

**INFLUÊNCIA DO *Helicobacter pylori* NO
DESENVOLVIMENTO DE ESTRUTURAS LINFOIDES
TERCIÁRIAS E NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

ALEXANDRE SILVA CHAVES

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Oncologia da Fundação Antônio Prudente para a obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Tiago da Silva Medina

São Paulo

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Chaves, Alexandre Silva.

Influência do *Helicobacter pylori* no desenvolvimento de Estruturas Linfoides Terciárias e no prognóstico de pacientes com adenocarcinoma gástrico. / Alexandre Silva Chaves. São Paulo, 2024.

81f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Tiago da Silva Medina.

1. Adenocarcinoma Gástrico, 2. *Helicobacter pylori*, 3. Estruturas Linfoides Terciárias

CDU 616

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Alexandre Silva Chaves

Título: Doutor em Ciências

Aprovado em: 29/10/2024

Banca Examinadora

Orientador: Dr. Tiago da Silva Medina

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da Banca: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camilo

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da Banca: Dra. Jacy Gameiro

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Membro da Banca: Dr. Diego Luís Costa

Instituição: Universidade de São Paulo

Membro da Banca: Dr. Rodrigo Nalio Ramos

Instituição: Universidade de São Paulo

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Programa de Excelência Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob o número 88887.818050/2023-00, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob o número 2018/14034-8.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que participaram desta jornada ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao A.C.Camargo Cancer Center na figura do meu orientador, Dr. Tiago da Silva Medina, pela oportunidade de desenvolver meu conhecimento.

Aos meus pais, por todo amor e apoio durante este processo.

Aos meus colegas e amigos de laboratório por todo auxílio, em especial à Arianne, Gabi Kinker, Glauco, Mariela e Emmanuel.

À minha psicóloga Marianna Silva por me ajudar a lidar com meus momentos não tão luminosos.

RESUMO

Chaves AS. **Influência do *Helicobacter pylori* no desenvolvimento de Estruturas Linfóides Terciárias e no prognóstico de pacientes com Adenocarcinoma Gástrico.** São Paulo; 2024. [Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente]

Introdução: O câncer gástrico é a quinta neoplasia mais comum e a terceira principal causa mundial de mortalidade por câncer e tem no *Helicobacter pylori* (HP) uma de suas principais causas etiológicas. O HP induz um processo infeccioso/inflamatório crônico, resultando em distúrbios gastroduodenais, como gastrite crônica, úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico (GA). Estudos apontam a existência de uma reação semelhante à formação de estruturas linfóides terciárias (TLSs) em indivíduos HP⁺ em comparação com indivíduos HP⁻. TLSs são encontrados em locais de inflamação crônica, como tumores, criando um nicho de apresentação de antígenos e de resposta imune local. A presença de centros germinativos é particularmente um indicador de bom prognóstico. Contudo, não há dados na literatura que relacionam TLSs/folículos linfóides induzidos pelo HP, com o prognóstico do GA. Nosso trabalho visa preencher esta lacuna. **Objetivos:** I) Avaliar a influência do HP na indução de TLSs em estágios pré-neoplásicos, conjuntamente com a avaliação do perfil imunológico de pacientes portadores de gastrite. II) Avaliar o impacto da infecção por *H. pylori* em indivíduos diagnosticados com adenocarcinoma gástrico. **Materiais e métodos:** Amostras de tecido tumoral e tecido peritumoral de pacientes diagnosticados com GA, não metastáticos (n = 17) e submetidos à ressecção cirúrgica *upfront* foram coletadas e processadas para uso em citometria de fluxo multiparamétrica. Para as análises *ex vivo* dos estágios pré-neoplásicos, foram recrutados pacientes diagnosticados com gastrite crônica (CAG, n = 10) e gastrite atrófica (AT, n = 10). Amostras de tecido da região do antro gástrico foram obtidas, processadas e utilizadas para citometria de fluxo multiparamétrica. Coorte retrospectiva (n = 5) de pacientes submetidos à cirurgia curativa entre 2014 e 2020 foi utilizada para quantificação de TLS e para imunohistoquímica (IHC). Análises adicionais foram conduzidas nos seguintes *datasets* públicos: EMTAB-8889 (n = 96) e GSE5081 (n = 32), ambos com dados de *RNA microarrays* de pacientes diagnosticados com diversos tipos de gastrites, *RNA microarray* de pacientes com adenocarcinoma gástrico (ACRG, n = 300, #GSE62254), e bulk *RNAseq* de pacientes

diagnosticados com adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (n = 50, #GSE129219).

Resultados: Indivíduos HP⁺ exibiram elevada expressão relativa de genes de formação de centro germinativo (i.e., BCL6) e de plasmócitos (i.e., MZB1) quando comparados com os HP⁻ na gastrite crônica, havendo sinais intensos de genes de formação de TLSs (CXCL13 e CXCR5), de exaustão celular (HAVCR2, LAG3 e ENTPD1) e de resposta imune inata (TLRs e NLRs) em relação aos indivíduos HP⁻. A análise de enriquecimento também mostrou que nos HP⁺ havia processos ligados à resposta imune humoral e contra bactérias, sugerindo uma eventual montagem de resposta de células B contra o patógeno. Em nossa coorte de pacientes com gastrite, observamos que na região antral dos indivíduos com CAG havia maiores frequências de células T CD4⁺ PD1⁺ e de T CD4⁺ TIGIT⁺ comparados aos com AT. Também foi verificada maior frequência de células CD19⁺ no antro de indivíduos HP⁺ quando comparados com os HP⁻. Além disso, em indivíduos com AG, havia elevadas frequências de células T CD8⁺ CD103⁺PD1⁺ e de T CD8⁺ CD103⁺CD39⁺PD1⁺, além de T CD4⁺ CD39⁺ e de T CD4⁺ CD127^{low} CD25^{hi} em relação ao tecido peritumoral, sugestivo da existência de um processo de exaustão e supressão imunológica nestes indivíduos. Verificamos também que pacientes HP⁺ exibiram maior densidade de TLS na margem invasiva (IM) do que no centro do tumor (CT), particularmente nos do tipo intestinal de Laurén. Análise de IHC mostrou que no paciente HP⁺ havia maior densidade de células expressando marcadores de maturação de centros germinativos (particularmente CD20 e CD23) na IM do que no CT, mesmo em regiões mais afastadas, enquanto o paciente HP⁻ possuía apenas CD20⁺ no CT. Analisando a coorte GSE62254, observamos que a assinatura de TLS encontra-se mais intensa em pacientes do subtipo difuso e no estadiamento III, em relação aos demais subtipos e estadiamentos. A assinatura molecular de TLSs maduros gerada *in-house* estava enriquecida em indivíduos com HP⁺ em relação aos indivíduos HP⁻. Como indicador prognóstico, indivíduos HP⁺ com TLS^{hi} possuíram uma menor sobrevida global se comparados com aqueles HP⁺ com TLS^{low}. Além disso, os indivíduos HP⁺ TLS^{hi} exibiram processos biológicos relacionados à resposta imune mais intensos do que os HP⁻ TLS^{hi}. Por fim, com a coorte GSE129219 (AG difuso de Laurén), verificamos que durante a infecção por HP, há escores de enriquecimento significativos para imunidade humoral - especialmente a antimicrobiana -, para a resposta imune de mucosa e contra bactérias gram-negativas, como o HP. **Conclusões:** Nosso trabalho sugere que a presença de HP é capaz de modular a resposta imunológica em indivíduos infectados, gerando assinaturas TLS-like, e um ambiente imunológico mais intenso. Contudo, mesmo com a presença de TLSs nos indivíduos portadores de AG, a infecção concomitante por HP está associada a um prognóstico desfavorável.

Descritores: Adenocarcinoma Gástrico, *Helicobacter pylori*, Estruturas Linfoides Terciárias

ABSTRACT

Chaves AS. [The Influence of *Helicobacter pylori* on the development of Tertiary Lymphoid Structures and Prognosis of Patients with Gastric Adenocarcinoma]. São Paulo; 2024. [Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente]

Introduction: Gastric cancer is the fifth most diagnosed cancer and the third leading cause of cancer-related deaths worldwide. *Helicobacter pylori* (HP) is considered one of its most common causes. HP can establish a chronic infection/inflammatory process which may result in gastroduodenal disorders, such as chronic gastritis, peptic ulcer, gastric adenocarcinoma (GA) and MALT lymphoma. Studies indicate the existence of a tertiary lymphoid structure (TLS)-like reaction in HP⁺ individuals compared to their negative counterparts. TLSs form in sites of chronic inflammation, such as tumors, creating a local hub of antigen presentation and immune response. The presence of germinal center reaction is an indicator of good prognosis. However, there is no data in the literature linking TLSs/lymphoid follicles induced by HP with the prognosis of GA. Our work aims to fill this gap. **Objectives:** I) To assess the influence of HP on the induction of TLSs in pre-neoplastic stages, together with the immunological profile of patients with gastritis. II) To evaluate the impact of HP infection in individuals diagnosed with GA. **Materials and methods:** Tumoral and peritumoral sample tissues were obtained from non-metastatic GA patients who underwent upfront surgery (n = 17). Samples were then processed for use in multiparametric flow cytometry. For the ex vivo analysis of preneoplastic stages, patients diagnosed with chronic gastritis (CAG, n = 10) and atrophic gastritis (AT, n = 10) were recruited. Tissue samples from the gastric antrum region were obtained and used for multiparametric flow cytometry. For TLS quantification and immunohistochemistry (IHC) assay, a retrospective cohort (n = 54) of patients submitted to curative surgery between 2014 and 2020 was used. Additional analyses were conducted on the following public datasets: E-MTAB-8889 (n = 96) and GSE5081 (n = 32), both with RNAmicroarray data from patients diagnosed with different types of gastritis, RNAmicroarray from patients diagnosed with gastric adenocarcinoma (n = 300, #GSE62254), and bulk RNAseq of patients diagnosed with diffuse type gastric adenocarcinoma (n = 50, #GSE129219). **Results:** HP⁺ individuals diagnosed with CAG exhibited higher relative expression of genes related to germinal formation (i.e., BCL6),

plasma cells (i.e., MZB1), TLS formation genes (CXCL13 and CXCR5), cellular exhaustion (HAVCR2, LAG3 and ENTPD1) and innate immune response (TLRs and NLRs) when compared to HP⁻ individuals. The enrichment analysis also showed that in HP⁺ patients, there were processes linked to the humoral immune response and against bacteria, suggesting an eventual mounting of a B cell response against the pathogen. In our gastritis cohort, we observed higher frequencies of CD4⁺ PD1⁺ T cells and CD4⁺ TIGIT⁺ T cells in the antral region of CAG patients compared with those diagnosed with AT. A higher frequency of CD19⁺ cells was also found in the antrum of HP⁺ individuals in comparison to HP⁻ individuals. Furthermore, in the tumoral tissue of AG patients, higher frequencies of CD8⁺ CD103⁺PD1⁺ T cells and CD8⁺ CD103⁺CD39⁺PD1⁺ T cells, in addition to CD4⁺ CD39⁺ T cells and CD4⁺ CD127^{low} CD25^{hi} T cells were observed, compared with the peritumoral tissue. It indicates the existence of a exhaustion and immune suppression process undergoing in these individuals. We were also able to observe that HP⁺ patients exhibit a greater TLS density in the invasive margin (IM) than in the center of the tumor (CT), particularly in those with Laurén's intestinal type. IHC analysis showed higher densities of cells expressing germinal center maturation markers (CD20 and CD23) in the IM in comparison with CT. The staining could be observed even in farther regions, whereas the HP⁻ only exhibited CD20 staining only in the CT. By analyzing the GSE62254 cohort we observed that the TLS signature displayed a high intensity in patients with Laurén's diffuse type and in stage III, in comparison with the other subtypes and stages. The in-house molecular signature of mature TLS was found to be enriched in HP⁺ individuals, compared with their negative counterparts. As an indicator or prognosis, HP⁺ individuals with TLS^{hi} had a lower overall survival compared to those HP⁺ with TLS^{low} signature. Besides HP⁺ TLS^{hi} patients possessed more intense biological processes related to immune repose than HP-TLS^{hi} patients. Finally, with the GSE129129 cohort (Laurén's diffuse GA), we were able to verify that during HP infection, there were significantly enriched scores for humoral immunity – especially antimicrobial type -, mucosal immunity and against gram-negative bacteria, such as HP. **Conclusions:** Our work suggests that the presence of HP is capable of modulating the immune response in infected individuals, generating a TLS-like signature, together with a more intense immune environment. However, even with the presence of TLSs in individuals with GA, concomitant HP infection is associated with an unfavorable prognosis.

Keywords: Gastric Adenocarcinoma, *Helicobacter pylori*, Tertiary Lymphoid Structures

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cascata de Correia.....	12
Figura 2. Esquema de processamento de amostras ...Erro! Indicador não definido.	
Figura 3. Esquematização da imunohistoquímica.....	22
Figura 4. Procedimento geral das análises in silico	23
Figura 5. <i>Helicobacter pylori</i> e erosão da mucosa relacionam-se com a intensidade da resposta imunológica na gastrite crônica.....	26
Figura 6. <i>Helicobacter pylori</i> está associado à formação de intensa resposta imune durante gastrite crônica.....Erro! Indicador não definido.	
Figura 7. Gastrite crônica está associada à presença de marcadores de exaustão imunológica.....	28
Figura 8. Caracterização de grupos celulares do microambiente gástrico..	32
Figura 9. Influência do <i>H. pylori</i> na formação de estruturas linfoides terciárias associadas à margem invasora no adenocarcinoma gástrico.....	35
Figura 10. <i>H. pylori</i> em combinação com status de TLS é indicativo prognóstico de pacientes com adenocarcinoma gástrico. (A).	38
Figura 11. A infecção por <i>H. pylori</i> promove resposta imune direcionada a patógenos no microambiente tumoral.....	41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Estatísticas descritivas dos pacientes diagnosticados com gastrite crônicas e gastrite atrófica recrutados no A. C. Camargo Cancer CenterAnexo 1
- Tabela 2** Estatísticas descritivas dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico, recrutados no A. C. Camargo Cancer Center e Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São PauloAnexo 2
- Tabela 3** Estatísticas descritivas dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico, constituintes da coorte retrospectiva do A. C. Camargo Cancer CenterAnexo 3

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACRG	Asian Cancer Research Group
AICDA	Activation Induced Cytidine Deaminase
AP-1	Activating Protein-1
APC	Antigen Presenting Cell
BCL	B-Cell Lymphoma
CagA	Cytotoxin-associated Gene A
CCL	CC Chemokine Ligand
CCR	CC Chemokine Receptor
CIN	Chromosomal Instability
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein
CXCL	CXC Chemokine Ligand
CXCR	CXC Chemokine Receptor
DC	Dendritic Cell
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EBV	Epstein-Barr Virus
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
FAS	Fas Cell Surface Death Receptor
GITR	Glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GS	Genomically Stable
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRF	Interferon-Regulatory Factor
KLR	Killer Cell Lectin-Like Receptor
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	Mucosa-associated Lymphoid Tissue
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MSI	Microsatellite Instability
MSS	Microsatellite Stability

MUC	Mucin
MZB	Mantle Zone B Cell
NF-kB	Nuclear Factor-kB
NKG	Natural Killer Group
NLR	NOD-Like Receptor
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PD	Programmed Cell Death
PD-L	Programmed Cell Death Ligand
PRR	Pattern Recognition Receptor
RNA	Ribonucleic Acid
SLO	Secondary Lymphoid Organ
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TFF	Trefoil Factor Family
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper
TIGIT	T Cell Immunoreceptor with Immunoglobulin and ITIM domain
TLR	Toll-Like Receptor
TLS	Tertiary Lymphoid Structure
TNF	Tumor Necrosis Factor Alpha
TOX	Thymocyte Selection-Associated High Mobility Group Box
TP53	Tumor Protein p53
Treg	T regulatory
TRM	T Resident Memory
VacA	Vacuolizing-associated Gene A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	ADENOCARCINOMA GÁSTRICO: EPIDEMIOLOGIA.....	1
1.2	ETIOLOGIA	2
1.3	CLASSIFICAÇÃO	4
1.4	HELICOBACTER PYLORI E A MUCOSA GÁSTRICA	6
1.4.2	Resposta imune contra <i>Helicobacter pylori</i> e formação de MALTS	7
1.4.3	Mecanismos de Escape Imunológico do <i>Helicobacter pylori</i>	9
1.4.4	Os fatores de virulência e o adenocarcinoma gástrico.....	10
1.4.5	A cascata de Correa	11
1.5	ASPECTOS IMUNES DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	12
1.6	COMPARTIMENTALIZAÇÃO IMUNOLÓGICA	14
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	PACIENTES	20
4.1.2	Coorte prospectiva	20
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO TECIDUAL.....	21
4.3	CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA.....	21
4.4	AVALIAÇÃO DO STATUS DE INFECÇÃO POR <i>H. PYLORI</i>.....	22
4.5	IMUNO-HISTOQUÍMICA	22
4.6	ANÁLISE DE BASES DE DADOS PÚBLICAS.....	22
4.6.1	Escores	23
4.6.2	Gene Set Enrichment Analysis e Gene Ontology	23
4.7	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	24
4.8	DIAGRAMA DE SANKEY.....	24
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	24
5	RESULTADOS	25
5.1	HELICOBACTER PYLORI ESTIMULA A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FORMAÇÃO DE FOLÍCULOS LINFÓIDES.....	25
5.2	ASSINATURAS IMUNOLÓGICAS DO <i>H. PYLORI</i>.....	26
5.3	MAIORES FREQUÊNCIAS DE IMMUNE CHECKPOINTS NA GASTRITE CRÔNICA	26
5.4	ANÁLISE DO INFILTRADO IMUNE DE PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	28
5.5	HELICOBACTER PYLORI ESTÁ ASSOCIADO À MAIOR PRESENÇA DE TLS NA MARGEM INVASIVA DO TUMOR	32
5.6	<i>H. PYLORI</i> E STATUS DE TLS NO PROGNÓSTICO DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	35
5.7	PACIENTES INFECTADOS POR <i>H. PYLORI</i> EXIBEM PROCESSOS BIOLÓGICOS LIGADOS À RESPOSTA ANTIMICROBIANA.....	38
6	DISCUSSÃO	42

6.1	ASPECTOS PRÉ-NEOPLÁSICOS	42
6.2	ASPECTOS NEOPLÁSICOS.....	45
7	CONCLUSÕES.....	51
8	REFERÊNCIAS.....	52

ANEXOS

Anexo 1	Tabela 1
Anexo 2	Tabela 2
Anexo 3	Tabela 3
Anexo 4	Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do A. C. Camargo Cancer Center
Anexo 5	Comprovante de submissão de artigo científico

1 INTRODUÇÃO

1.1 ADENOCARCINOMA GÁSTRICO: EPIDEMIOLOGIA

De acordo com a base de dados GLOBOCAN 2020¹, o câncer gástrico foi responsável pelo registro de aproximadamente 1 milhão de novos casos e cerca de 800.000 mortes apenas no ano de 2020, tornando-se a quinta neoplasia mais comumente diagnosticada e a quarta causa mundial de morte relacionada ao câncer, tanto em homens quanto em mulheres, atrás apenas do câncer de pulmão, colorretal e hepático. Apesar dos últimos avanços diagnósticos e terapêuticos, apenas 25-30% dos pacientes com câncer gástrico atingirão sobrevida mediana de 5 anos, com exceção de países como Japão e Coreia do Sul, onde mais de 50% dos indivíduos atingirão essa marca².

Ainda em relação a incidência desta neoplasia, verifica-se que a taxa de incidência padronizada por idade é aproximadamente duas vezes maior nos indivíduos do sexo masculino¹. Esta taxa é, de modo geral, mais elevada na Ásia Oriental, particularmente no Japão e Mongólia, seguidos pelos países da América Latina, Caribe, Leste Europeu e Oceania, ao passo que o norte da Europa, América do Norte, e África possuem as menores taxas³. É interessante notar que cerca de 85% dos casos de câncer gástrico são registrados em países que apresentam índices de desenvolvimento humano elevado ou muito elevado⁴, contudo, apesar dos avanços nas modalidades terapêuticas, e de alguma melhora nos dados de sobrevida e incidência em alguns países, especialmente onde a renda *per capita* é mais elevada⁵, estas taxas são crescentes em indivíduos abaixo dos 50 anos de idade em ambos os cenários de baixo e alto risco⁶.

