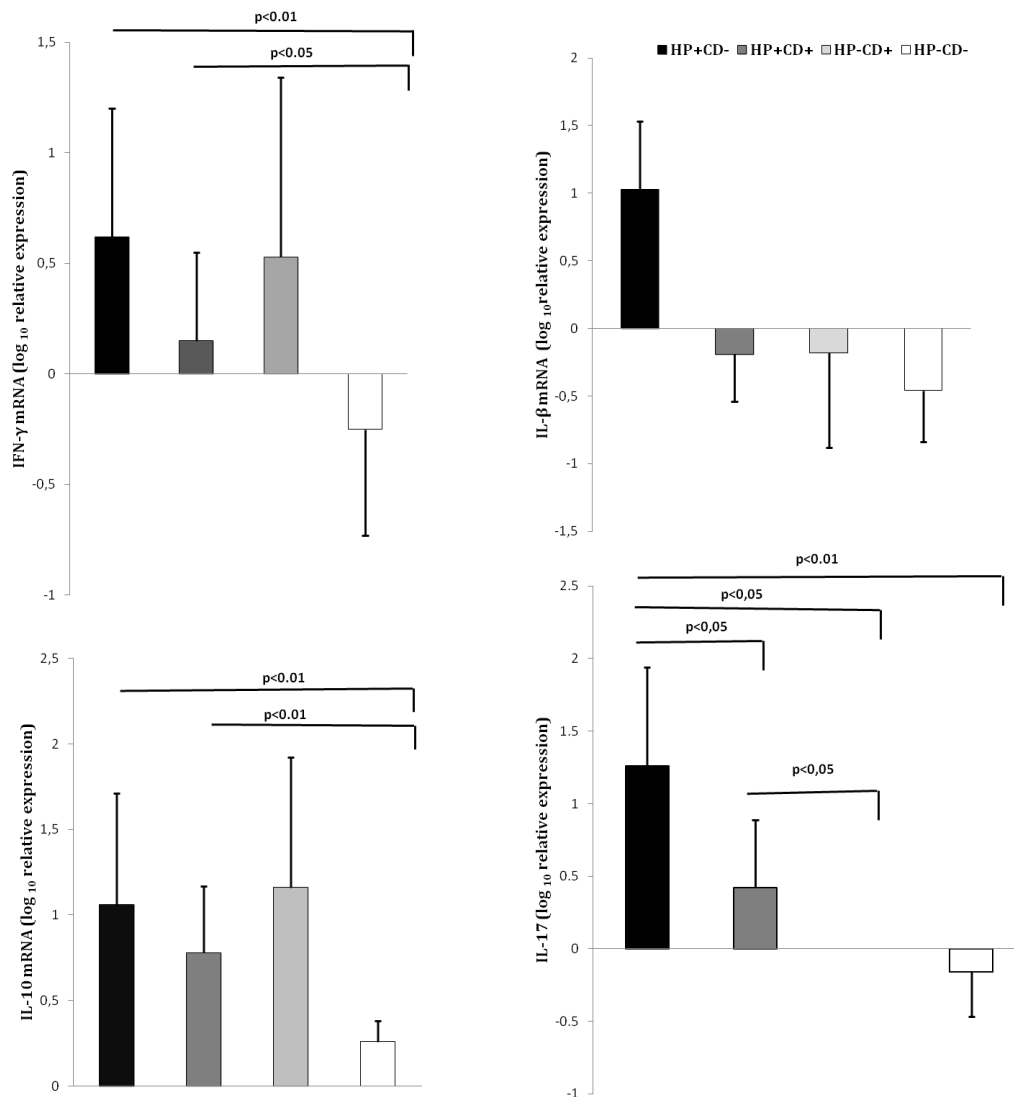


Figure 1. Comparison of cytokine gene expression in gastric antrum region of the fragments in different groups of patients. The results of Real Time PCR were normalized with GAPDH and relative to the calibrator group. The statistical difference between groups were calculated using the Mann-Whitney test. The error bars represent Standard Deviation (SD). Results with $p < 0.05$ were considered significant