No caso particular do cenário brasileiro, os dados oficiais estimam que mais de 40 mil novos casos ocorreram entre os anos de 2020 e 2022, com incidências anuais ajustadas de 7,34/100000 para mulheres e 12,81/100000 para homens, taxas essas que variam significativamente conforme a região administrativa e unidade federativa abordada⁷. Embora a tendência global, especialmente nos indivíduos do sexo masculino seja de decréscimo na taxa de mortalidade, no Brasil esta encontra-se em elevação nos últimos 20 anos nas regiões Norte e Nordeste, ao passo que no Sul, Centro-Oeste e Sudestes seus índices diminuem. De acordo com o trabalho publicado por Bray et al. (2012), no qual o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) foi utilizado para avaliar padrões globais de incidência e mortalidade de câncer, observou-se a tendência global na redução de neoplasias associadas a agentes infecciosos, como

câncer cervical e gástrico, nos países de IDHs médios e elevados, demonstrativos de uma transição epidemiológica das neoplasias.

Sendo assim, indicadores relacionados à performance do sistema de saúde, educação e renda, bem como estratégias e programas de prevenção, possuem papéis essenciais na mortalidade relacionada ao câncer⁸. Esse conjunto de ações podem ser derivados para o que se observa na Região Sudeste, onde indicadores socioeconômicos mais elevados e suas consequências, como o melhor acesso ao sistema de saúde e implementação de estratégias de diagnóstico e tratamento precoce do câncer gástrico ocorrem desde o início dos anos 2000⁹.

1.2 ETIOLOGIA

Embora não haja consenso sobre o que leva às diferenças em incidência observadas no câncer gástrico, sabe-se que diversos fatores ambientais ou relacionados ao estilo de vida contribuem, em certa medida, para o desenvolvimento desta neoplasia¹⁰. Sendo assim, é importante esclarecer, que o câncer gástrico também pode ser incluído no grupo de tumores cujas causas relacionam-se a agentes infecciosos, tais como carcinoma hepatocelular (HBV e HCV)¹¹, carcinoma de cérvix, vulva e cavidade oral (HPV)¹², sarcoma de Kaposi (HIV)¹³, câncer colorretal (*Streptococcus bovis*)¹⁴ e linfoma de Burkitt (EBV)¹⁵. De modo geral, tais neoplasias possuem maior prevalência nos países menos desenvolvidos socioeconomicamente¹⁶.

No adenocarcinoma gástrico, dentre os seus principais fatores etiológicos, tem-se a infecção por *Helicobacter pylori*, uma bactéria gram-negativa classificada como carcinógeno do tipo I pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que pode ser encontrada em até em até 90% dos casos em alguns cenários¹⁷. Sua transmissão se dá pelas vias oral-oral ou oro-fecal, e após iniciado o processo de colonização e infecção, o patógeno pode desencadear a formação de úlceras pépticas, câncer gástrico e outras doenças gastrointestinais¹⁸. Devido ao seu modo de transmissão, entende-se que as questões relacionadas ao status socioeconômicos exerçam influência sobre sua prevalência. Embora nos últimos anos, com a melhoria das condições sanitárias e de higiene, bem como o acesso mais amplo a antibioticoterapia a prevalência global da infecção por *H. pylori* tenha diminuído significativamente, ainda são encontradas taxas de até 76% em países em desenvolvimento, contra 58% em países desenvolvidos¹. No Brasil, estima-se que a prevalência do *H. pylori* seja de aproximadamente 60% da população, variando-se conforme o cenário avaliado¹⁹. Embora estudos demonstrem que cerca de 2% a 3% das

pessoas infectadas com *H. pylori* irão desenvolver câncer gástrico²⁰, algumas populações com altos índices de infecção, como na região sul da Ásia, não possuem uma alta incidência de câncer gástrico, o que pode ser devido à prevalência de diferentes genótipos da bactéria em diferentes partes do mundo²¹.

Outro agente infeccioso importante no contexto do adenocarcinoma gástrico, e já mencionado anteriormente, é o vírus EBV, que é responsável por cerca de 10% dos casos de adenocarcinoma gástrico^{21,22}. Este vírus, transmitido primariamente a partir da saliva, infecta as células do epitélio gástrico e linfócitos B, tanto presentes nas tonsilas, quanto no estômago, sendo que sua patogênese é mediada por células infectadas de modo latente, em que proteínas codificadas pelo *EBV*, assim como *RNAs* não codificantes, são expressas²³. Este tipo de câncer gástrico possui características clínicas e patológicas distintas, apresentando consideráveis infiltrados linfoides, além de uma baixa taxa de metástases em linfonodos. Mesmo que diagnosticado em estadiamentos avançados, pacientes *EBV* positivos apresentam um melhor prognóstico e maior sobrevida mediana quando comparados aos *EBV* negativos²⁴.

Além dos fatores etiológicos ligados a patógenos específicos, há outros ligados aos hábitos alimentares e ao estilo de vida e que podem ser responsáveis por até 50% de todos os cânceres gástricos. Dentre esses fatores, podem ser citados o baixo consumo de frutas e vegetais, que paralelamente ao elevado consumo de alimentos processados, com alto teor de sódio, bem como o uso de tabaco e bebidas alcoólicas, contribuem como fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia²⁵. No caso do álcool, seu consumo está relacionado com cânceres relacionados ao trato gastrointestinal, como os de cavidade oral, faringe, laringe, esôfago e fígado. Não obstante, este possui correlação significativa com o risco de desenvolvimento de câncer gástrico, particularmente em países como a China²⁶. Em especial, o consumo de tabaco é um importante fator comportamental associado ao câncer gástrico, com potencial de elevação do risco de desenvolvimento neoplásico em cerca de 50% em homens e 20% em mulheres^{27,28}. Neste aspecto, o tabagismo pode induzir um processo crônico inflamatório no trato gastrointestinal, o que pode alterar a proliferação das células da mucosa e promover a disfunção imunológica, e assim elevar os riscos de infecções bacterianas e virais. Além disso, o tabagismo está associado com o aumento do risco de displasias e metaplasia intestinal, que são lesões precursoras do câncer gástrico²⁸.

1.3 CLASSIFICAÇÃO

Por definição, o câncer gástrico é uma neoplasia que se origina entre as áreas de junção do esôfago e do piloro. Deste modo, pode-se dividir o câncer gástrico em dois subtipos maiores: o subtipo cárdia, que corresponde à porção superior do estômago; e o subtipo não-cárdia, correspondente às demais regiões. Aproximadamente 95% dos tumores que acometem o tecido gástrico possuem origem em células glandulares, sendo denominados adenocarcinomas. Outros tipos como carcinoma adenoescamoso, escamoso e indiferenciados são considerados tumores raros²⁹. Dada à grande complexidade e heterogeneidade fenotípica desta doença, alguns sistemas de classificação foram desenvolvidos.

Inicialmente, buscou-se classificar os adenocarcinomas em conformidade com suas características histopatológicas. Este sistema de classificação é conhecido como Classificação de Laurén.³⁰ Embora tenha sido desenvolvida em 1965, é amplamente utilizada até hoje em laudos anatomopatológicos devido à sua simplicidade e robustez³¹.

De acordo com este sistema classificatório, é possível a identificação de dois grandes subtipos histológicos, sendo estes o subtipo intestinal e o difuso, havendo ainda o subtipo misto, o qual é uma mistura dos dois primeiros. O subtipo intestinal é o mais comum, englobando cerca de 54% dos casos, sendo mais prevalente em indivíduos do sexo masculino³². Possui, como características principais, células malignas coesas e boa diferenciação glandular invasiva. Considera-se que este subtipo é associado à inflamação crônica, como por exemplo, consequência da gastrite atrófica relacionada ao *H. pylori* na região antral³³. O outro subtipo contemplado por este sistema é denominado de subtipo difuso, que corresponde a 32% dos casos, caracterizado por células tumorais de pouca coesão e diferenciação. Afeta tanto homens quanto mulheres em proporções similares, bem como indivíduos mais jovens quando comparado ao subtipo intestinal³². Este subtipo não está ligado a um processo patológico inflamatório, possuindo uma grande relação com a disfunção da adesão celular, incluindo síndromes hereditárias com a mutação germinativa do gene *CDH1*³⁴. Mesmo assim, a infecção por *H. pylori* pode ter um papel complementar associado à carcinogênese deste subtipo³⁵.

Quanto a associação destes subtipos com o prognóstico dos pacientes, este ainda é um tópico controverso. Contudo, há evidências na literatura que apontam para um risco de morte aumentado em cerca de 23% na população global acometida pelo subtipo difuso em relação ao intestinal. Este risco não é relacionado a questões étnicas, de estadiamento ou exposição à quimioterapia³⁶.

Outro sistema também utilizado é a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que se baseia em critérios histo-morfológicos, podendo correlacionar-se com a classificação de Laurén nos seguintes pontos: tumores do subtipo intestinal correspondem aos tubular e papilífero da OMS, enquanto os tumores com células em anel de sinete e outros carcinomas de células pouco coesas enquadram-se dentro dos tumores difusos de Laurén³⁷.

Além das classificações de natureza histológica, outros sistemas foram delineados com base em critérios moleculares. O trabalho realizado pelo *The Cancer Genome Atlas Research Network Group (TCGA)*³⁸ realizou o recrutamento de 295 pacientes originários de diversas partes do mundo e, através da coleta de material tumoral, de tecido saudável e sangue, aplicou uma abordagem multi-ômica integrativa, que gerou quatro grandes grupos com características distintas por meio de métodos de análise não-supervisionada. O primeiro grupo apresentou extensiva hipermetilação de *DNA* nas regiões promotoras, era constituído por tumores com elevada carga viral de *EBV*, sendo denominados *EBV*⁺. O segundo grupo apresentou elevada instabilidade de microssatélites (*MSI*) e elevadas taxas de mutação e hipermetilação, sendo conhecido como grupo *MSI*. O terceiro grupo foi caracterizado pela presença extensiva de aberrações no número de cópias cromossômicas, sendo este o grupo com instabilidade cromossômica (*CIN*). O grupo restante não apresentou tais alterações, sendo chamado de genomicamente estável (*GS*)³⁸.

Em termos de prevalência, os dois primeiros grupos mencionados correspondem a mais de 30% dos casos. A rigor, o grupo *EBV*⁺ é responsável por aproximadamente 10% dos casos, dos quais 81% são encontrados em indivíduos do sexo masculino. Por outro lado, o grupo *MSI* é responsável por cerca de 22% dos casos de adenocarcinoma gástrico. Os tumores classificados como *CIN* respondem por cerca de 50% dos casos, possuindo histologia ligada ao subtipo intestinal de Laurén, sendo encontrados principalmente no antro gástrico. Por fim, o subtipo *GS* está associado ao subtipo difuso de Laurén, localizando-se preferencialmente na junção gastroesofágica e da cárdia. É importante ressaltar que esta classificação não leva em conta o prognóstico dos pacientes, porém pode auxiliar na escolha terapêutica mais adequada para os pacientes³⁹.

Outra classificação molecular que merece menção é aquela proposta pelo *Asian Cancer Research Group (ACRG)*⁴⁰, a qual faz a ligação da classificação molecular do câncer gástrico aos padrões de alteração genômica e aos padrões de recidiva e prognóstico. Esta classificação baseia-se no critério de estratificação combinado com a incorporação de dois mecanismos moleculares chave relacionados à atividade TP53 e à transição epitélio-mesênquima (*EMT*). Deste modo, esse sistema, assim como o do TCGA, estratifica os pacientes com câncer gástrico

em quatro grupos distintos: tumores com instabilidade de microssatélite (MSI), tumores com microssatélites estáveis e transição epitélio-mesênquima (MSS/EMT), e tumores com microssatélites estáveis e TP53 tipo selvagem ou com perda funcional, denominados respectivamente de MSS/TP53⁺ e MSS/TP53⁻.

Em termos de prognóstico ao paciente, esta classificação aponta o subtipo MSI como o mais favorável e com menor frequência de recidivas, sendo a maioria dos casos diagnosticado em estadiamentos precoces. Este correspondente ao subtipo intestinal de Laurén em mais de 60% dos pacientes avaliados. Já o subtipo MSS/EMT é o mais agressivo e acomete indivíduos mais jovens, sendo mais de 80% dos pacientes diagnosticados como subtipo difuso de Laurén em estadiamentos III e IV, o que o torna como o de pior prognóstico. Os subtipos MSS/TP53⁺ e MSS/TP53⁻ apresentam sobrevidas intermediárias, além de que o tipo TP53⁺ apresenta a maioria dos indivíduos infectados por EBV⁴⁰.

1.4 *HELICOBACTER PYLORI* E A MUCOSA GÁSTRICA

1.4.1 Primeiro Contato

A mucosa gástrica é a camada mais interna da parede do estômago, podendo ser dividida em 3 regiões: epitélio, lâmina própria e a camada muscular. O epitélio é responsável pela secreção de substâncias importantes para o processo digestivo, como o ácido clorídrico e a pepsina, e de proteção, como o muco, que impede lesões epiteliais causadas pelo baixo pH em conjunto com a atividade de enzimas proteolíticas, e a colonização por microrganismos potencialmente patogênicos, como o *H. pylori*. Esta camada encontra-se sobre a membrana basal, separando-a da lâmina própria, uma região de suporte, onde encontram-se tecido conjuntivo, nervos, células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e linfáticos. Após a lâmina própria, tem-se a camada muscular, que é um contínuo de células de tecido muscular liso que define o limite entre a mucosa e a submucosa⁴¹.

Devido às condições da região luminal, que tornam o estômago um ambiente particularmente limitante para o crescimento microbiano, o *H. pylori* possui apenas alguns minutos de sobrevivência no lúmen antes de migrar para a superfície epitelial. O processo migratório ocorre com o auxílio da enzima urease, a qual diminui a viscosidade do muco através da produção de íons amônio, conjuntamente ao aparelho de motilidade flagelar, permitindo assim que a bactéria se locomova facilmente no ambiente⁴². Essa locomoção ainda é facilitada pela forma helicoidal da bactéria, que permite uma melhor ação mecânica para penetrar a

mucosa, uma vantagem evolutiva em sua estratégia de colonização⁴³. Ainda assim, o patógeno deve gerenciar a extensão de seu contato com as células epiteliais, evitando sua detecção pelo sistema imunológico, pois embora uma associação mais íntima com o epitélio permita uma maior estabilidade para a realização da colonização, as chances de se iniciar o processo inflamatório são mais altas, causando diminuição da carga bacteriana e potencial dano tecidual ao hospedeiro⁴⁴. A interação entre o patógeno e o epitélio se dá a partir de fatores de adesão codificados pelos genes *BabA*, *SabA*, *OipA* e *Alp-A/B*⁴⁵.

1.4.2 Resposta Imune Contra *Helicobacter Pylori* e Formação De MALTs

Para que ocorra o início da resposta imunológica contra o *H. pylori*, faz-se necessário o reconhecimento de estruturas bacterianas, tais quais lipopolissacarídeos e ácidos nucleicos, pelos receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), como os do tipo Toll (TLR) e NOD (NLR) presentes nas células epiteliais. A ativação destes receptores culmina na síntese e liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-8 TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , através da ativação das vias do NF- κ B, AP-1 e de fatores reguladores de interferon (IRFs), promovendo também o aumento da expressão de moléculas coestimuladoras, de apresentação de antígenos e a migração celular⁴⁶.

Após a fase de primeiro contato hospedeiro-patógeno, ocorre o fluxo de células do sistema imune para a região da lâmina própria, que sob condições fisiológicas não possui um componente celular abundante. Células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e NK estão entre as principais células recrutadas para este sítio anatômico, estabelecendo a partir daí as suas funções imunes^{47,48}. Em especial, o componente fagocítico reconhece o patógeno de modo análogo às células epiteliais, ou seja, com participação ativa dos TLRs e NLRs reconhecendo PAMPs. Os fagócitos são ativados com o reconhecimento de heptose, entregue na célula pelo sistema de secreção tipo 4 (T4SS), o mesmo que é responsável pela secreção da citotoxina associada ao gene A (CagA), um fator de virulência relacionado à modulação do processo inflamatório e promoção da oncogênese⁴⁹. Em macrófagos, por exemplo, a depender da carga bacteriana, a interação pode tornar-se danosa ao hospedeiro, contribuindo para a patologia da gastrite, pois há intensa resposta inflamatória, com mediadores como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8 e iNOS sendo ativamente produzidos por macrófagos do tipo M1, intimamente relacionados com a resposta citotóxica de linfócitos T CD8⁺ e da resposta do perfil Th1⁵⁰, na tentativa de erradicação do patógeno⁵¹. A IL-8, por exemplo, é um potente quimioatrator de neutrófilos, sendo essas células consideradas o componente histopatológico

definitivo da gastrite crônica por *H. pylori*⁵². Com o avançar da infecção e a subsequente necessidade do controle inflamatório, os macrófagos M2, estimulados por elementos presentes no próprio *H. pylori*, levam à diminuição do influxo de Ca^{2+} , inibindo a via MAPK, reduzindo a secreção de fatores inflamatórios e induzindo a produção de moduladores como IL-4 e IL-10⁵³. Deste modo, a indução de um perfil M2 exerce grande papel no controle das reações danosas à mucosa, estando estes, inclusive, relacionados com melhor prognóstico de casos de gastrite atrófica crônica⁵¹.

As DCs da mucosa gástrica exercem papel de mediador da ativação da imunidade adaptativa, realizando a apresentação cruzada de antígenos para a imunidade adaptativa⁵⁴. Contudo, o *H. pylori* pode agir sobre esse tipo celular, reprogramando-o, através do contato direto, por exemplo, para produzir IL-18, que influencia na polarização de células T para células T reguladoras (Tregs), que podem suprimir a ativação imunológica⁵⁵. Outro exemplo resultante do contato da DCs com o *H. pylori* é a exacerbação da resposta inflamatória via secreção de IL-23 pelas DCs, promovendo assim polarização para o perfil Th22, que leva à secreção de CXCL2 pelas células epiteliais, atraindo para o sítio de infecção MDSCs, células supressoras da resposta Th1⁵⁶. Não obstante à influência do *H. pylori*, a interação das DCs com linfócitos presentes em órgãos linfoides secundários, em conjunto com a ação dos mediadores inflamatórios produzidos em resposta ao patógeno, promove a migração e a organização de linfócitos na lâmina própria da mucosa gástrica, o que pode favorecer a formação de folículos linfoides em resposta ao *H. pylori*. Estas estruturas são ricas em células B, funcionando como sítio local de apresentação de antígenos, ativação e maturação dessas células. O eixo principal que governa o processo migratório para a formação destas estruturas é composto basicamente pelo gradiente da citocina CXCL13, produzida por células dendríticas foliculares e células estromais, em conjunto com o seu receptor cognato, CXCR5, presente na superfície das células B⁵⁷. Estes folículos, também denominados de tecido linfoide associado à mucosa (MALT), possuem íntima associação com células dendríticas LAMP⁺ (DC-LAMP⁺), que expressam CD11c e altos níveis de MHC-II, mas poucas moléculas coestimuladoras, como CD8⁺0, CD8⁺3 e CD8⁺6, localizando-se espacialmente nas proximidades de células Tregs FOXP3⁺⁵⁸.

A partir deste momento, pode-se considerar que a imunidade adaptativa contra o *H. pylori* se estabelece, gerando uma combinação de respostas adaptativas humorais e celulares, que a longo prazo mostram-se ineficazes em erradicar a bactéria. A própria formação de anticorpos contra os antígenos do *H. pylori* possui pouco efeito sobre o controle da carga bacteriana, não exercendo atividade sobre a colonização⁵⁹. Em razão desta aparente falta de um papel protetor dos anticorpos contra o *H. pylori*, a imunização de camundongos pode conferir

proteção contra o *H. pylori* mesmo em animais deficientes para a produção de anticorpos⁶⁰. Em relação à atividade celular, modelos murinos demonstram que a bactéria possui capacidade de recrutamento de células Th1, Th17, bem como de Tregs para a mucosa, sendo que estes modelos sugerem que tanto células Th1 como Th17 são importantes para o efeito protetor da imunidade adaptativa contra essa infecção⁶¹.

1.4.3 Mecanismos de Escape Imunológico do *Helicobacter pylori*

Para que o *H. pylori* se estabeleça como patógeno humano, ele deve exercer sua capacidade de evasão imunológica, o que se relaciona intimamente com suas características estruturais, como as exibidas por seus fatores de virulência. Dentre esses fatores, os elementos mais amplamente estudados e diretamente relacionados às patogêneses da úlcera péptica e do adenocarcinoma gástrico são a citotóxica associada ao gene A (CagA) e a toxina vacuolizante (VacA)^{62,63}. A primeira é injetada na célula epitelial pelo sistema de secreção tipo 4 (T4SS) e possui capacidade de regular negativamente a ativação do inflamassoma via NLRP3, um receptor do tipo NLR, através de um processo denominado mitofagia, o que restringe a produção de IL-1 β e IL-18⁶⁴, diminui o recrutamento de células mieloides como macrófagos e neutrófilos para o sítio de infecção⁶⁵, promove perda da proteção homeostática do epitélio, tornando-o suscetível a modificações pré-neoplásicas a longo prazo⁶⁶. Por outro lado, o fator VacA induz a formação de um canal de íons cloreto quando inserido nas membranas celulares do hospedeiro, sendo que sua principal ação no contexto infeccioso é a interferência nas funções normais do canal de cálcio denominado mucolipina1 (TRPML1). Com isso, tem-se a formação de lisossomos e autofagossomos disfuncionais, que passam a servir de nicho protetor para o *H. pylori*, formando um reservatório capaz de restabelecer sua infecção ativa⁶⁷. Em decorrência dessa proteção, há perda da eficiência do processamento antigênico, com a resultante diminuição da apresentação de antígenos bacterianos para as células T, permitindo assim um quadro persistente de infecção⁶².

Além das características acima abordadas, existe um aspecto ligado à coevolução do *H. pylori* e seu hospedeiro que resulta em ligantes menos imunogênicos a serem reconhecidos pelos PRRs, levando a uma consequente subversão imune⁶⁸. Como exemplos clássicos podem ser citadas as modificações químicas no lipídeo A da molécula de LPS do *H. pylori*, como a desfosforilação, que resulta em uma estrutura significativamente menos potente como indutora da resposta do TLR4, quando comparadas as das outras bactérias gram-negativas^{69,70}, e a atenuação evolutiva da resposta à flagelina, componente chave do sistema de motilidade

bacteriana, a qual não é capaz de promover a ativação do TLR5 do mesmo modo que outras bactérias o fazem⁷⁰.

1.4.4 Os fatores de virulência e o adenocarcinoma gástrico

O *H. pylori* possui a capacidade de secretar diversos fatores de virulência que possuem a capacidade de desregular as vias de sinalização intracelulares do hospedeiro, deste modo diminuindo a barreira para a transformação neoplásica. Os maiores fatores patogênicos são o já mencionados VacA e CagA, em conjunto com a ilha patogênica (cagPAI)^{62,63}.

A ilha patogênica cagPAI contém entre 27 e 31 genes, sendo que o altamente imunogênico CagA é o seu gene terminal⁷¹. Acredita-se que as cepas CagA⁺ estão ligadas a um processo inflamatório mais intenso, altos níveis de atrofia e uma maior possibilidade de avançar para o adenocarcinoma⁷². O risco relativo de desenvolvimento de neoplasias associado à infecção por *H. pylori* CagA⁺ é variável, podendo chegar em *odds ratios* tão elevadas quanto 28,4⁷³. Contudo, não é impeditivo que cepas CagA⁻ desenvolvam os mesmos quadros clínicos, o que aponta para a existência de outros fatores bacterianos ou do hospedeiro envolvidos⁷⁴. Em termos de prevalência, as cepas CagA⁺ possuem grande variação, podendo chegar até 100% dos casos em certas regiões da Ásia e menos de 50% nos países ocidentais⁷⁴. Nestes últimos, as cepas CagA⁺ estão associadas a um risco mais elevado de desenvolvimento de úlcera péptica ou adenocarcinoma gástrico em comparação às cepas CagA⁻⁷⁵. Como mecanismo de ação, após sua injeção na célula hospedeira pelo sistema de secreção tipo 4 (T4SS), codificado pela ilha patogênica cagPAI, o fator de virulência sofre fosforilação e passa a influenciar diversas vias de transdução de sinal ligadas à proliferação celular, como RAS/MAPK/ERK, e à inflamação, como a via do NF-κB⁷⁶.

Expresso por mais da metade das cepas de *H. pylori*, o fator de virulência VacA possui, como mencionado anteriormente, a capacidade de formar canais de íon cloreto ao se ligar na superfície do epitélio hospedeiro, podendo levar à liberação do citocromo C das mitocôndrias, acarretando apoptose, além de poder promover respostas pró-inflamatórias⁶⁷. É sugerido que a severidade clínica do VacA esteja ligada à sua estrutura, onde é sugerido que algumas alterações na região sinalizadora ou intermediária desta molécula estejam associadas a um risco elevado de desenvolvimento de úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico, como observado na África, América Latina e Oriente Médio⁷⁷.

Uma questão que ainda necessita de esclarecimentos na literatura é sobre a questão prognóstica do *H. pylori* sobre o adenocarcinoma gástrico, pois ainda não há consenso sobre o

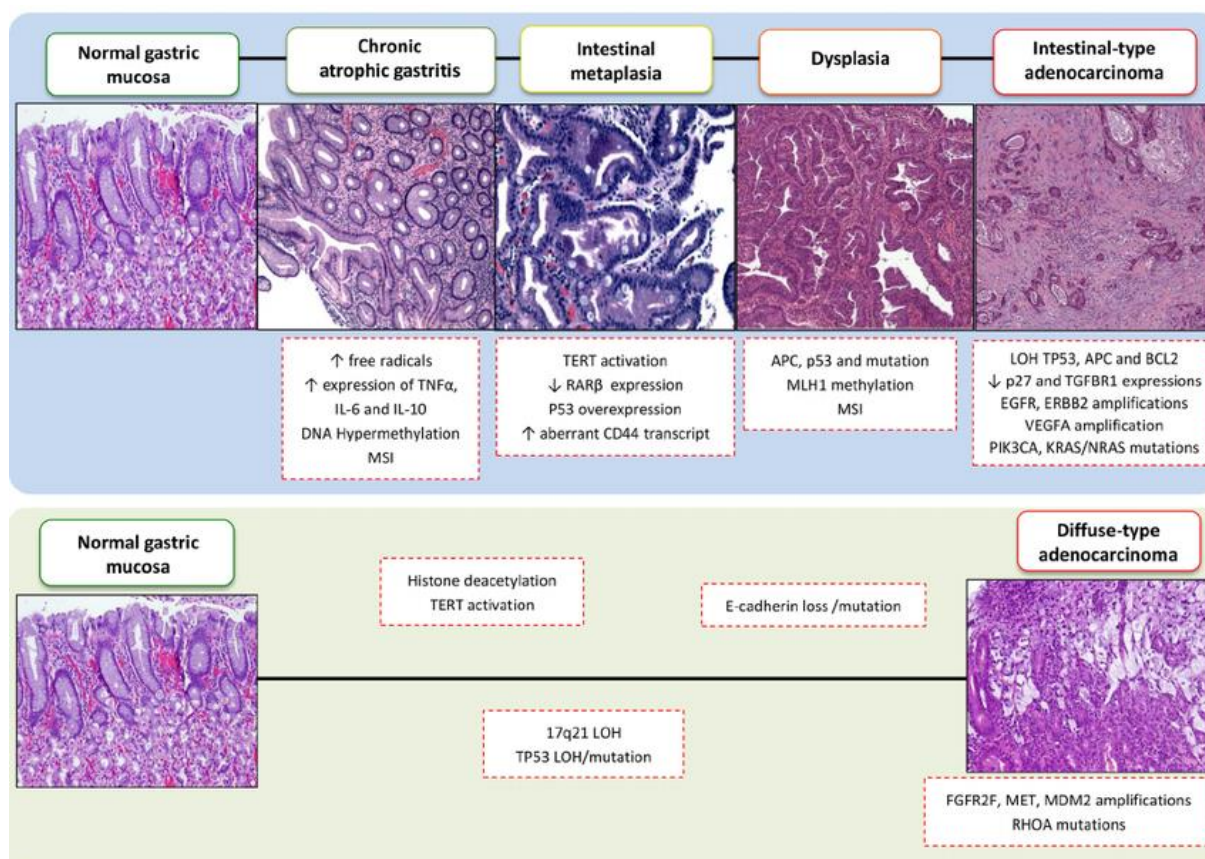
quão influente é a presença do patógeno em relação à sobrevida dos pacientes, havendo resultados díspares dependendo do contexto avaliado⁷⁸⁻⁸⁰, incluindo o imunoterápico^{81,82}.

1.4.5 A cascata de Correa

Como definido pela classificação de Laurén³⁰, os adenocarcinomas gástricos são divididos em duas categorias denominadas intestinal e difuso. Os tumores classificados como intestinais emergem a partir de um cenário de inflamação crônica, que é descrito pela cascata de Correa³³, enquanto os classificados como subtipo difuso não possuem esse processo necessariamente envolvido em sua gênese, exibindo perda de coesão celular e da diferenciação das células produtoras de muco³⁰.

De modo bem simples, a cascata de Correa³³ propõe que o câncer gástrico do tipo intestinal é o resultado de modificações progressivas na mucosa gástrica, iniciando-se com a mucosa gástrica normal e continuando na seguinte ordem: gastrite não atrófica (gastrite ativa crônica), gastrite com atrofia multifocal, metaplasia intestinal do tipo completo, metaplasia intestinal do tipo incompleto, displasia de baixo grau, displasia de alto grau e adenocarcinoma invasor. Dos estágios acima listados, dois em particular merecem menção, sendo eles a gastrite atrófica e a metaplasia intestinal. A gastrite atrófica é o primeiro ponto da fase pré-neoplásica, onde há a perda do epitélio glandular normal, decorrente do processo inflamatório prolongado, podendo ocorrer a fibrose da lâmina própria. Além desse estágio, a metaplasia intestinal é outro processo lesivo de grande importância, pois o epitélio atrofiado é substituído por células do fenótipo intestinal, ocorrendo até o aparecimento de células de Paneth. A chegada nesta condição, especialmente na chamada metaplasia incompleta, a qual alguns autores consideram como um tipo de displasia de baixo grau⁸³, indica um risco elevado no desenvolvimento de câncer⁸⁴.

Embora a cascata de Correa seja a descrição de um evento contínuo, a evolução da gastrite atrófica até os estágios de metaplasia e neoplasia pode levar mais de uma década⁸⁵, e a reversibilidade do quadro atrófico e metaplásico da erradicação do *H. pylori*⁸⁶ é matéria de discussão. Mesmo não havendo consenso sobre essa possibilidade, melhoras nos quadros clínico-patológicos são observados com a antibioticoterapia⁸⁶.



Fonte: Riquelme *et al.* (2012)

Figura 1. Cascata de Correa

1.5 ASPECTOS IMUNES DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

O microambiente tumoral é o componente principal nos contextos de progressão tumoral, invasão, metástases, evasão imunológica e resistência à terapia. O estômago possui como característica um ambiente extremamente ácido e um componente endócrino próprio, o que faz do microambiente gástrico e do adenocarcinoma gástrico singulares.

Em termos populacionais, o microambiente do adenocarcinoma gástrico possui em maior prevalência, dentre as células imunes infiltrantes, as células T CD8⁺, seguidas por macrófagos teciduais (CD68) e células T CD4⁺, representando aproximadamente 15%, 13% e 11% de todas as células. Como descrito pela classificação do TCGA³⁸, o subtipo tumoral EBV⁺ exibe características que o torna imunologicamente mais quente do que os demais, possuindo um infiltrado particularmente elevado de células T CD8⁺, T CD4⁺ e macrófagos. Em contrapartida, o subtipo difuso de Laurén, considerado genomicamente estável³⁸, exibe um infiltrado de leucócitos mais discreto. Por terem um componente de células T CD8⁺ mais elevado, os tumores gástricos relacionados ao EBV exibem uma melhor sobrevida global, em

relação aos outros subtipos^{87,88}. Contudo, cabe salientar que células T CD8⁺ totais não são indicadores de prognóstico consistentes⁸⁹. Mais especificamente, a infiltração por células T CD8⁺ CXCR5⁺ intratumorais está relacionada com melhora na sobrevida global em pacientes com adenocarcinoma gástrico, sendo que aqueles com TNM II e III são os de maior probabilidade de se beneficiar de terapias adjuvantes. Além disso, a expressão de CXCR5 por tais células sugere a participação de estruturas linfoides terciárias no controle do tumor, uma vez que este é um receptor chave na formação e organização de tais estruturas^{90,91}.

Como estamos tratando do microambiente tumoral, um sítio de intensa atividade inflamatória, com prolongada exposição a antígenos tumorais e a sinais de ativação celular, existe alta probabilidade das células efectoras, como as T CD8⁺ citotóxicas, tornarem-se exaustas. Este evento acarreta a perda de sua função efectora, caracterizada por pouca ou nenhuma produção de mediadores como IL-2, TNF- α e IFN- γ . A exaustão de linfócitos T causa também comprometimento epigenético, perda da capacidade proliferativa, acúmulo de receptores inibitórios (ou *immune checkpoints*), como PD1, TIGIT, TIM3 e LAG3, e aumento de moléculas apoptóticas⁹².

Nos últimos anos, diversos receptores inibitórios, bem como seus ligantes, foram identificados e podem ser expressos em células imunes ou tumorais de pacientes com adenocarcinoma gástrico^{93,94}, e estes têm sido alvo de grande interesse clínico⁹⁵. O exemplo mais bem descrito na literatura é a molécula de PD-L1, que fisiologicamente é expressa na periferia por células apresentadoras de antígenos, dentre outras, servindo como ligante da molécula de PD1, expressa na superfície de células T, evitando que haja exacerbação da resposta imune e consequentemente danos teciduais⁹⁶. Um dos principais indutores desta molécula é o IFN- γ , produzido durante a resposta inflamatória. E num ambiente altamente inflamado, como o tumoral, as células neoplásicas passam a expressar o seu ligante, de modo a escapar da imunidade adaptativa⁹⁷. Menção também merece ser dada ao TIGIT, que exerce seus efeitos inibitórios em células da imunidade inata e adaptativa através da ligação com os seus receptores CD155 e CD112. Esta inibição é um evento competitivo, no qual o TIGIT, possuidor de maior afinidade pelo CD155, compete com os receptores de ativação CD226 e CD96. A expressão de CD155 é encontrada principalmente na superfície de células dendríticas, linfócitos T, linfócitos B e macrófagos^{98,99}. Além desses exemplos, há a regulação positiva de outros *immune checkpoints*, como CTLA-4, TIM-3 e VISTA, no microambiente tumoral do adenocarcinoma gástrico^{94,100,101}.

Contudo, não é puramente a ação entre as moléculas de *immune checkpoints* e seus ligantes que promovem a incapacidade de ação das células imunes no microambiente tumoral.

O microambiente tumoral é de grande restrição metabólica, havendo privação de glicose e aumento de hipóxia, que diminuem significativamente a resposta antitumoral, em especial das células T CD8⁺^{102,103}. Células imunes exaustas exibem respiração mitocondrial suprimida, e atividade glicolítica, em um processo de baixo fitness metabólico, que reforça o estado exausto das células. Por exemplo, células terminalmente exaustas, como as T CD8⁺ TCF-1⁻TIM3⁺, falham em responder à terapia com bloqueadores de *immune checkpoints*, sendo necessárias outras estratégias para revigorá-las, como o uso de IL10-Fc¹⁰⁴.

1.6 COMPARTIMENTALIZAÇÃO IMUNOLÓGICA

Um dos aspectos mais importantes da resposta imunológica direcionada tanto contra patógenos, quanto tumores, está ligado a um sistema imune organizado e compartimentalizado, onde as células imunes encontram-se agrupadas, de modo a interagir e compartilhar informações antigênicas umas com as outras. Órgãos Linfoides Secundários (SLOs), MALTs gástricos e Estruturas Linfoides Terciárias (TLSs) são exemplos de compartimentalização com ação bem definida. Muito embora sejam estruturas com funções semelhantes, sua gênese ocorre de modo distinto.

O desenvolvimento dos SLOs se dá em áreas pré-definidas durante o processo de embriogênese, possuindo áreas bem específicas e estruturadas para o desenvolvimento da resposta imunológica. Por outro lado, os TLSs, embora compartilhem algumas semelhanças com os SLOs em alguns processos dentro de sua formação, não estão ligados a um programa genético prévio, mas sim a processos inflamatórios crônicos, tais quais os encontrados em doenças autoimunes e no próprio tumor. Os TLSs se desenvolvem em um processo de neogênese linfática, que estabelece um nicho para a apresentação de antígenos e desenvolvimento da resposta imunológica local¹⁰⁵. Em contrapartida, os MALTs¹⁰⁶ se formam em resposta a agentes infecciosos na mucosa gástrica, particularmente o *H. pylori*. Estas estruturas, quando se formam, exibem folículos linfoides e intensa reação de células B⁵⁷, podendo dar origem a um processo maligno denominado linfoma de MALT⁹. Em termos de composição, os TLSs são comparáveis aos SLOs, com zonas de células B e T bem definidas, contendo regiões onde vênulas do endotélio alto (HEVs) facilitam a entrada de células imunes circulantes. Embora os principais componentes celulares dos TLSs sejam linfócitos e células dendríticas, a organização adequada deste ambiente é sustentada por uma rede de células

estromais não hematopoiéticas. Populações de células endoteliais linfáticas e sanguíneas, bem como imunofibroblastos, estão no centro dessa estrutura¹⁰⁷.

Diversas evidências indicam que os TLSs desempenham papéis centrais no controle da progressão tumoral¹⁰⁸, e mesmo com a heterogeneidade dos métodos utilizados para quantificar essas estruturas, os estudos realizados são consistentes em afirmar que altas densidades de TLSs intratumorais e peritumorais estão associadas à sobrevida global e livre de doença prolongadas em diversos tipos de tumor, incluindo câncer gástrico, sarcoma¹⁰⁹, melanoma¹¹⁰, câncer de pulmão^{111,112}, mama^{113,114}, colorretal^{115,116} e câncer de pâncreas^{117,118}. Especificamente no contexto do câncer gástrico, pode-se citar dois trabalhos clássicos que relacionam TLSs e sobrevida neste contexto. O primeiro, em uma coorte de 914 pacientes¹¹⁹, observou que quanto a maior densidade dos TLSs nas lâminas dos pacientes, melhor era o prognóstico em termos de sobrevida global, especialmente nos estadiamentos TNM II e II. Outro estudo¹²⁰, baseado em imuno-histoquímica, em uma coorte de 82 pacientes, observou que a maior abundância de células T Tbet⁺ e células B foliculares estava associada a maior sobrevida livre de progressão. O principal fator ligado a um bom prognóstico em pacientes com câncer gástrico são as células B, que auxiliam no desenvolvimento da imunidade antitumoral dentro da organização espacial do TLS.

Assim, pode-se afirmar que as células B constituem o ponto central de todo este processo, pois os linfócitos B ativados, residentes nos TLSs, atuam modulando o fenótipo das células T presentes no microambiente tumoral através de sua capacidade de apresentar antígenos tumorais. Diversos estudos demonstram que os linfócitos B infiltrantes no tumor, com fenótipo ativado/memória, expressam marcadores de apresentação de antígenos, como MHC I e II, e moléculas coestimuladoras, tais quais CD4⁺0, CD8⁺0 e CD8⁺6^{121–124}. Embora as células dendríticas sejam as principais células apresentadoras de antígenos envolvidas na ativação inicial de células T nos linfonodos, as células B podem, através de seus mecanismos de apresentação de antígenos, contribuir para a expansão adicional de células T CD4⁺ presentes no tumor^{123,124}.

Isto pode ser observado em um estudo com pacientes diagnosticados com câncer de pulmão de células não pequenas¹²⁵, cuja densidade elevada de células B presentes nos TLSs foi associada à elevação na clonalidade do repertório de receptores de células T CD4⁺⁺ e CD8⁺⁺ no tecido tumoral e nos linfonodos drenantes, respectivamente. Essa influência também foi observada em um cenário análogo¹²⁶, no qual foi verificado que TLSs com alta densidade de células B resultaram em menores níveis de expressão de *immune checkpoints* por células T

CD4⁺, bem como baixas porcentagens de células Tregs, indicando uma resposta mais efetiva contra o tumor.

Devido à capacidade de apresentação cruzada, as células B também interagem com os linfócitos T CD8⁺, um aspecto já bem estabelecido na literatura¹²⁷⁻¹²⁹. Por exemplo, no câncer de ovário de alto grau¹²¹, foi observado que células B que entraram em contato com antígenos, além de exibirem um perfil fenotípico atípico de memória, sendo CD20⁺CD27⁻, encontravam-se colocalizadas com as células T CD8⁺ ativadas, possuindo marcadores relacionados à apresentação de antígenos. Outro aspecto importante a ser levado em consideração é o estado funcional das células B infiltrantes tumorais e como ele se enquadra dentro da estrutura organizacional dos TLS. Em um estudo em câncer de pâncreas¹³⁰, foi demonstrado que os TLSs se desenvolvem em estruturas maduras contendo células T CD4⁺ e CD8⁺ CXCL13⁺, que agem como organizadoras do tecido linfoide. Nesses tecidos, as células B passam por processo de proliferação, hipermutação somática e mudança de classe de imunoglobulinas, dentro de centros germinativos. Da mesma forma, no câncer de ovário, a abundância de células B CD20⁺ foi associada apenas a um melhor prognóstico na presença de CXCL13, um marcador de TLS. Os pacientes com o fenótipo CD20^{hi}CXCL13^{hi} tiveram sobrevida global e sobrevida livre de progressão significativamente mais longas do que os com o perfil CD20^{lo} ou CXCL13^{lo}¹³¹. Os fenótipos regulatórios podem surgir quando as células B estão desorganizadas por todo o estroma e têm interação substancial com células malignas¹³², como sugerido pela baixa atividade de células T em TLSs imaturos¹¹⁰. É, portanto, crucial considerar a distribuição espacial das células B para entender adequadamente seu papel no controle da progressão tumoral.