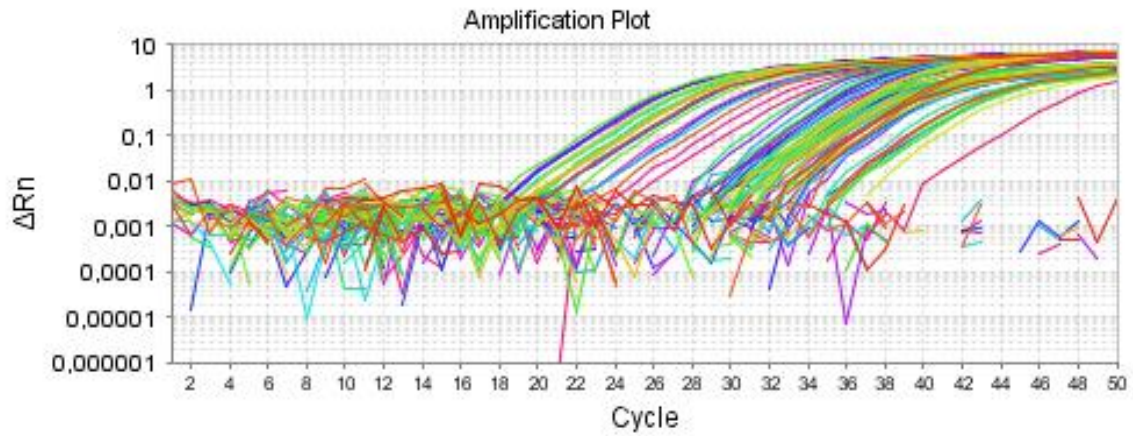
Supplementary data

Figure 1. Real time PCR amplification graph to detect cDNA of IL-1 β cytokine, IFN- γ , IL-10 and IL-17 using the Taqman detection system, 1 μ g of cDNA, 50 reaction cycles.

Elsevier Editorial System(tm) for Microbes
and Infection

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Helicobacter pylori and Trypanosoma cruzi co-infection decrease IL-17 expression in gastric mucosa.

Article Type: Original article

Keywords: Helicobacter pylori; Trypanosoma cruzi; Chagas disease; IL-17; cytokines

Corresponding Author: Prof. Adriana Gonçalves de Oliveira, D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

First Author: Aline L Rodrigues

Order of Authors: Aline L Rodrigues; Fernanda M Fonseca, PhD; Jacqueline B Souza; Renata M Etchebehere, PhD; Iracema S Junqueira; Dulciene M Queiroz, PhD; Adriana Gonçalves de Oliveira, D.

Abstract: We assessed gene expression of cytokines IFN γ , IL-1 β , IL-17 and IL-10, and the level of gastritis activity in antrum fragments of gastric mucosa of patients with digestive form of Chagas disease. Thirty six patients undergoing esophagogastroduodenoscopy were studied. They were divided into monoinfected by H. pylori (n=13), co-infected H. pylori/Trypanosoma cruzi (n=8), chagasic H. pylori-negative (n=5) and non-infected controls (n=10). Histopathological analysis was performed according to the updated Sydney classification. The expression of gene cytokines was determined by Real-Time PCR using the Taqman detection system and the method of relative quantification. PCR was also performed to detect cagA gene in samples of H. pylori-positive patients. The monoinfected H. pylori-positive patients showed a significantly higher expression of IFN- γ , IL-17, and IL-10, even as more severe activity of gastritis than non-infected controls. The co-infected patients had a significant reduction in IL-17 expression and activity of gastritis compared to the H. pylori monoinfected patients. The cytokine of Th1 and Th17 profiles performs a major role in the immune response against to H. pylori and the presence of co-infection by T. cruzi seems to influence Th17 response to H. pylori, as evidenced by decreased expression of IL-17 in patients co-infected.

Suggested Reviewers: Cristina RB Cardoso PhD
Professor, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto,
Department of Clinical Analyzes, Toxicology and Food Sciences, USP
cristina@fcfrp.usp.br

André L Pedrosa PhD
Professor, Universidade Federal do Triângulo Mineiro
pedrosa@icbn.uftm.edu.br

Opposed Reviewers:

PARTICIPAÇÃO DE CO-AUTORES DO ARTIGO

Em atendimento ao regulamento do PPGCF, listamos abaixo a participação de cada co-autor, exceto a mestranda e o orientador.

Jaqueline Batista Sousa: Coleta de dados demográficos e clínicos dos pacientes por meio de entrevista e de análise de prontuários médicos

Fernanda Machado Fonseca: Coleta de dados demográficos e clínicos dos pacientes por meio de entrevista e de análise de prontuários médicos. Realização experimentos de PCR em tempo real.

Renata Margarida Etchebehere: Análise histopatológica de fragmentos do estômago de pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta.

Iracema Saldanha Junqueira: Realização do procedimento de endoscopia digestiva alta de pacientes participantes do estudo para obtenção de fragmentos do estômago.

Dulciene Maria de Magalhães Queiroz: Leitura e interpretação dos resultados de teste respiratório, suporte experimentos de PCR em tempo real e participação da redação do artigo.