Vale notar que os tumores ricos em TLS são tipicamente mais infiltrados por células T CD8⁺, que podem expressar *immune checkpoints* após a exposição persistente ao antígeno ou a sinais inflamatórios. Em TLSs maduros de pacientes com sarcoma, o contato íntimo entre as células B e T foi suficiente para induzir alta expressão de PD-1 nas células T¹⁰⁹. Da mesma forma, os níveis de expressão dos receptores inibitórios TIGIT e CTLA-4 foram elevados em amostras de câncer de pulmão de células não pequenas TLS^{hi} em comparação com as TLS^{lo}¹³³. Assim, os TLSs podem representar um rico local de expressão de *immune checkpoints* clinicamente relevantes.

2 JUSTIFICATIVA

Como bem definido pela literatura, a principal função das estruturas linfoides terciárias presentes nos tumores é a formação de um sítio local de apresentação de antígenos, permitindo que a resposta imune antitumoral seja amplificada, resultando assim em prognósticos mais favoráveis aos pacientes. Contudo, deve-se atentar que essas estruturas não são homogêneas, apresentando variações conforme o tipo tumoral, e mesmo entre pacientes. Fatores como localização em relação ao tumor, densidade, composição celular e estágios de maturação podem exibir correlação positiva ou negativa com o prognóstico dos pacientes.

Estudos demonstram que prognósticos opostos e diferentes correlações clínico-patológicas estão associadas com a presença de TLSs em áreas distintas, o que é sugestivo de diferenças qualitativas na composição do microambiente tumoral. Pacientes nos quais elevadas densidades de TLSs intratumorais, e poucos peritumorais, exibem uma resposta imune antitumoral mais intensa e bom prognóstico, enquanto o evento oposto é indicativo de comprometimento imunológico, ou mesmo imunossupressão, conjuntamente com prognósticos desfavoráveis. Com o advento e amplo uso da imunoterapia, onde novos marcadores são utilizados para estratificação dos indivíduos que melhor se beneficiariam desta modalidade terapêutica, existem evidências de que as maiores densidades destas estruturas no compartimento tumoral estão ligadas à uma melhor sobrevida dos pacientes em diversos tipos de cânceres. Neste aspecto, a presença específica de maiores infiltrados de células B demonstraram-se preditores das respostas para terapias anti-PD1, e anti-CTLA4 em tumores como câncer gástrico, melanoma e sarcoma.

Porém um aspecto que carece de maiores esclarecimentos e está diretamente relacionado à carcinogênese gástrica, diz respeito à influência do *Helicobacter pylori* sobre o microambiente imunológico do estômago. Enquanto seu papel como carcinógeno já é bem estabelecido na literatura, não existe consenso relativo ao prognóstico dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico infectados pela bactéria, especialmente aqueles entre os estadiamentos TNM I a III. Entretanto, sabe-se que dentre os indivíduos com câncer gástrico elegíveis para a imunoterapia, os que são portadores de *H. pylori* demonstram performances clínicas significativamente empobrecidas, exibindo menores sobrevidas globais e livres de progressão. Porém, os trabalhos que tratam sobre o tema não exploram os mecanismos subjacentes à esta resposta, abordando apenas o critério clínico. Outro ponto

relevante, já bem descrito na literatura é a capacidade do *H. pylori* em induzir a formação de agregados e folículos linfoides durante o processo infeccioso, conhecidos como MALTs. Essas estruturas são estruturalmente análogas aos TLSs presentes tumores, sendo também, sítios otimizados de apresentação antigênica, no caso para antígenos pertencentes ao patógeno.

Contudo a literatura não apresenta dados que relacionem a formação de uma resposta imune anti-*H.pylori*, onde a formação de MALTs é característica, pode exercer influência na formação de estruturas linfoides terciárias em pacientes com adenocarcinoma gástrico, nem como essa resposta antimicrobiana pré-existente ao estabelecimento do tumor pode se relacionar ao prognóstico destes mesmos pacientes. Sendo assim, o presente trabalho visa o preenchimento destas lacunas literárias.

3 OBJETIVOS

Objetivo 1. Avaliar a influência do *H. pylori* na indução de TLSs em estágios pré-neoplásicos, conjuntamente com a avaliação do perfil imunológico de pacientes portadores de gastrite; e

Objetivo 2. Avaliar o impacto da infecção por *H. pylori* na formação de TLSs em indivíduos diagnosticados com adenocarcinoma gástrico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

4.1.2 Coorte prospectiva

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa A. C. Camargo (Protocolo 2847/20) e todos os pacientes envolvidos assinaram um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). Os indivíduos recrutados são de ambos os sexos, maiores de 18 anos, sem metástases distantes, sem tratamento com quimio ou imunoterápico prévio, e sem comorbidades. Um total de 17 pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico foi recrutado no A. C. Camargo Cancer Center (ACCCC) e no Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (HCSCMSP) nos anos de 2020 e 2023. Destes pacientes, foram obtidas amostras de sangue periférico e de tecido tumoral e peritumoral (5 cm distante do centro do tumor), coletados sob a supervisão de um patologista qualificado.

Neste estudo, também foram recrutados 20 pacientes não-tumorais, diagnosticados com gastrite crônica ou atrófica, oriundos do Departamento de Endoscopia Digestiva do A.C.Camargo Cancer Center entre os anos de 2021 e 2022. Destes indivíduos, já normalmente submetidos ao procedimento endoscópico de rotina, foram coletadas amostras de sangue periférico e tecido da região antral.

4.1.3 Coorte retrospectiva do A.C.Camargo Cancer Center

Foram selecionados, a partir dos registros institucionais do A. C. Camargo Cancer Center, 5 pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico, submetidos a ressecção cirúrgica, entre os anos de 2014 e 2020, na instituição. Para que fossem considerados elegíveis, os pacientes deveriam ter ao menos 18 anos de idade, confirmação histológica de adenocarcinoma gástrico entre os estadiamentos I e III, e não terem sido submetidos à terapia neoadjuvante. Esta coorte foi utilizada para a quantificação de TLSs na região do centro do tumor e margem invasiva (distante até 1mm da borda tumoral) por um patologista qualificado. Dois pacientes representativos foram selecionados para marcação de imuno-histoquímica. Os dados de acompanhamento clínico foram utilizados para a elaboração da curva de sobrevida dos pacientes, tendo como base a data da ressecção cirúrgica até o último dia de *follow-up* registrado, quando do último acesso ao sistema, no dia 01/07/2024.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO TECIDUAL

Para a obtenção da suspensão celular, os tecidos foram fragmentados e incubados a 37°C por 40 minutos, em uma solução de digestão contendo 1mg/mL das collagenases I e IV e meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (HI FBS Gibco), conforme descrito na literatura¹³⁴. Após lavagem com PBS1x, a suspensão obtida foi filtrada utilizando-se um *cell strainer* de 70 µm. Do material processado, 10% da amostra foi utilizada para citometria de fluxo multiparamétrica, sendo o material restante mantido em solução de criopreservação (10% DMSO, 90% soro fetal bovino) e congelado a -80°C.

O sangue coletado foi diluído em PBS 1x (1:1), aplicado em um tubo falcon contendo Ficoll Paque Plus (GE Healthcare) e centrifugado a 400g por 40 minutos à 20°C. Posteriormente o anel de PBMC formado foi coletado, e lavado com PBS 1x a 400g por 10 minutos. Da suspensão celular obtida, aproximadamente 10% foram utilizados para as padronizações da citometria de fluxo multiparamétrica, e o material restante, mantido em solução de criopreservação (10% DMSO, 90% soro fetal bovino) sendo congelado a -80°C.

4.3 CITOMETRIA DE FLUXO MULTIPARAMÉTRICA

As suspensões celulares foram filtradas através de *cell strainer* de 70 µm, lavadas com PBS1x e marcadas com *Fixable Viability Stain* 575V (BD Horizon) ou com *Fixable Viability Stain* 510V (BD Horizon), por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem, foram incubadas com *Fc block* (BD Biosciences) por 15 minutos à temperatura ambiente e marcadas com painéis de anticorpos de superfície por 30 minutos a 4°C. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas e fixadas em PBS 2% PFA.

O seguinte painel de anticorpos foi utilizado para a análise dos marcadores de superfície dos pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico: PerCP-Cy5.5 anti-CD45 (BD Pharmingen), APC anti-CD3 (BD Pharmingen), PE anti-CD4⁺ (BD Pharmingen), BUV496 anti-CD8⁺ (BD Horizon), BV421 anti-CD56 (BD Horizon), BV605 anti-CD279 (BD Horizon), BV711 anti-CD39 (BD Horizon), FITC anti-CD103 (BD Pharmingen), APC-H7 anti-CD19 (BD Pharmingen), PE/Dazzle 594 anti-TIGIT (BioLegend), BV786 anti-CD127 (BD Horizon), BUV563 anti-CD25 (BD Horizon) e FVS510V (BD Horizon).

Para os tecidos não-tumorais, foram utilizados os marcadores a seguir: APC-H7 anti-CD45 (BD Pharmingen), PerCP-Cy5.5 anti-CD3 (BD Pharmingen), BV605 anti-CD4⁺ (BD

Horizon), BV650 anti-CD8⁺ (BD Horizon), APC anti-CD56 (BD Pharmingen), BV421 anti-CD279 (BD Horizon), PE anti-CD19 (BD Horizon), PE anti-TIGIT (R&D Systems), FVS757v (BD Horizon).

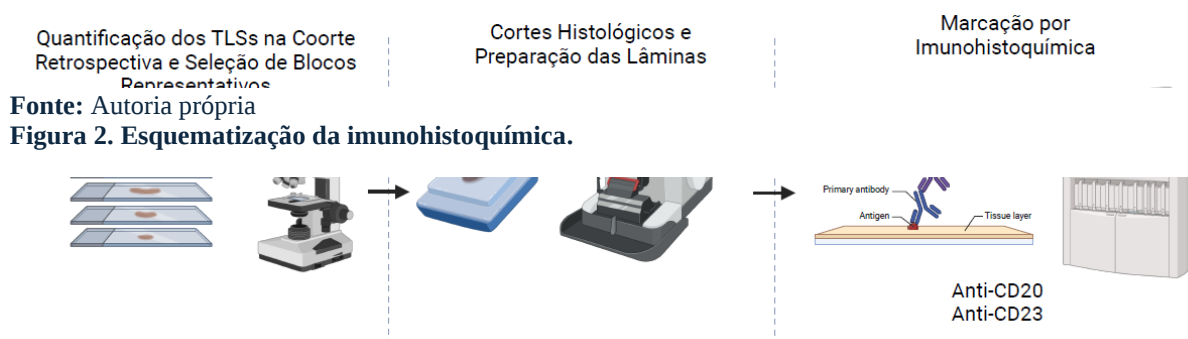
A aquisição das amostras foi realizada pela plataforma FACSsymphonyA5, e os dados gerados, analisados no software FlowJo v10.8 (BS Biosciences).

4.4 AVALIAÇÃO DO STATUS DE INFECÇÃO POR *H. PYLORI*

Foram considerados positivos para a infecção por *H. pylori* os pacientes que atendessem os seguintes critérios: confirmação na avaliação histológica pela coloração de Giemsa ou pelo teste rápido de urease positivo, conforme explicitado no laudo anatomopatológico (ACCCC e HCSCMSP) ou do departamento de Endoscopia Digestiva (ACCCC).

4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

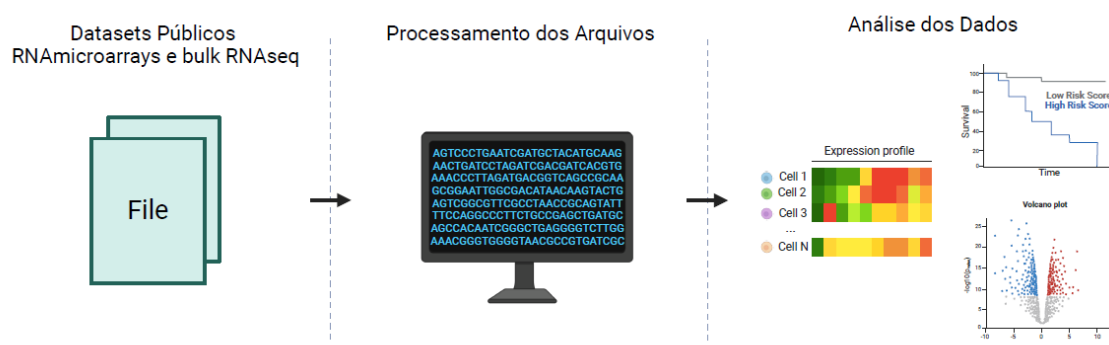
Para estas marcações, utilizamos 03 cortes sequenciais de 7-8 micrômetros do bloco de parafina de cada paciente. Após a fixação dos tecidos em lâmina histológica, as secções foram marcadas com anti-CD20 [L26] (Ventana) e anti-CD23[SP23] (DAKO), utilizando o sistema Ventana BenchMark XT System. Tonsilas humanas foram usadas como controles positivos das marcações. As secções foram montadas no meio Entellan (Merck) e digitalizadas utilizando-se o software Aperio Digital Pathology Scanner em resolução de 40x. A análise dos scans foi realizada com o auxílio do software Aperio ImageScope (v12.4.3).



4.6 ANÁLISE DE BASES DE DADOS PÚBLICAS

Para a investigação da influência do *H. pylori* sobre o perfil imunológico e a formação

de TLSs no contexto pré-neoplásico, foram utilizados dois grupos de dados de *RNAmicroarray*: GSE5081 (pacientes diagnosticados com gastrite crônica) e E-MTAB-8889 (pacientes em diferentes estágios de gastrite). A avaliação do contexto tumoral foi realizada valendo-se também de dois conjuntos de dados, sendo eles: GSE62254 (*RNAmicroarray*, coorte ACRG) e GSE129219 (*bulk RNAseq*, apenas pacientes com adenocarcinoma difuso de Laurén). Para a construção do perfil imune, os dados foram deconvolucionados com o uso do algoritmo MCPCounter¹³⁵.



Fonte: Auroria própria

Figura 3: Procedimento geral das análises in silico.

4.6.1 Escores

Durante as análises *in silico*, foram utilizados dois escores diferentes, porém convergentes para avaliação da formação de TLS. O primeiro escore, publicado por Cabrita *et al.*, 2020, utiliza os seguintes genes: *CD79B*, *EIF1AY*, *PTGDS*, *RBP5*, *CCR6*, *SKAP1*, *LAT*, *CETP* e *CD1D*. O segundo escore, publicado por Kinker *et al.*, 2023, consiste nos genes a seguir: *CXCL13*, *CXCR5*, *CCL21*, *CCL19*, *CCR7*, *FCER2*, *CD3E*, *MS4A1*, *CR2*, *CD79A*, *PAX5*, *CD8⁺A* e *CD8⁺B*. Para a criação dos escores, normalizamos o valor de cada gene por amostra, subtraindo de seu valor individual o valor médio da sua expressão em todas as amostras. Após esta etapa, realizamos o somatório do valor normalizado de cada gene. Quando utilizados para estratificação, nos valem da mediana simples para dividir os pacientes em grupos de TLS alto e baixo. Também nos valem da implementação de um escore de resposta Th1 *in house*, ainda não publicado por nosso grupo. De modo análogo, o cálculo do escore é realizado como para os de TLS.

4.6.2 Gene Set Enrichment Analysis e Gene Ontology

Para ambas as análises, o pacote *clusterProfiler* foi utilizado, fornecendo-se uma lista pré-rankeada com os genes ordenados de acordo com a expressão diferencial entre os grupos avaliados, tendo como critério $\log_2(\text{fold change})$. As funções *gseGO* e *enrichGO* foram utilizadas para a realização das análises de GSEA e GO, respectivamente. Em ambos os casos, termos de *Gene Ontology* com foco em processos biológicos foram utilizados.

4.7 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Os pacotes *survival* e *survminer* foram implementados para a realização das análises de sobrevida. A probabilidade de sobrevida por tempo foi estimada através da função *survfit*, e o modelo de risco proporcional de Cox, pela função *coxph*.

4.8 DIAGRAMA DE SANKEY

O diagrama de Sankey foi construído com auxílio do pacote *networks3D*, a partir dos seguintes dados: *status* de *Helicobacter pylori*, classificação de Laurén, estadiamento, *status* de TLS, e *Follow up*. Esta análise foi aplicada na coorte retrospectiva do A.C.Camargo Cancer Center e no grupo de dados GSE62254.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a linguagem de programação R V4.3.2. Os testes utilizados em cada análise estão indicados em suas respectivas descrições.

5 RESULTADOS

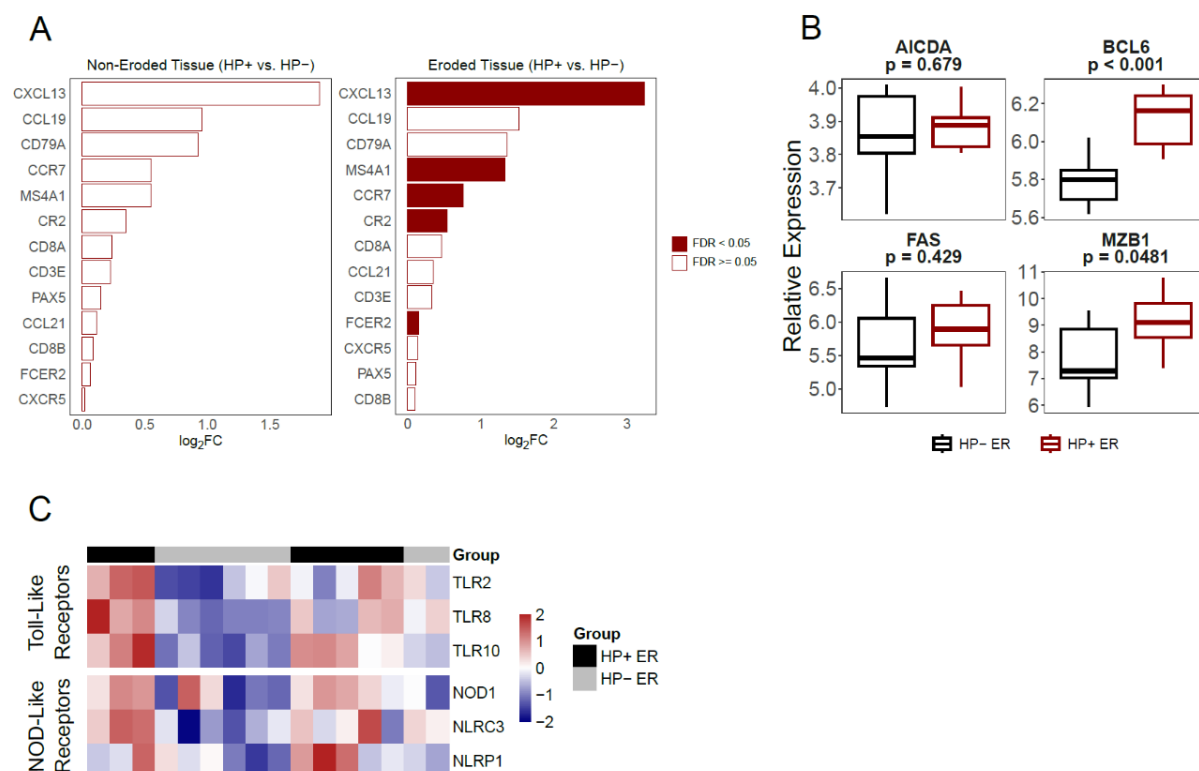
5.1 *HELICOBACTER PYLORI* ESTIMULA A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FORMAÇÃO DE FOLÍCULOS LINFOIDES

Em nossa primeira análise, buscamos avaliar a influência do *H. pylori* sobre o microambiente da mucosa gástrica. Para tal, utilizamos o *dataset* GSE5081, que consiste em *RNA*microarray de tecidos de mucosa antral normal (NER) ou erodida (ER) de indivíduos infectados (HP⁺) ou não (HP⁻) por *H. pylori*. Nossas análises iniciais demonstraram que além da presença do patógeno, é necessária a lesão tecidual para que ocorra um aumento significativo na expressão diferencial de genes relacionados à formação de TLSs na mucosa gástrica (Figura 5A). De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que o gene *CXCL13* é o de maior expressão em todos os indivíduos positivos para *H. pylori*. Porém, este torna-se diferencialmente expresso apenas quando existe o quadro de erosão da mucosa (HP⁺ ER) (log2FC = 3,24; FDR = 0,0086). A principal importância deste resultado está relacionada ao fato de o *CXCL13* ser um dos principais quimioatraentes de linfócitos B para os folículos em órgãos linfoides secundários e em estruturas linfoides terciárias, a partir de sua ação sobre seu receptor cognato, o CXCR5¹³⁶. No caso do *H. pylori*, *CXCL13* pode estar ligada ao processo de ativação/maturação do MALT, na tentativa de eliminação do patógeno, bem como formação de estruturas malignas como o linfoma de MALT⁵⁷.

Em relação a genes relacionados ao processo de formação de centro germinativo¹³⁷, como *AICDA*, *BCL6* e *FAS*, quando comparados entre indivíduos HP⁺ ER vs. HP⁻ ER, *AICDA* e *FAS* não apresentaram diferença em termos de expressão relativa (Figura 5B). Em contrapartida, os genes *BCL6* (p < 0,001) e *MZB1* (p = 0,0481) exibiram uma elevação significativa no grupo HP⁺ ER. Esta observação sugere que existe processo de maturação de respostas de linfócitos B, ao menos em fase inicial. Além disso, o gene *MZB1* está normalmente relacionado com formação de resposta imune humoral¹³⁸, o que pode ser sugestivo de resposta contra o *H. pylori*.

Naturalmente, a resposta contra o *H. pylori* se inicia com a atividade da imunidade inata no reconhecimento dos PAMPs bacterianos. Este evento pode ser indiretamente observado através da maior intensidade de sinal de alguns receptores da imunidade inata, como receptores

Toll-like e NOD-like selecionados com base em sua elevação significativa nas amostras de indivíduos pertencentes ao grupo HP⁺ ER, comparados aos HP⁻ ER (Figura 5C; *TLR2* $p < 0,0217$; *TLR8* $p = 0,0103$; *TLR10* $p < 0,001$; *NOD1* $p = 0,0188$; *NLRP1* $p = 0,0195$; *NLRC3* $p = 0,0225$). Deste modo, nossos resultados sugerem uma relação entre elementos de reconhecimento bacteriano com a eventual geração de resposta imune humoral.



Fonte: Autoria própria

Figura 4. *Helicobacter pylori* e erosão da mucosa relacionam-se com a intensidade da resposta imunológica na gastrite crônica. (A) Barplots representativos da expressão diferencial de genes relacionados à maturação de TLS em HP⁺ NER vs. HP⁻ NER (painel esquerdo) e HP⁺ ER vs. HP⁻ ER (painel direito). As barras em vermelho correspondem aos genes diferencialmente expressos ($n = 16$, FDR < 0,05). (B) Heatmap representativo ($n = 16$) dos receptores Toll-like e NOD-like significativamente expressos no grupos HP⁺ ER vs. HP⁻ ER através do teste T de Student. (C) Análise de genes relacionados ao processo maturativo de linfócitos B entre indivíduos HP⁺ ER vs. HP⁻ ER, analisados através do teste T de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

5.2 ASSINATURAS IMUNOLÓGICAS DO *H. PYLORI*

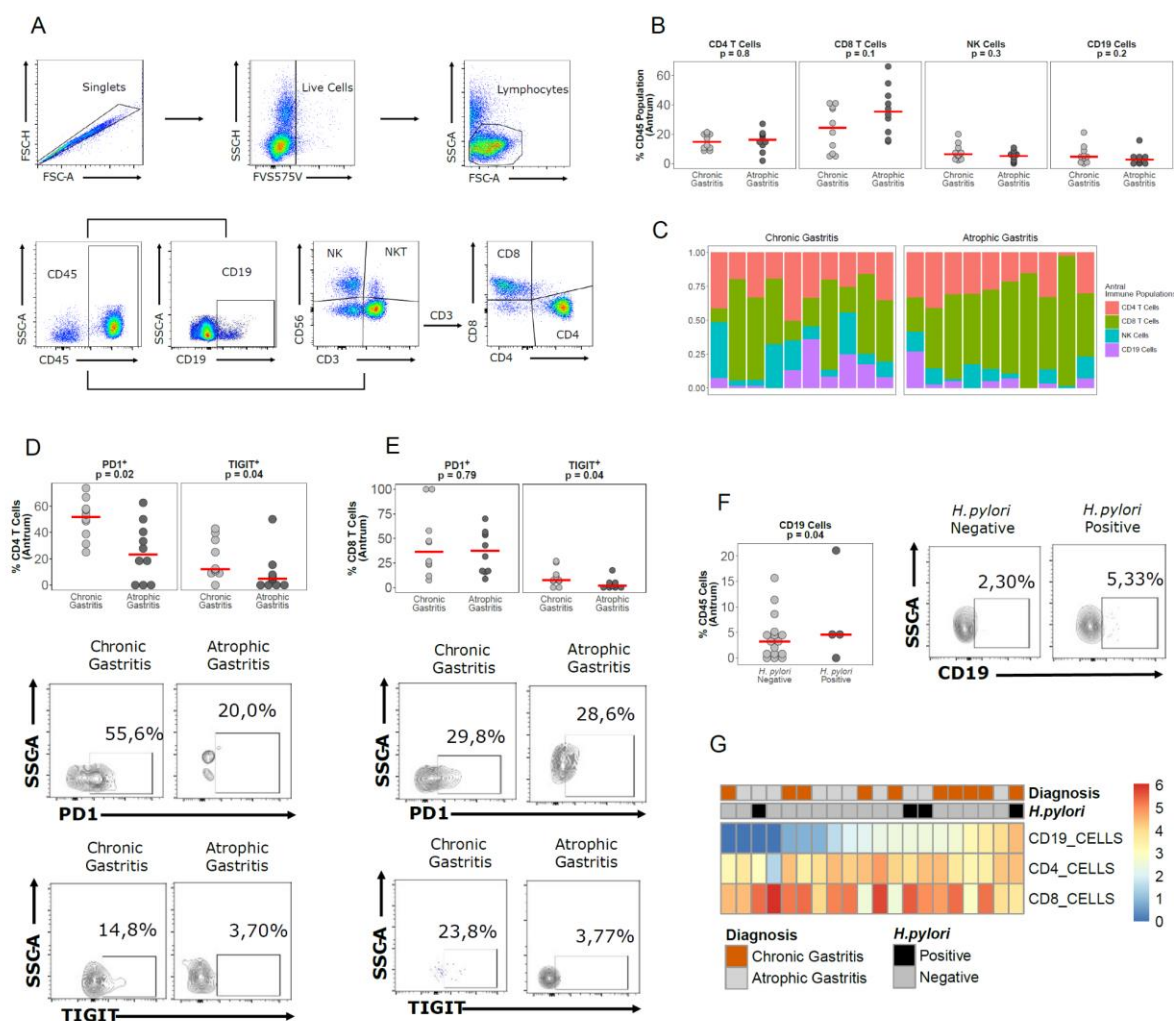
5.3 MAIORES FREQUÊNCIAS DE IMMUNE CHECKPOINTS NA GASTRITE CRÔNICA

Valendo-nos de uma coorte de 20 pacientes recrutados no A.C.Camargo Cancer Center (Anexo 1), sendo 10 diagnosticados com gastrite crônica e 10 com gastrite atrófica, realizamos análise por citometria de fluxo multiparamétrica nas amostras da região antral, com o intuito de verificar seus perfis imunológicos.

Observamos que não há diferença na frequência de células T CD4⁺ ($p = 0,8$), de T CD8⁺ ($p = 0,1$), de NK ($p = 0,3$) e de células B CD19⁺ ($p = 0,2$) entre os estágios crônico e atrófico da gastrite, analisando-se o compartimento de células CD45 totais (Figura 7A-C). Contudo, notamos que células T CD4⁺ expressando os *immune checkpoints* PD1 e TIGIT são significativamente mais abundantes em pacientes com gastrite crônica do que em pacientes com gastrite atrófica (Figura 7D). A frequência de células T CD8⁺ expressando TIGIT também foi significativamente mais abundante em pacientes com gastrite crônica do que em pacientes com gastrite atrófica (Figura 7E), porém sem que houvesse diferença estatística na frequência de células T CD8⁺ expressando PD-1 (Figura 7E).

Quando exploramos a eventual influência do *H. pylori* sobre a montagem de uma resposta adaptativa com grande participação das células B, segregamos a coorte em indivíduos *H. pylori* positivos ($n = 4$) e negativos ($n = 16$). Observamos que a frequência de células B CD19⁺ está significativamente elevada em pacientes com *H. pylori* positivo (Figura 7F). Como mostrado no *heatmap* ordenado pela frequência de células B CD19⁺, ao menos três dos quatro indivíduos HP⁺ distribuem-se próximos à região de maior frequência de células B, independentemente do tipo de gastrite (Figura 7G).

Em conjunto, nossos resultados mostram que há maior presença de marcadores de exaustão celular nos quadros crônicos. Somando-se a isto, observamos que as células B estão presentes em maior frequência durante em pacientes com HP⁺, corroborando nossos achados anteriores, que sugeriram uma resposta humoral local sendo formada.



Fonte: Autoria própria

Figura 5. Gastrite crônica está associada à presença de marcadores de exaustão imunológica. (A) Estratégia de gating. (B) Dotplots para cada uma das populações celulares comparando-se os dois tipos de gastrite da coorte. (C) Stacked barplots demonstrativos para a distribuição das células T CD4⁺, T CD8⁺, NK e CD19 no antro de indivíduos portadores de gastrite crônica e atrófica. (D) populações imunes principais, (D) T CD4⁺ PD1⁺ e TIGIT⁺ e (E) T CD8⁺ PD1⁺ e TIGIT⁺. (F) Dotplot comparativo entre indivíduos negativos ou positivos para *H. pylori* em relação às células CD19. (G) Heatmap ordenado pelo sinal crescente de células CD19, onde também são incluídas células T CD4⁺ e T CD8⁺. A intensidade foi calculada como $\log_2(x + 1)$ da frequência de cada uma das células na população CD45. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.4 ANÁLISE DO INFILTRADO IMUNE DE PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Como visto, o *H. pylori* exerce influência sobre o sistema imunológico do hospedeiro durante a fase pré-neoplásica, o que pode estar associada à formação de estruturas linfoides ectópicas, que atingem seu maior grau de maturação durante a fase crônica da doença, com a

presença de uma resposta imune humoral formada contra o patógeno. Contudo, ainda não foi abordado o efeito da interação hospedeiro-patógeno no contexto neoplásico. Para realizarmos esta análise, utilizamos inicialmente 17 pacientes oriundos do A.C.Camargo Cancer Center e do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Anexo 2), avaliando o seu perfil imunológico.

Em nosso passo inicial, observamos que mesmo o tecido tumoral possuindo maior abundância celular do que o peritumoral (Figura 8A e B), a frequência da população leucocitária CD45⁺ era estatisticamente equivalente entre os dois sítios (Figura 8C $p = 0,782$), mesmo quando estratificados (Figura 8D) entre o subtipo difuso ($n = 7$, $p = 0,805$) e o intestinal ($n = 8$, $p = 0,86$). Além da frequência semelhante da população CD45⁺ entre os dois sítios anatômicos, as abundâncias das principais populações imunes não apresentaram diferenças estatísticas, indicando que existe uma manutenção das proporções celulares entre os sítios anatômicos (Figura 8E). Contudo, não foi possível avaliar a influência do *H. pylori* sobre a composição celular, pois nesta coorte há apenas um caso confirmado de infecção. Sendo assim, optamos por realizar apenas uma caracterização geral, sinalizando o paciente infectado para mostrar, qualitativamente, seu comportamento.

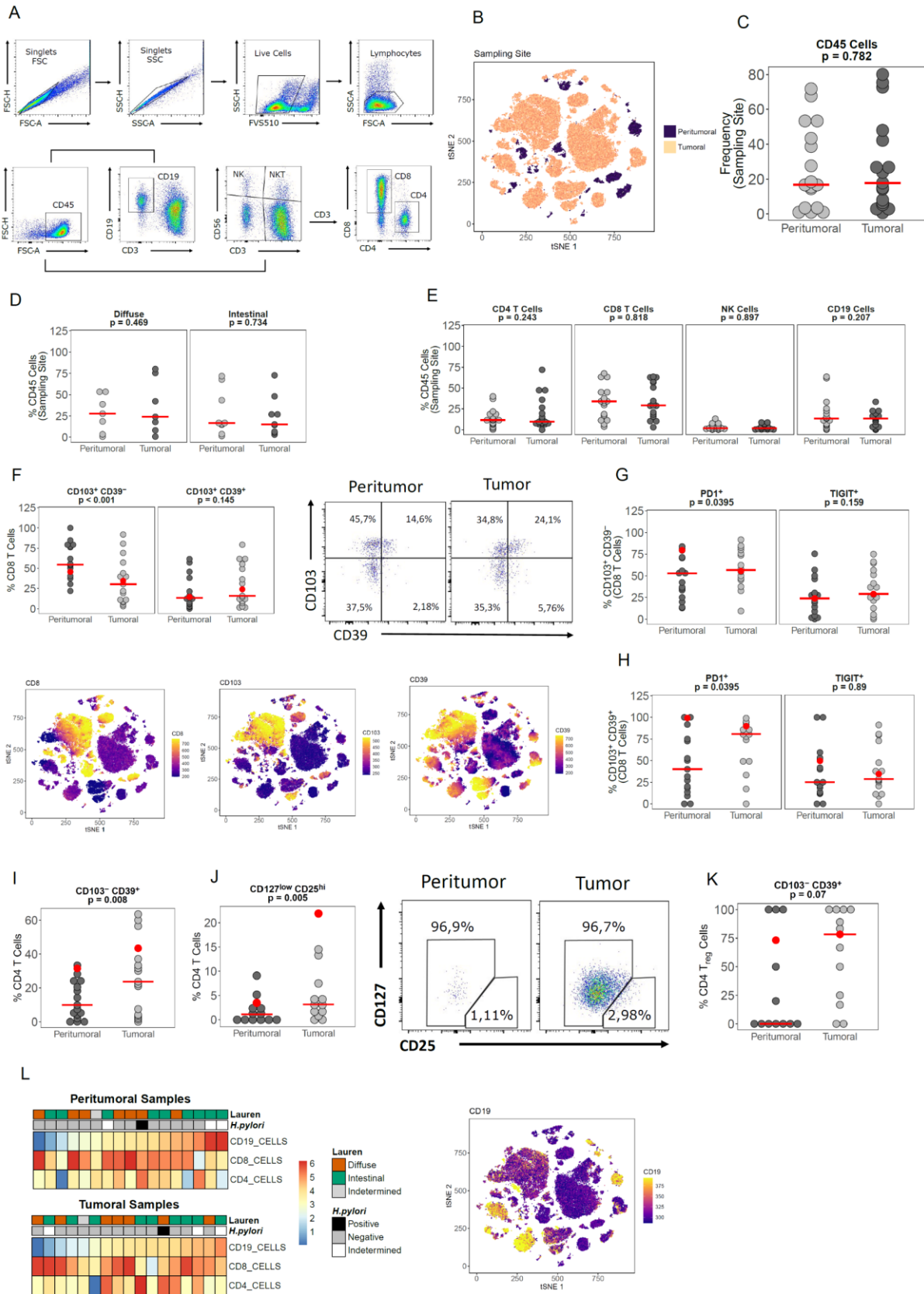
Como primeira análise mais específica, buscamos avaliar a frequência dos linfócitos T CD8⁺ CD103⁺ e T CD8⁺ CD103⁺ CD39⁺, ambos importantes componentes da imunidade contra tumores¹⁴¹, que expressam o marcador de residência tecidual CD103. Por serem relacionadas à residência tecidual, também se relacionam até certo ponto com o *H. pylori*, pois as células com perfil de residência estão dentre as primeiras a interagirem com a bactéria durante a fase inicial da infecção¹⁴². Em nossa análise, observamos que as células T CD8⁺ CD103⁺ encontram-se significativamente elevadas no tecido peritumoral (Figura 8F; $p < 0,001$), contudo esta possui maior frequência na expressão de PD1 no tecido tumoral (Figura 8G; $p = 0,0395$), sem apresentar diferenças na frequência de TIGIT (Figura 8G; $p = 0,89$). Já as T CD8⁺ CD103⁺ CD39⁺, embora não apresentem diferença entre os tecidos (Figura 8F, $p = 0,145$), também demonstraram frequência mais elevada apenas na população PD1⁺ (Figura 8H; $p = 0,0395$). Em ambos os casos, o sítio tumoral é onde ocorre a prevalência da molécula de PD1, um marcador clássico de ativação/exaustão celular¹⁴³, o que é sugestivo da exposição constante a antígenos tumorais, e iniciando um processo de exaustão, pois a expressão do marcador TIGIT, que indicaria um processo mais avançado de exaustão, não possui diferença entre as células T do tecido tumoral e do tecido peritumoral, além de exibir uma mediana menor.

Outro componente de grande importância nesta questão são as células T CD4⁺ CD39⁺, que fenotipicamente são características de células reativas ao tumor¹⁴⁴, e as T CD4⁺ CD127^{low}

CD25^{hi} (Tregs). As células T CD4⁺ CD39⁺ e as Tregs foram observadas em uma frequência significativamente maior no compartimento tumoral (Figura 8I, $p = 0,008$; Figura 8J, $p = 0,005$). É possível encontrar também uma maior frequência, mesmo que não significativa, (Figura 8K, $p = 0,07$) de Tregs CD39⁺ no compartimento tumoral, uma população considerada mais estável sob o ponto de vista de expressão de Foxp3¹⁴⁵.

Em relação à questão do envolvimento das células B, como visto na Figura 7, ambos os compartimentos possuem estatisticamente a mesma frequência dessas células ($p = 0.207$). Além disso, mesmo criando-se um *heatmap* ordenado pelo $\log_2(x + 1)$ da frequência das células B CD19⁺ em relação aos leucócitos totais (CD45⁺), não se observou uma correlação clara com as demais células (Fig 8L) em todos os compartimentos.

Assim, podemos concluir que o microambiente do adenocarcinoma gástrico possui células T com fenótipo de reatividade ao tumor, além de Tregs. Embora não consigamos elaborar comparações com a infecção por *H. pylori*, o paciente presente na coorte não exibiu um comportamento destoante das demais amostras.



Fonte: Autoria própria

Figura 6. Caracterização de grupos celulares do microambiente gástrico. (A) Estratégia de *gating*. Todas as análises quantitativas foram realizadas comparando-se o compartimento tumoral e peritumoral dos pacientes envolvidos, variando-se apenas o tipo de população envolvida. (B) Análise da população total de células CD45. (C) tSNE demonstrativo da celularidade da região tumoral e peritumoral. (D) Avaliação da população de células CD45 no subtipo difuso (n = 7, painel esquerdo) e intestinal (n = 8, painel direito). (E) Análise das populações de células T CD4⁺, T CD8⁺, NK e CD19, em frequência de CD45. (F) Avaliação das populações de células T CD8⁺ CD103⁺ CD39⁻ (painel esquerdo) e T CD8⁺ 103⁺ CD39⁺ (painel direito). Ao lado da figura F encontram-se os gates representativos das populações nela analisadas, e abaixo, no painel inferior, tSNEs para a distribuição das populações T CD8⁺, CD103 e CD39. Distribuição das frequências de PD1 (panel esquerdo) e TIGIT (painel direito) entre os compartimentos histológicos, nas células (G) T CD8⁺ CD103⁺ CD39⁻ e (H) T CD8⁺ 103⁺ CD39⁺. Análise das populações de células (I) T CD4⁺ CD103⁻ CD39⁺ e (J) T CD4⁺ CD127^{low} CD25^{hi} (Tregs). À direita da figura J, pode-se observar seus gates representativos. (K) Análise da população de Tregs CD39⁺. (L) *Heatmaps* ordenados pelo sinal crescente de células CD19, onde também são inclusas células T CD4⁺ e T CD8⁺. A intensidade foi calculada como $\log_2(x + 1)$ da frequência de cada uma das células na população CD45. À direita encontra-se o tSNE representativo da distribuição das células CD19 nas amostras avaliadas. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.5 *HELICOBACTER PYLORI* ESTÁ ASSOCIADO À MAIOR PRESENÇA DE TLS NA MARGEM INVASIVA DO TUMOR

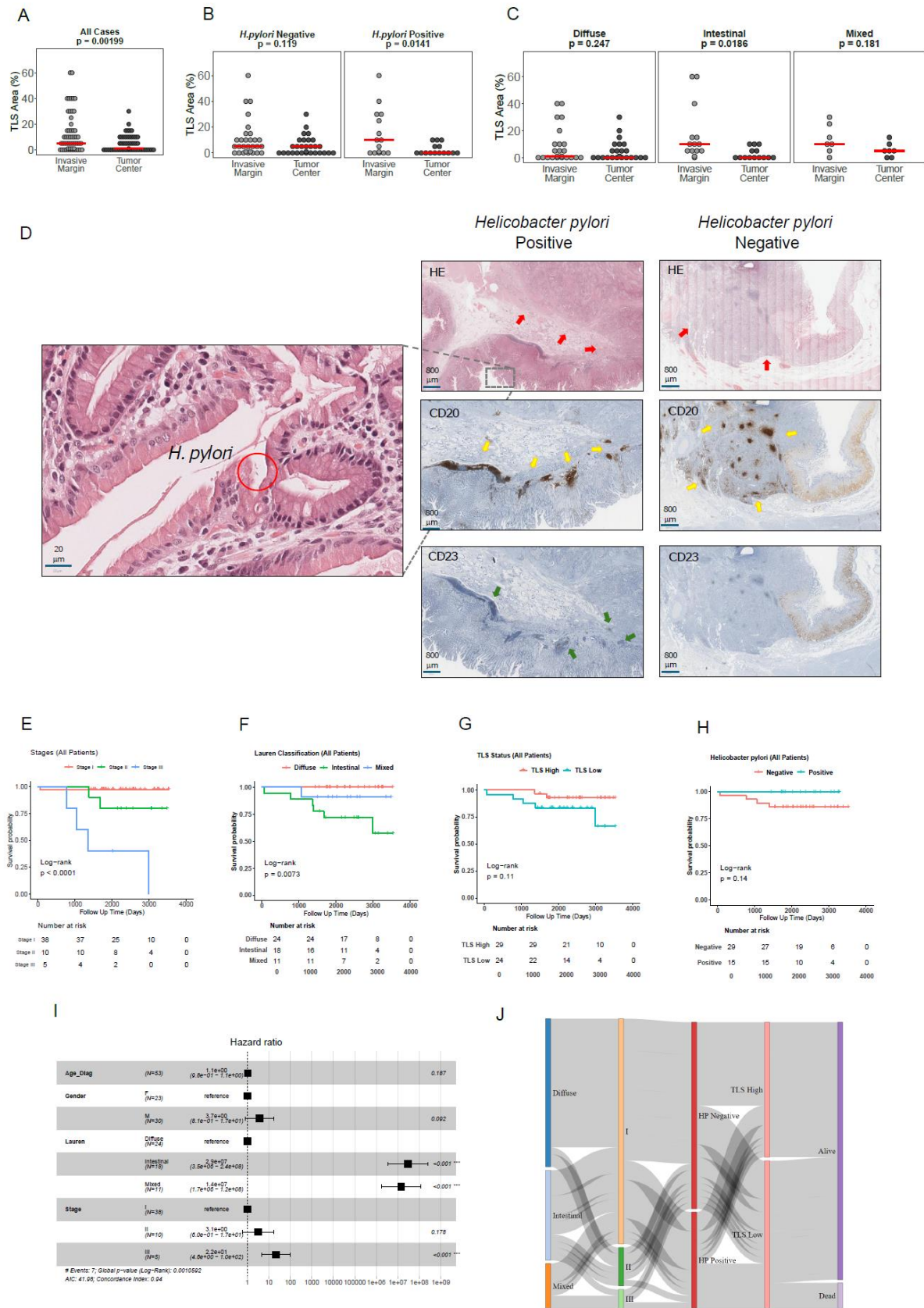
Com o objetivo de nos aprofundarmos na questão da influência do *H. pylori* sobre a formação das estruturas linfoides terciárias, nos valem de uma coorte histórica de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico no A.C.Camargo Cancer Center entre os anos de 2014 e 2020 (Anexo 3). Esta coorte foi analisada quanto a área de TLSs presentes nas regiões da margem invasiva e no centro do tumor, por um patologista qualificado.

Inicialmente, buscamos explorar em todos os casos, independentemente do status de *H. pylori* (n = 54), a distribuição da área dos TLS. Observamos que os TLSs estão distribuídos sobretudo na margem invasiva em comparação ao centro do tumor ($p < 0,00199$) (Figura 9A). A partir deste resultado, especulamos se a diferença observada poderia estar relacionada à influência do *H. pylori* sobre o microambiente. Deste modo, realizamos uma análise na qual os pacientes foram segregados em infectados (n = 15) e não infectados (n = 29) pelo patógeno, sendo possível observar que apenas os indivíduos infectados exibiram um incremento significativo ($p = 0,0141$) de TLSs na margem invasiva em comparação ao observado no centro do tumor (Figura 9B). Esta observação também foi possível de ser verificada em indivíduos com adenocarcinoma gástrico do subtipo intestinal de Laurén ($p = 0,0186$) (Figura 9C). Por meio da identificação do *H. pylori* em lâminas de H&E, além da marcação por imunohistoquímica de CD20 e CD23, foi possível notar a presença de agregados linfoides maduros contendo células B CD20⁺ e células dendríticas foliculares ne regiões contíguas à presença do

H. pylori (Figura 9D). Tais resultados sugerem que o *H. pylori* está associado à formação de estruturas ectópicas fora do centro tumoral.

Durante a avaliação dos aspectos prognósticos, incluímos como parâmetros: estadiamento, subtipo histológico de Laurén, status de TLS e infecção por *H. pylori*. Para a elaboração do status de TLS, utilizamos a mediana da área total (54 pacientes, mediana = 11) para classificar os pacientes em TLS alto ($\geq$ mediana) e TLS baixo ($<$ mediana). Contudo, em termos prognósticos, os únicos aspectos de impacto na sobrevida dos indivíduos pertencentes a esta coorte foram estadiamento, no qual os pacientes em estadiamento III demonstraram possuir a pior sobrevida (Figura 9E e 9I; HR = 2.2, $p < 0,01$); e subtipo de Laurén, com os indivíduos pertencentes ao subtipo intestinal (Figura 9F e 9I; HR = 2.0, $p < 0,001$) e misto (Figura 9F e 9I; HR = 1.4, $p < 0,001$) exibindo as piores performances. O diagrama de Sankey (Figura 9J) demonstra a dinâmica descrita nas análises desta coorte.

Deste modo, verificamos que o *H. pylori* está associado a uma menor presença de TLSs no centro do tumor, comparativamente à margem invasiva. Observação análoga foi encontrada no subtipo intestinal de Laurén, independentemente do status de infecção. Entretanto, em pacientes diagnosticados em estadiamentos iniciais da doença, como no caso desta coorte, não é observada a influência do status de TLS (Figura 9G) ou infecção (Figura 9H) sobre o prognóstico.



Fonte: Autoria própria

Figura 7. Influência do *H. pylori* na formação de estruturas linfoides terciárias associadas à margem invasora no adenocarcinoma gástrico. Distribuição da área de TLS entre a margem invasiva e centro do tumor em (A) todos os pacientes; indivíduos *H. pylori* (B) negativos e positivos; e nos (C) subtipos histológicos de Laurén. Análises realizadas pelo teste de Wilcoxon, sendo $p < 0.05$ significativo. (D) Marcação de HE (Eosina/Hematoxilina), CD20 e CD23 para indivíduos *H. pylori* positivo (panel esquerdo e central) e negativo (painel direito). Setas vermelhas indicam a localização tumoral; setas amarelas e verdes, indicam respectivamente as marcações de CD20 e CD23. Círculo vermelho mostra a localização do *H. pylori*. Curvas de Kaplan-Meier indicando (E) estadiamento, (F) classificação de Laurén, (G) status de TLS, e (H) status de infecção por *H. pylori*. (I) Diagrama de Cox. (J) Diagrama de Sankey demonstrativo do fluxo de informação da coorte.

5.6 *H. PYLORI* E STATUS DE TLS NO PROGNÓSTICO DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Para o aprofundamento de nossa análise relativa à associação entre *H. pylori* e a formação de estruturas linfoides terciárias em pacientes com adenocarcinoma gástrico, nos valem da coorte de pacientes do ACRG (GSE62254, *RNAmicroarray*)⁴⁰. Desta coorte, excluímos os pacientes pertencentes ao estadiamento IV, restando para a análise um total de 219 indivíduos.

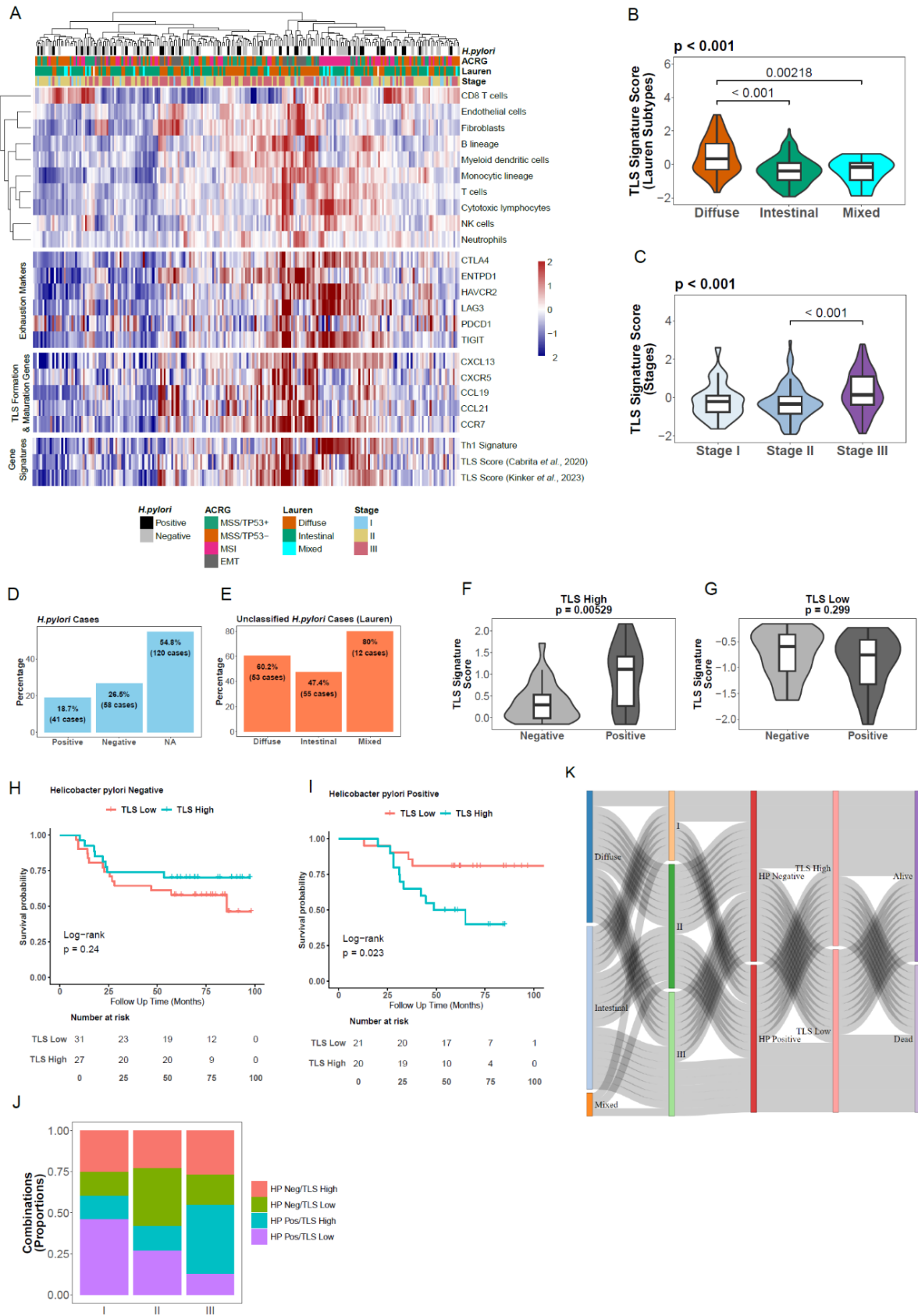
Como ponto inicial, buscamos caracterizar o perfil imunológico da coorte como um todo, para averiguar possíveis padrões de interesse. Sendo assim, os dados de expressão gênica foram deconvolucionados pelo algoritmo *MCPCOUNTER*¹³⁵, obtendo-se a abundância relativa das células imunes e estromais presentes no microambiente tumoral. Após agrupamento hierárquico (Figura 10A), observamos que a abundância das células imunes apresentou grande heterogeneidade, havendo regiões imunologicamente mais ricas, tanto no aspecto celular, quanto no aspecto relativo aos genes de marcadores de exaustão (*PDCD1*, *TIGIT*, *ENTPD1*, *CTLA4*, *HACR2* e *LAG3*), formação e maturação de TLSs (*CXCL13*, *CCL19*, *CCL21*, *CXCR5*, *CCR7*), e assinaturas de TLS e resposta Th1. A despeito destes elementos não formarem um padrão claro, como nos indivíduos acometidos por gastrite crônica, foi possível observar que a assinatura de TLS¹³⁰ estava enriquecida em pacientes com adenocarcinoma do tipo difuso de Laurén (Figura 10B) e durante o estadiamento III (Figura 10C), o que é sugestivo de maior atividade inflamatória nestes cenários.

Uma característica desta coorte que se faz necessária menção é a elevada porcentagem de casos não classificados de *H. pylori* (Figura 10D), o que compromete os subtipos difuso, intestinal e misto (Figura 10E) em 60,2%; 47,4%; e 80%, respectivamente. Deste modo, para a avaliação da distribuição da assinatura de TLS entre os indivíduos com *status* de *H. pylori* disponível, reduzimos a coorte para 99 indivíduos, dos quais 41 eram positivos e 58, negativos

para a infecção. Os pacientes foram segregados de acordo com a mediana da assinatura de TLS calculada na coorte completa (219 pacientes, mediana = -0,140675) em TLS alto ($\geq$ mediana) e TLS baixo ($<$ mediana). Assim, observamos que os indivíduos classificados como TLS alto (Figura 10F) exibem valores de escore significativamente mais elevados quando infectados *H. pylori* ($p = 0,00529$), não havendo diferença relativa ao status de infecção naqueles que foram classificados como TLS baixo (Figura 10G).

A partir da observação desta associação entre escores mais elevados TLS e presença de *H. pylori*, buscamos averiguar se também haveria influência desses fatores no prognóstico. Assim, os pacientes foram segregados em dois grupos de acordo com seu status de infecção, procedendo-se então para a análise de sobrevida (Figura 10H e 10I). Em pacientes HP⁺, a presença de TLS não influenciou a sobrevida global dos pacientes com câncer gástrico (Figura 10H). Surpreendentemente, os indivíduos infectados e com status elevado de TLS possuíram menor sobrevida ($p = 0,023$) em relação aos pacientes infectados e com status reduzido de TLS (Figura 10I). Também foi observado que nesta coorte a proporção de indivíduo infectados e com escore de TLS elevado pertenciam principalmente ao estadiamento III (Figura 10J).

Assim, mostramos que, especialmente nos estadiamentos mais avançados, a combinação de infecção por *H. pylori* e um escore elevado de TLS possui influência sobre o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma gástrico. O diagrama de Sankey (Figura 10K) mostra graficamente a dinâmica dos eventos descritos nesta secção.



Fonte: Autoria própria

Figura 8. *H. pylori* em combinação com status de TLS é indicativo prognóstico de pacientes com adenocarcinoma gástrico. (A) *Heatmap* demonstrativo do panorama imunológico dos indivíduos constituintes da coorte analisada, destacando-se os principais tipos celulares, bem como genes representativos de cada uma das categorias presentes. Distribuição do escore de TLS *in house* entre (B) os subtipos tumorais de Laurén e (C) estadiamento. Análises realizadas por ANOVA, seguido por pós teste de Tukey, Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. (D) Porcentagem de casos positivos, negativos e não classificados de infecção por *H. pylori*. (E) Porcentagem de casos não classificados de *H. pylori* entre os subtipos difuso, intestinal e misto de Laurén. Distribuição do escore de TLS entre indivíduos portadores de *H. pylori* ou não estratificados por (F) TLS alto e (G) TLS baixo. Análise de sobrevivência de indivíduos *H. pylori* (H) positivos e (I) negativos. (J) Distribuição das combinações entre *H. pylori* e TLS para os estadiamentos I, II e III. (K) Diagrama de Sankey demonstrativo do fluxo de informação da coorte.

5.7 PACIENTES INFECTADOS POR *H. PYLORI* EXIBEM PROCESSOS BIOLÓGICOS LIGADOS À RESPOSTA ANTIMICROBIANA

Ainda valendo-nos da coorte do ACRG, realizamos uma análise diferencial dos genes expressos entre pacientes TLS alto vs. TLS baixo, segregados em *H. pylori* positivos (Figura 11A) e negativos (Figura 11B), conforme demonstrado pelos *volcano plots*. Naturalmente era esperado que genes como *CXCL13* e *CCL19*, ligados à formação de TLSs estivessem diferencialmente expressos em ambos os casos. Contudo, o foco desta análise foi a busca pelos genes que estavam exclusivamente diferenciados em indivíduos *H. pylori* positivos. Um total de 197 genes foram obtidos, cruzando-se os genes diferencialmente expressos dos dois cenários, sob as mesmas condições ($\log_2FC > 0,5$; $FDR < 0,05$). Esses genes foram submetidos à análise de *Gene Ontology*, sendo possível observar a presença de diversos processos biológicos ligados à resposta imune (Figura 11C), indicando que na presença de *H. pylori*, o sistema imune encontra-se em atividade mais intensa.

Devido à heterogeneidade inerente aos subtipos de Laurén envolvidos na análise anterior, buscamos realizar nova avaliação em uma coorte mais homogênea. Para tal, utilizamos a coorte GSE129219¹⁴⁶, constituída por pacientes com adenocarcinoma gástrico difuso. Pelo fato de o câncer gástrico difuso não se originar de um processo inflamatório crônico, tal qual o subtipo intestinal¹⁴⁷, especulamos que as modificações causadas pelo *H. pylori* seriam melhor observadas. Deste modo, realizamos a análise diferencial (Figura 11D), e verificamos que diversos genes ligados a processos de exaustão como *PDCD1*, *TIGIT*, *CTLA4* e *LAG3* encontram-se negativamente expressos nos indivíduos que já tiveram exposição ao *H. pylori*, porém genes ligados a processos que envolvem linfócitos B, como *CD19*, e mesmo *CXCL13* encontram elevados nestes indivíduos. O mesmo pode ser observado em genes ligados à metaplasia como *TFF3* e *MUC2*, demonstrando que o *Helicobacter pylori* influencia

profundamente o microambiente tumoral. O último passo desta análise, foi a realização do GSEA, utilizando-se termos de *Gene Ontology* ligados a processos biológicos. Dentre os resultados providos pela análise, notamos a existência de processos relacionados à resposta imune de mucosas, resposta imune humoral, resposta humoral antimicrobiana e a bactérias gram-negativas (Figura 11E).

Com esse resultado, foi possível demonstrar que indivíduos infectados por *H. pylori*, possuem um componente imune que não é direcionado apenas ao tumor, mas claramente é direcionado a microrganismos patogênicos, especialmente no tocante à resposta imune adaptativa humoral.

Fonte: Autoria própria

Figura 9. A infecção por *H. pylori* promove resposta imune direcionada a patógenos no microambiente tumoral. *Volcano plots* demonstrativos da expressão diferencial entre TLS alto e TLS baixo em indivíduos *H. pylori* (A) negativos e (B) positivos. (C) Processos biológicos GO. (D) *Volcano plot* relativo à expressão diferencial gênica entre indivíduos com câncer gástrico expostos ou não ao *H. pylori*. (E) GSEA plots relativos à resposta imune de mucosas, imunidade humoral, resposta humoral antimicrobiana e resposta a bactérias gram-negativas.

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS PRÉ-NEOPLÁSICOS

No presente trabalho, foi investigada a influência do *Helicobacter pylori* sobre o microambiente da mucosa gástrica tanto no contexto pré-neoplásico, relacionando-a com a cascata de Correa³³, quanto neoplásico. Em ambos os casos, fomos capazes de avaliar as principais modificações causadas pela infecção. Estas iniciam-se, necessariamente, com o estabelecimento de uma resposta imunológica inata e adaptativa, que na tentativa de eliminar o patógeno causam efeitos nocivos aos hospedeiro, como as gastrites e úlceras^{48,56}. A continuidade destes efeitos lesivos, potencialmente contribuem para o estabelecimento de processo malignos, como no caso do adenocarcinoma gástrico¹⁴⁸ e linfoma de MALT^{17,106}.

Como sabemos, a colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*, seguido por seu contato mais íntimo com as células epiteliais, possibilitando a entrega de seus fatores de virulência, e o reconhecimento de antígenos presentes em sua estrutura são os passos iniciais da resposta imunológica contra este patógeno. Sendo assim, fomos capazes de verificar que apenas a presença de *H. pylori* não é suficiente para a indução de significativa de genes relacionados à resposta imunológica como das famílias de TLRs e NRLs (Figura 4). Com o estabelecimento do contato mais estreito entre a bactéria e as células do hospedeiro, temos de fato a montagem inicial do processo inflamatório, com a elevação na expressão de receptores como TLR2 e NLRP1, que agem promovendo a resposta inflamatória pela produção de mediadores como IL-2, IL-6 e IL-12 via ativação do NF- κ B¹⁴⁹, e por formação de inflamassoma, como no caso do IL-1 β , respectivamente¹⁵⁰.

Além desses eventos, observamos que o gene *CXCL13*, bem como outros envolvidos com o processo de formação e maturação de estruturas linfoides terciárias como *CCR7*, estavam diferencialmente expressos apenas nos indivíduos que apresentaram lesões erosivas, o que nos leva a especular que, neste ponto está ocorrendo, ao menos inicialmente a formação de folículos linfoides na região da lâmina própria. Este processo, coordenado pela atividade do eixo CXCR5/CXCL13 está presente não apenas neste caso em particular, mas em todos os eventos que envolvem *homing* de linfócitos B para a região dos folículos em órgãos linfoides secundários¹³⁶ e estruturas linfoides terciárias, como observadas em tumores¹³⁰. Neste contexto,

um experimento realizado em modelo murino de infecção pelo *Helicobacter suis*⁵⁷, demonstrou que o tratamento com anti-CXCL13, além de reduzir a formação de folículos linfoides, também contribuía para a elevar a expressão de *TGFβ*, *IL-6* e *IL-10*, permitindo a induzindo a produção de anticorpos do tipo IgA, específicos contra a bactéria.

Embora existam posicionamentos divergentes sobre a existência ou não de agregados linfoides nativos no estômago^{151,152}, um estudo recente¹⁵³ no qual pacientes submetidos à cirurgia bariátrica foram analisados quanto à existência de agregados linfoides na presença ou ausência de *H. pylori*, demonstrou que mesmo na inexistência de infecção, havia a presença discreta de agregado linfoides, porém os infectados os exibiam de modo exuberante e com formação de centros germinativos. Este dado corrobora, mesmo que indiretamente, nossos resultados, inclusive pela observação de um sinal mais elevado, embora não significativo, de *CXCL13* na ausência de lesão por *H. pylori*. Também, o faz, em relação à expressão relativa dos genes relacionados à formação de centro germinativo, como *BCL6*, *AICDA*, *FAS* e *MZB1*. Embora nesta análise o gene *CXCR5* não tenha demonstrado expressão diferencial significativa, este relaciona-se à formação de folículos linfoides na mucosa em casos de infecção por *H. pylori*¹⁵⁴. Estes resultados são indicativos da presença de sinais relacionados à formação de estruturas linfoides ectópicas e à maturação de linfócitos durante a gastrite crônica erosiva pelo *H. pylori*, porém, o entendimento dinâmico deste processo, deve ser feito à luz da cascata de Correa³³.

De acordo com a cascata de Correa³³, a primeira modificação histológica reconhecida é a inflamação crônica, e mesmo que este evento não seja considerado pré-neoplásico, é neste ponto onde a resposta imunológica, principalmente celular encontra seu ápice, como foi possível observar em nossos resultados (Figura 6). Contudo nestes resultados, um aspecto interessante deve ser mencionado: enquanto é clara a divisão entre um ambiente imunológico mais quente, e outro frio, nota-se que muitos dos indivíduos *H. pylori* positivos não exibem uma resposta imune tão intensa, mesmo diagnosticados como gastrite crônica ativa. Uma possível explicação para o ocorrido, é a presença de cepas menos virulentas do *H. pylori*, deficientes em CagA, que é imunologicamente dominante, gerando assim um processo inflamatório menos intenso, mas que não descarta o risco da progressão para a gastrite atrófica¹⁵⁵, considerado o primeiro estágio pré-neoplásico³³. Ainda assim, uma parcela considerável dos pacientes exibe uma resposta imunológica mais elevada, especialmente na gastrite crônica ativa, o ponto de maior escore para a assinatura de TLS, indicando que existe a formação ativa de folículos linfoides neste ponto da interação hospedeiro-patógeno.

Caracteristicamente, estes folículos linfoides formam centros germinativos com mínima expansão de zona marginal¹⁵⁶. Contudo, até onde é a literatura demonstra, este é o primeiro trabalho a relacionar dentro da escala de Correia, o comportamento de uma assinatura relacionada à formação de folículos linfoides/TLS, e sinais da resposta imune ao *H. pylori*. Além do aspecto relacionado à formação dos folículos linfoides, é necessário atentar que a resposta imune neste contexto é direcionada à contenção ou erradicação da bactéria^{142,157}. Como exemplificação para tal situação, tem-se o tratamento de escolha para linfoma de MALT, que é um tipo de linfoma de células B, normalmente de baixo grau, cuja principal causa etiológica é o *H. pylori*. Para esta neoplasia, a terapia de escolha é a antibioticoterapia¹⁵⁶, que a depender da resistência da cepa bacteriana, pode ser ajustada¹⁵⁸. Sendo assim, nossos achados ligados aos maiores escores de enriquecimento da resposta imune humoral, adaptativa, e migração de leucócitos, que a princípio podem ser considerados genéricos, complementam-se à resposta bacteriana, indicado o direcionamento tomado pela resposta imune.

Realizada a caracterização *in sílico*, onde verificou-se indicativos da existência da formação de uma reação linfoide *stepwise* durante a resposta imune anti-*H. pylori*, buscamos emular estes achados em uma coorte de pacientes ambulatoriais portadores de gastrite crônica e atrófica (Figura 7). Mesmo que não tenha sido possível verificar diretamente uma diferença entre os infiltrados de células imunes entre as duas patologias, confirmou-se ao menos em parte, que durante o processo inflamatório crônico, havia maior frequência de populações positivas para marcadores de exaustão como PD1 e TIGIT, particularmente nas células T CD4⁺, em comparação ao observado nas células T CD8⁺. Embora estes resultados agrupem todos os indivíduos, independentemente do *H. pylori*, esta análise é válida sob a condição da caracterização geral do estado celular em ambos os estágios da gastrite. Mesmo com a escassez de dados na literatura relativas às células T CD4⁺ e T CD8⁺ neste contexto específico, alguns trabalhos demonstram que durante a infecção por *H. pylori*, estas populações celulares encontram-se elevadas *in situ*, exibindo capacidade de expressão de IFN- γ e IL-2, contribuindo com o perfil Th1¹⁵⁹. Outros trabalhos demonstram a predominância de populações de células B e CD4⁺ na mucosa gástrica de pacientes portadores de úlcera péptica, infectados por *H. pylori*, independentemente do sítio da lesão¹⁶⁰, ou mesmo que células T CD8⁺ apresentam-se em maior abundância na lâmina própria de papacintes *H. pylori* positivos¹⁶¹. Ainda assim, não há avaliação comparativa entre o infiltrado de tipos diferentes de gastrite. Deste modo, é possível especular que a elevação nos marcadores de exaustão está relacionada ao processo de ativação celular e exposição ao microambiente.

Neste ponto, é importante salientar, que mesmo que não seja esperado que uma população de células como a T CD8⁺ participe do controle imunológico de bactérias extracelulares como o *H. pylori*, tais populações exercem o papel de primeira linha de resposta linfocitária, passando posteriormente a exibir o perfil de residente de memória tecidual específicas para o antígeno CagA¹⁴². Outra questão importante, é sobre nossas análises de células B e sua abundância em indivíduos infectados. Embora a literatura aponte para um resultado análogo em um contexto de úlcera péptica¹⁶⁰, nossa observação mostra que esta é uma ocorrência independente do tipo de gastrite, pois tanto indivíduos no estágio crônico ativo, quanto atrófico foram agrupados nas categorias assinaladas. Além disso, este resultado acompanha nossa linha de raciocínio sobre a formação de agregados linfóides e o desenvolvimento de folículos na mucosa gástrica infectada por *H. pylori*.

6.2 ASPECTOS NEOPLÁSICOS

Com a análise dos dados pré-neoplásicos, foi possível obter uma visão geral da influência do *H. pylori* sobre a mucosa gástrica e o sistema imune local, de modo que ocorresse uma resposta imune análoga à das estruturas linfóides terciárias, mas direcionada contra o patógeno tanto no contexto celular, quanto humoral. Não obstante, o intenso processo inflamatório tem consequências danosas ao hospedeiro, resultando nos quadros de gastrite, e por conseguinte, ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. Já é estabelecido na literatura, que os antígenos VacA e CagA, este último imunodominante¹⁵⁵, possuem amplo papel no risco de desenvolvimento do câncer gástrico¹⁶². Além disso, devido à característica imunodominante, existe toda uma maquinaria inata e adaptativa direcionada contra o *H. pylori*, ativa e estabelecida previamente ao início do processo neoplásico. Sendo assim, a questão principal neste aspecto, é como essa resposta imune já pré-existente contra o patógeno pode influenciar na resposta imune do hospedeiro contra o adenocarcinoma gástrico.

Para responder a tal questionamento, inicialmente valemo-nos de uma coorte de pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico (Figura 8). Contudo, apenas um paciente desta coorte possuía diagnóstico positivo para a infecção por *H. pylori*, o que fez com que optássemos por seguir com esta análise em um contexto de caracterização geral do comportamento do componente imunológico destes pacientes. Através das comparações entre os sítios peritumoral e tumoral, observamos a ausência de diferenças estatísticas entre os infiltrados imunes das populações celulares gerais. Porém, com a análise focada em tipos celulares específicos, fomos

capazes de observar algumas diferenças interessantes. Primeiramente, as células T CD8⁺ CD103⁺ CD39⁻ (Figura 8F), que se encontram significativamente mais elevadas no peritumor, e exibem maior frequência de PD1 no tumor (Figura 8G). Tais células exibem o perfil de CD8⁺ CD103⁺ residentes de memória tecidual (TRM) e devido à sua alta capacidade antitumoral¹⁶³, são consideradas fatores de bom prognóstico¹⁶⁴. De acordo com a literatura recente, estas células encontram-se mais elevadas no compartimento não-tumoral gástrico, sendo consideradas disfuncionais, a partir da expressão da molécula de PD1, em conjunto com a redução na capacidade de produção de granzima B e perforina. Esta funcionalidade pode ser facilmente recuperada através da implementação de agentes anti-PD1 em combinação com agonista de 4-1BB, expresso em níveis mais elevados nas células presentes no compartimento tumoral. Assim, tem-se um quadro no qual as células presentes neste compartimento, independentemente do status de infecção, encontram-se disfuncionais, possivelmente devido ao estadiamento mais avançado de alguns pacientes de nossa coorte.

Mesmo o perfil de células T CD8⁺ CD103⁺CD39⁺ (Figura 8F), considerado como reativo ao tumor em diversas neoplasias sólidas¹⁶⁵, bem como associado à melhor sobrevida¹⁶⁶, apresentou apenas uma diferença na frequência de células que expressam de PD1 no tumor (Figura 8H). Um trabalho recente¹⁶⁷, abordou o papel de células CD8⁺ CD39^{hi} com perfil de residência tecidual presentes nos tumores gástricos, demonstrando que estas codificam genes de receptores inibitórios tais como PD1, CTLA4, TIM3, GITR e TIGIT, e fatores de transcrição relacionados à exaustão de células T, como TOX e SOX. Contudo, um ponto interessante, e que não foi abordado pelos autores, é o fato das células CD8⁺ CD39^{hi} possuem elevada expressão da quimiocina CXCL13. Embora os autores não tenham discutido o papel destas células em particular, múltiplos estudos demonstraram que células T CXCL13⁺ poderiam agir como recrutadores de linfócitos B CXCR5⁺ para promover a formação e maturação de TLSs^{168,169}. Porém, apenas com a expressão isolada de PD1 verificada em nosso trabalho, não temos a capacidade de afirmar, que estamos observando células exauridas, ou recém ativadas, pois o microambiente do adenocarcinoma gástrico promove a expressão de PD1 em células T CD8⁺ independentemente da existência de disfuncionalidade celular¹⁷⁰. Como último aspecto desta análise a ser comentado, seria interessante especularmos sobre a questão do CXCL13 secretado pelas células CD8⁺ CD39^{hi}, caso fosse possível verificar algum padrão dentro das células B presentes na coorte, contudo não foi possível observar uma correlação clara.

Também, foi possível observar que as células T CD4⁺ presentes nos pacientes de nossa coorte estão relacionadas à um perfil CD4⁺ CD39⁺, que de acordo com a literatura, está ligado a um prognóstico desfavorável nos pacientes com câncer gástrico. Este subtipo celular exibe

elevadas expressões de moléculas de exaustão como PD1, CTLA4, TIGIT, GITR e NKG2A, e de fatores de transcrição relacionados à este processo como IRF4 e TOX, e por conseguinte, menos moléculas efetoras como CD127 e KLRG1, comparativamente às células CD39^{low}. Em adição à esta observação, tem-se que a elevada presença de células Tregs como as descritas em nossas análises, relacionam-se com a supressão da resposta antitumoral através da secreção de citocinas como IL10¹⁷². Além disso, níveis elevados de CD39 (CD39^{hi}) permitem que as células Tregs mantenham uma expressão sustentada do gene *FOXP3*, exibindo maiores níveis de PD-L1, CD25 e CTLA, e menores níveis de GITR e CD127 se comparadas às células CD39^{low}. Ademais, seus níveis de secreção de IL10 são mais elevados, mostrando intensa atividade supressora em ensaios de co-cultura¹⁴⁵. Assim, o aspecto principal que foi possível de ser inferido a partir dos nossos resultados, é o fato de que o microambiente gástrico exibido por nossa coorte, independente do *status* de *H. pylori*, possui elevada atividade imunossupressora e de células em exaustão.

Como não foi possível extrair informações específicas sobre a relação entre *H. pylori* e o a formação de TLSs em nossa coorte principal, nos valem de uma coorte retrospectiva de pacientes com adenocarcinoma gástrico, submetidos à cirurgia *upfront*, oriunda do A. C. Camargo Cancer Center (Figura 9). Um aspecto inerente à esta coorte, é a predominância de indivíduos em estadiamento I, com tumores pequenos/superficiais, e mesmo que tenhamos observado a presença das estruturas linfoides terciárias em uma fração destes pacientes, também observamos, em dados de transcriptômica, que mesmo que os TLSs sejam encontrados em todos os estadiamentos, sua assinatura apresenta-se mais intensa no estadiamento III (Figura 10C). Tais associações clínico-patológicas não são exclusivas para o adenocarcinoma gástrico, podendo também ser encontradas em outros tipos tumorais, como o câncer de mama¹⁷³. Mesmo assim, foi possível observar que nos indivíduos infectados havia áreas mais densas de TLS, detectadas desde os estadiamentos iniciais, especialmente na região da margem invasiva. Esta detecção torna-se sugestiva da existência de uma resposta imune contra a bactéria concomitante à resposta antitumoral (Figura 9B).

Não obstante à importância de se analisar quantitativamente a presença de TLS nos tumores gástricos, bem como a influência exercida por *H. pylori* no microambiente, uma das principais motivações para esta avaliação foi o aspecto prognóstico, pois não há consenso literário sobre a influência da bactéria sobre a sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma gástrico. Enquanto alguns autores afirmam que pacientes infectados pelo *H. pylori* possuem melhor prognóstico¹⁷⁴, outros não foram capazes de verificar associação com a sobrevida global¹⁷⁵, ou mesmo afirmam que os indivíduos infectados possuem prognóstico ruim¹⁷⁶.

Para melhor exemplificar o descrito selecionamos alguns trabalhos que se aprofundam no tema. Um estudo recente, no qual 743 pacientes não metastáticos foram incluídos, em que também se realizou uma meta-análise, não foi possível observar quaisquer associações entre a infecção por *H. pylori* e características demográficas, ou patológicas como estadiamento TNM, ou mesmo quimioterapia adjuvante. Mesmo a análise de sobrevida não foi capaz de demonstrar, além de uma leve tendência à melhor sobrevida dos indivíduos infectados, uma relação clara. Quando analisada a meta-análise, na qual a própria corte foi incluída (perfazendo assim um total de 57 estudos), foi possível observar a melhor predição de sobrevida global e livre de progressão para os pacientes positivos para *H. pylori*. Contudo um importante questionamento feito pelos autores diz respeito aos indivíduos erroneamente classificados como negativos no momento da cirurgia, pois mesmo com a erradicação da infecção, as lesões pré-neoplásicas podem continuar em progressão, enviesando assim as análises.

Outro panorama diferente, foi observado por Zhao et al. (2024), onde avaliou-se o efeito do tratamento anti-*H. pylori* pós gastrectomia radical em uma coorte de 1293 pacientes⁸⁰. Neste estudo, foi demonstrado que os indivíduos com estadiamento TNM II e III apresentaram maiores benefícios quando submetidos à antibioticoterapia, o que foi observado tanto em termos de sobrevida global, quanto livre de progressão, sugestivo de que a combinação de quimioterapia adjuvante e terapia anti-*H. pylori* possa ser clinicamente benéfica. Porém, esta questão muda de aspecto quando o fator imunoterapia é adicionado, como demonstrado por um trabalho⁸¹ no qual 77 pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico estadiamento TNM IV, portadores ou não de *H. pylori*, foram submetidos à imunoterapia anti-PD1 com os seguintes agentes: nivolumabe, ou pembrolizumabe, ou camrelizumabe/toripalimabe/tislelizumabe. Quando se avaliou a efetividade da terapia imunológica, observou-se que os indivíduos infectados exibiram maior risco de não resposta clínica à terapia, em comparação com aqueles não infectados. O mesmo evento, foi observado em relação à performance de sobrevida e sobrevida livre de progressão, indicando que a infecção por *H. pylori*, no contexto da imunoterapia, é um fator de prognóstico ruim. Outro estudo⁸², com 215 indivíduos, em estadiamento TNM IV, também mostrou resultados semelhantes, nos quais o *H. pylori* foi considerado fator de prognóstico independente para sobrevida global e livre de progressão, onde em ambos os casos, os pacientes infectados apresentaram piores performances. Nos dois trabalhos brevemente discutidos, a questão da influência da microbiota não pode ser descartada, pois de acordo com dados de metagenômica, o *H. pylori* causa disbiose no estômago, tornando-se a bactéria predominante¹⁷⁷. Ademais, já é conhecida a influência da microbiota sobre o desfecho da imunoterapia¹⁷⁸, sendo deste modo,

possível especular que além dos efeitos sobre as células do sistema imune, o *H. pylori* possa, através do processo de disbiose, influenciar nesta modalidade terapêutica.

Da mesma maneira, deve ser considerado como aspecto prognóstico a presença de estruturas linfoides terciárias no microambiente tumoral. Os primeiros trabalhos a analisar este aspecto tanto em melanoma¹¹⁰, quanto em sarcoma¹⁰⁹, observaram que em ambos os contextos estas estruturas estariam ligadas à um microambiente tumoral mais quente, nos quais quanto maiores suas densidades ou escores, melhores indicadores de um prognóstico favorável ao pacientes seriam, com notável benefício para a imunoterapia. Em câncer gástrico, também é verificado o prognóstico positivo de pacientes que apresentam maiores densidades de TLS em termos de sobrevida global¹⁷⁹, bem como o valor prognóstico positivo da associação entre densidade de TLS e grau de infiltração celular no tumor, especialmente de células CD8⁺ e CD20⁺.

Porém uma questão em aberto, é o quanto a formação dos TLSs sofre influência no contexto prognóstico por aspectos diretamente ligados à microrganismos, especialmente do *H. pylori*. No presente trabalho, não foi possível verificar, ao menos na coorte retrospectiva, alguma influência significativa provocada pelo *H. pylori*, ou *status* de TLS, com isso acreditamos que este evento é devido, principalmente, ao predomínio do estadiamento I nos pacientes analisados. Contudo, o ocorrido não foi impeditivo para fosse observado o aumento nas densidades de TLS na margem invasiva, em detrimento do centro do tumor nos indivíduos infectados. Deste modo, nos valem de uma análise mais abrangente em uma coorte pública (Figura 10), com a qual foi possível traçar algumas conclusões que podem nortear a conduta clínica, sendo a mais importante delas relativa à associação do *status* de TLS com a infecção por *H. pylori*. Em nossos resultados, foi observado que pacientes com TLS alto possuem elevada associação com *H. pylori*, sendo assim, foi especulado que mesmo na existência de uma assinatura de TLS, que existe independentemente do *status* de infecção, a bactéria possui capacidade de promover níveis de escores mais elevados (Figura 10F).

Outro aspecto no qual, para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a explorar, é a diferença observada na sobrevida global quando analisados separadamente os indivíduos *H. pylori* positivos e negativos, utilizando como critério comparativo os escore de TLS. Neste trabalho, observamos que nos indivíduos infectados por *H. pylori*, o *status* elevado de TLS é um indicativo de uma pior sobrevida global, quando comparados aos indivíduos com *status* menores de TLS (Figura 10I). Quando realizadas as análises de expressão diferencial desses indivíduos, observou-se a presença de um padrão de resposta imunológica mais elevada nos indivíduos *H. pylori* positivos. Posteriormente, verificamos que este padrão de resposta, nos

pacientes infectados está ligado ao aspecto antimicrobiano, com intensa atividade humoral e resposta à gram-negativos (Figura 11E). Esta característica, já havia sido observada em nossos resultados relativos aos aspectos pré-neoplásicos, nos quais uma resposta a elementos bacterianos estava presente (Figura 6G). Assim, definimos que no aspecto neoplásico, o *H. pylori* também exerce influência, promovendo uma intensificação dos sinais relativos à estruturas linfoides terciárias e à resposta antimicrobiana, que em conjunto, se relacionam à uma performance prognóstica pobre.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados de nosso trabalho, podemos concluir que, o *Helicobacter pylori* possui capacidade de influenciar na formação de estruturas linfoides terciárias, desde o início de sua relação com o hospedeiro, e que a existência dessas estruturas está ligada a um desfecho desfavorável ao paciente. Tal desfecho deve-se à concomitância de uma resposta imune anti-*Helicobacter pylori* concomitante à resposta anti-tumoral.

8 REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
2. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2016 Jan;25(1):16–27. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
3. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus JA, Maciejewski R, Polkowski WP. Cancer Management and Research Dovepress Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2018;10:10–239. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S149619>
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May 4;71(3):209–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>
5. Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, Ferlay J, Andersson TML, Myklebust TÅ, et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995–2014 (ICBP SURVMARK-2): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2019;20(11):1493–505.
6. Lu L, Mullins CS, Schafmayer C, Zeißig S, Linnebacher M. A global assessment of recent trends in gastrointestinal cancer and lifestyle-associated risk factors. *Cancer Commun*. 2021;41(11):1137–51.
7. Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer B. Estimativa 2023: Incidência de

- Câncer no Brasil [Internet]. 2022. 2022. 162 p. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>
8. McDaniel JT, Nuhu K, Ruiz J, Alorbi G. Social determinants of cancer incidence and mortality around the world: an ecological study. *Glob Health Promot* [Internet]. 2019 Mar 16;26(1):41–9. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1757975916686913>
 9. Amorim CA. Ecological study of gastric cancer in Brazil: Geographic and time trend analysis. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(17):5036. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i17/5036.htm>
 10. Yang WJ, Zhao HP, Yu Y, Wang JH, Guo L, Liu JY, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2023 Apr 28;29(16):2452–68. Available from: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v29/i16/2452.htm>
 11. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 May;142(6):1264-1273.e1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650851200220X>
 12. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol* [Internet]. 2004 Nov;78(21):11451–60. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004>
 13. Engels EA, Biggar RJ, Hall HI, Cross H, Crutchfield A, Finch JL, et al. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *Int J Cancer* [Internet]. 2008 Jul 24;123(1):187–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.23487>

14. Kovalchuk O, Walz P, Kovalchuk I. Does bacterial infection cause genome instability and cancer in the host cell? *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2014 Mar;761:1–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510714000050>
15. Brady G, MacArthur GJ, Farrell PJ. Epstein–Barr virus and Burkitt lymphoma. *Postgrad Med J* [Internet]. 2008 Jul 1;84(993):372–7. Available from: <https://academic.oup.com/pmj/article/84/993/372/7026381>
16. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov;68(6):394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
17. Farinha P, Gascoyne RD. *Helicobacter pylori* and MALT lymphoma. *Gastroenterology*. 2005;128(6):1579–605.
18. 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;89(8-S):72–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30561421>
19. Teixeira TF, De Souza IKF, Rocha RDR. *Helicobacter pylori*: infecção, diagnóstico laboratorial e tratamento. *Percorso Acadêmico* [Internet]. 2017 Jun 30;6(12):481. Available from: <http://periodicos.pucminas.br/index.php/percursoacademico/article/view/P.2236-0603.2016v6n12p481>
20. Shirani M, Pakzad R, Haddadi MH, Akrami S, Asadi A, Kazemian H, et al. The global prevalence of gastric cancer in *Helicobacter pylori*-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2023;23(1):1–30. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08504-5>

21. Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med* [Internet]. 2008;47(12):1077–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552463>
22. Lee JH, Kim SH, Han SH, An JS, Lee ES, Kim YS. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: A meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(3):354–65.
23. Zhao J, Jin H, Cheung KF, Tong JHM, Zhang S, Go MYY, et al. Zinc finger E-box binding factor 1 plays a central role in regulating Epstein-Barr virus (EBV) latent-lytic switch and acts as a therapeutic target in EBV-associated gastric cancer. *Cancer* [Internet]. 2012 Feb 15;118(4):924–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.26184>
24. Sun K, Jia K, Lv H, Wang SQ, Wu Y, Lei H, et al. EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Oncol* [Internet]. 2020;10:583463. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33381453>
25. Moy KA, Fan Y, Wang R, Gao YT, Yu MC, Yuan JM. Alcohol and tobacco use in relation to gastric cancer: A prospective study of men in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(9):2287–97.
26. Deng W, Jin L, Zhuo H, Vasiliou V, Zhang Y. Alcohol consumption and risk of stomach cancer: A meta-analysis. *Chem Biol Interact*. 2021;336(November 2020):1–9.
27. Nomura AMY, Wilkens LR, Henderson BE, Epplein M, Kolonel LN. The association of cigarette smoking with gastric cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2012 Jan 29;23(1):51–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-011-9854-0>
28. Kneller RW, You WC, Chang YS, Liu WD, Zhang L, Zhao L, et al. Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *J Natl Cancer Inst*

- [Internet]. 1992 Aug 19;84(16):1261–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1640486>
29. SARBIA M. Pathology of upper gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* [Internet]. 2004 Aug;31(4):465–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775404002416>
 30. LAURÉN P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. *Acta Pathol Microbiol Scand* [Internet]. 1965 Sep 30;64(1):31–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.1965.64.1.31>
 31. Ma J, Shen H, Kapesa L, Zeng S. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review). *Oncol Lett*. 2016;11(5):2959–64.
 32. Polkowski W, Van Sandick JW, Offerhaus GJA, Ten Kate FJW, Mulder J, Obertop H, et al. Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol*. 1999;6(3):290–7.
 33. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis*. 2012;13(1):2–9.
 34. Pinheiro H, Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. Hereditary diffuse gastric cancer – Pathophysiology and clinical management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2014 Dec;28(6):1055–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691814001504>
 35. Inoue M. Changing epidemiology of *Helicobacter pylori* in Japan. *Gastric Cancer*. 2017;20(s1):3–7.
 36. Petrelli F, Berenato R, Turati L, Mennitto A, Steccanella F, Caporale M, et al. Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Oncol*. 2017;8(1):148–63.

37. Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2016 Nov 26;388(10060):2654–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156933>
38. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* [Internet]. 2014;513(7517):202–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13480>
39. Wang Q, Liu G, Hu C. Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterol Res*. 2019;12(6):275–82.
40. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med* [Internet]. 2015 May;21(5):449–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25894828>
41. Shorrock CJ, Rees WDW. Overview of gastroduodenal mucosal protection. *Am J Med* [Internet]. 1988 Feb;84(2):25–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934388902513>
42. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, et al. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Aug 25;106(34):14321–6. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0903438106>
43. Sycuro LK, Pincus Z, Gutierrez KD, Biboy J, Stern CA, Vollmer W, et al. Peptidoglycan Crosslinking Relaxation Promotes *Helicobacter pylori*'s Helical Shape and Stomach Colonization. *Cell* [Internet]. 2010 May;141(5):822–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741000365X>
44. Williams SM, Chen YT, Andermann TM, Carter JE, McGee DJ, Ottemann KM. *Helicobacter pylori* Chemotaxis Modulates Inflammation and Bacterium-Gastric

- Epithelium Interactions in Infected Mice. *Infect Immun* [Internet]. 2007 Aug;75(8):3747–57. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00082-07>
45. Fagoonee S, Pellicano R. *Helicobacter pylori*: molecular basis for colonization and survival in gastric environment and resistance to antibiotics. A short review. *Infect Dis (Auckl)* [Internet]. 2019;51(6):399–408. Available from: <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1588472>
 46. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. 2009;22(2):240–73.
 47. Ahluwalia B, Magnusson MK, Öhman L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2017 Nov;52(11):1185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28697651>
 48. Ieni A, Barresi V, Rigoli L, Fedele F, Tuccari G, Caruso R. Morphological and Cellular Features of Innate Immune Reaction in *Helicobacter pylori* Gastritis: A Brief Review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jan 15;17(1):109. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/109>
 49. Wang G, Maier SE, Lo LF, Maier G, Dosi S, Maier RJ. Peptidoglycan Deacetylation in *Helicobacter pylori* Contributes to Bacterial Survival by Mitigating Host Immune Responses. *Infect Immun* [Internet]. 2010 Nov;78(11):4660–6. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00307-10>
 50. Yao Y, Li G, Wu J, Zhang X, Wang J. Inflammatory response of macrophages cultured with *Helicobacter pylori* strains was regulated by miR-155. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2015;8(5):4545–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26191144>

51. Zhao CN, Xiao LL, Zhang Y. Effects of *Helicobacter pylori* Infection on the Prognosis of Chronic Atrophic Gastritis by Inducing the Macrophage Polarization. *Gastroenterol Res* [Internet]. 2023 Aug;16(4):226–33. Available from: <http://www.gastrores.org/index.php/Gastrores/article/view/1636>
52. Rugge M, Savarino E, Sbaraglia M, Bricca L, Malfertheiner P. Gastritis: The clinico-pathological spectrum. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2021 Oct;53(10):1237–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33785282>
53. Beceiro S, Radin JN, Chaturvedi R, Piazuolo MB, Horvarth DJ, Cortado H, et al. TRPM2 ion channels regulate macrophage polarization and gastric inflammation during *Helicobacter pylori* infection. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2017 Mar;10(2):493–507. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1933021922006614>
54. Bimczok D, Grams JM, Stahl RD, Waites KB, Smythies LE, Smith PD. Stromal regulation of human gastric dendritic cells restricts the Th1 response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 Sep;141(3):929–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699795>
55. Oertli M, Sundquist M, Hitzler I, Engler DB, Arnold IC, Reuter S, et al. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection. *J Clin Invest* [Internet]. 2012 Mar;122(3):1082–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22307326>
56. Zhuang Y, Cheng P, Liu X fei, Peng L sheng, Li B sheng, Wang T ting, et al. A pro-inflammatory role for Th22 cells in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Gut* [Internet]. 2015 Sep;64(9):1368–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25134787>
57. Yamamoto K, Nishiumi S, Yang L, Klimatcheva E, Pandina T, Takahashi S, et al. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by

- Helicobacter infection. *Mucosal Immunol.* 2014;7(5).
58. Hansson M, Sundquist M, Hering S, Lundin BS, Hermansson M, Quiding-Järbrink M. DC-LAMP + Dendritic Cells Are Recruited to Gastric Lymphoid Follicles in Helicobacter pylori-Infected Individuals. Blanke SR, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2013 Oct;81(10):3684–92. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00801-13>
 59. Arshad U, Sarkar S, Alipour Talesh G, Sutton P. A lack of role for antibodies in regulating Helicobacter pylori colonization and associated gastritis. *Helicobacter* [Internet]. 2020 Apr;25(2):e12681. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32088936>
 60. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, Weltzin R, et al. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against Helicobacter pylori infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* [Internet]. 1998 Dec 21;188(12):2277–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858514>
 61. D’Elios MM, Czinn SJ. Immunity, inflammation, and vaccines for Helicobacter pylori. *Helicobacter* [Internet]. 2014 Sep;19 Suppl 1:19–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25167941>
 62. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 Jun;2(6):457–66. Available from: <https://www.nature.com/articles/35073084>
 63. McClain M, Beckett A, Cover T. Helicobacter pylori Vacuolating Toxin and Gastric Cancer. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2017 Oct 12;9(10):316. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/9/10/316>
 64. Chen D, Wu L, Liu X, Wang Q, Gui S, Bao L, et al. Helicobacter pylori CagA mediated

- mitophagy to attenuate the NLRP3 inflammasome activation and enhance the survival of infected cells. *Sci Rep* [Internet]. 2024 Sep 17;14(1):21648. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-72534-5>
65. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 α and IL-1 β Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2011 Nov 1;187(9):4835–43. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/187/9/4835/39531/IL-1-and-IL-1-Recruit-Different-Myeloid-Cells-and>
 66. Tran LS, Ying L, D’Costa K, Wray-McCann G, Kerr G, Le L, et al. NOD1 mediates interleukin-18 processing in epithelial cells responding to *Helicobacter pylori* infection in mice. *Nat Commun*. 2023;14(1).
 67. Capurro MI, Greenfield LK, Prashar A, Xia S, Abdullah M, Wong H, et al. VacA generates a protective intracellular reservoir for *Helicobacter pylori* that is eliminated by activation of the lysosomal calcium channel TRPML1. *Nat Microbiol* [Internet]. 2019 May 20;4(8):1411–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-019-0441-6>
 68. Sijmons D, Guy AJ, Walduck AK, Ramsland PA. *Helicobacter pylori* and the Role of Lipopolysaccharide Variation in Innate Immune Evasion. *Front Immunol* [Internet]. 2022 May 13;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.868225/full>
 69. Talebi Bezmin Abadi A. Strategies used by *helicobacter pylori* to establish persistent infection. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2017;23(16):2870. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i16/2870.htm>
 70. Fan J, Zhu J, Xu H. Strategies of *Helicobacter pylori* in evading host innate and adaptive immunity: insights and prospects for therapeutic targeting. *Front Cell Infect Microbiol*

- [Internet]. 2024;14:1342913. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38469348>
71. Lee DS, Moss SF. Targeting *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2007 Jun;11(6):757–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504014>
 72. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* [Internet]. 1997 Mar;40(3):297–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135515>
 73. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* [Internet]. 2008 Jan;134(1):306–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166359>
 74. Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter Pylori* Virulence and Cancer Pathogenesis. *Futur Oncol* [Internet]. 2014 Jun 23;10(8):1487–500. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fon.14.29>
 75. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Jul;115(1):58–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649459>
 76. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1999 Jul;37(7):2274–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364597>
 77. Sugimoto M, Zali MR, Yamaoka Y. The association of *vacA* genotypes and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases in the Middle East. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2009 Oct;28(10):1227–36. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19551413>
78. Jia Z, Zheng M, Jiang J, Cao D, Wu Y, Zhang Y, et al. Positive *H. pylori* status predicts better prognosis of non-cardiac gastric cancer patients: results from cohort study and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2022;22(1):1–15.
 79. Jung DH, Lee YC, Kim JH, Chung H, Park JC, Shin SK, et al. Postoperative *Helicobacter pylori* Infection as a Prognostic Factor for Gastric Cancer Patients after Curative Resection. *Gut Liver* [Internet]. 2017 Sep 15;11(5):635–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28395509>
 80. Zhao Z, Zhang R, Chen G, Nie M, Zhang F, Chen X, et al. Anti- *Helicobacter pylori* Treatment in Patients With Gastric Cancer After Radical Gastrectomy. *JAMA Netw Open*. 2024;7(3):E243812.
 81. Che H, Xiong Q, Ma J, Chen S, Wu H, Xu H, et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with survival outcomes in advanced gastric cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *BMC Cancer*. 2022;22(1):1–8.
 82. Magahis PT, Maron SB, Cowzer D, King S, Schattner M, Janjigian Y, et al. Impact of *Helicobacter pylori* infection status on outcomes among patients with advanced gastric cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *J Immunother cancer* [Internet]. 2023 Oct;11(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37899129>
 83. Tosi P, Filipe MI, Luzi P, Miracco C, Santopietro R, Lio R, et al. Gastric intestinal metaplasia type III cases are classified as low-grade dysplasia on the basis of morphometry. *J Pathol* [Internet]. 1993 Jan;169(1):73–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8433217>
 84. Tava F, Luinetti O, Ghigna MR, Alvisi C, Perego M, Trespi E, et al. Type or extension of intestinal metaplasia and immature/atypical “indefinite-for-dysplasia” lesions as predictors of gastric neoplasia. *Hum Pathol* [Internet]. 2006 Nov;37(11):1489–97.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949645>
85. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* [Internet]. 2007 Aug;133(2):659–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508507011675>
 86. Hwang Y -J., Kim N, Lee HS, Lee JB, Choi YJ, Yoon H, et al. Reversibility of atrophic gastritis and intestinal metaplasia after *Helicobacter pylori* eradication - a prospective study for up to 10 years. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 Feb;47(3):380–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apt.14424>
 87. Zhang D, He W, Wu C, Tan Y, He Y, Xu B, et al. Scoring System for Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Its Prognostic Value for Gastric Cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10:71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30761139>
 88. Zheng X, Song X, Shao Y, Xu B, Chen L, Zhou Q, et al. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 22;8(34):57386–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28915679>
 89. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2017 Dec 25;14(12):717–34. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.101>
 90. Naing A, Papadopoulos KP, Autio KA, Ott PA, Patel MR, Wong DJ, et al. Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol*. 2016 Oct;34(29):3562–9.
 91. Dai S, Zeng H, Liu Z, Jin K, Jiang W, Wang Z, et al. Intratumoral CXCL13 + CD8 + T cell infiltration determines poor clinical outcomes and immunoevasive contexture in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2021 Feb

- 15;9(2):e001823. Available from: <https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2020-001823>
92. Khan O, Giles JR, McDonald S, Manne S, Ngiew SF, Patel KP, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8⁺ T cell exhaustion. *Nature* [Internet]. 2019 Jul;571(7764):211–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31207603>
 93. Yoon J, Kim TY, Oh DY. Recent Progress in Immunotherapy for Gastric Cancer. *J Gastric Cancer* [Internet]. 2023;23(1):207. Available from: <https://jgc-online.org/DOIx.php?id=10.5230/jgc.2023.23.e10>
 94. Böger C, Behrens HM, Krüger S, Röcken C. The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy? *Oncoimmunology* [Internet]. 2017 Apr 3;6(4):e1293215. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28507801>
 95. Guha P, Heatherton KR, O’Connell KP, Alexander IS, Katz SC. Assessing the Future of Solid Tumor Immunotherapy. *Biomedicines* [Internet]. 2022 Mar 11;10(3):655. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/3/655>
 96. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov* [Internet]. 2018 Sep;8(9):1069–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30115704>
 97. Yamaguchi H, Hsu JM, Yang WH, Hung MC. Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2022 May 7;19(5):287–305. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41571-022-00601-9>
 98. Yang ZZ, Kim HJ, Wu H, Jalali S, Tang X, Krull JE, et al. TIGIT Expression Is Associated with T-cell Suppression and Exhaustion and Predicts Clinical Outcome and

- Anti-PD-1 Response in Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Oct 1;26(19):5217–31. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-20-0558>
99. Tang W, Chen J, Ji T, Cong X. TIGIT, a novel immune checkpoint therapy for melanoma. *Cell Death Dis* [Internet]. 2023 Jul 26;14(7):466. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-023-05961-3>
 100. Schlößer HA, Drebbler U, Kloth M, Thelen M, Rothschild SI, Haase S, et al. Immune checkpoints programmed death 1 ligand 1 and cytotoxic T lymphocyte associated molecule 4 in gastric adenocarcinoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 May;5(5):e1100789. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27467911>
 101. Naghavi-Alhosseini M, Tehrani M, Ajami A, Rafiei A, Taghvaei T, Vahedi-Larijani L, et al. Tim-3 Up-regulation in Patients with Gastric Cancer and Peptic Ulcer Disease. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2017;18(3):765–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28441784>
 102. Franco F, Jaccard A, Romero P, Yu YR, Ho PC. Metabolic and epigenetic regulation of T-cell exhaustion. *Nat Metab* [Internet]. 2020 Sep 21;2(10):1001–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42255-020-00280-9>
 103. Huang C, Li N, Li Z, Chang A, Chen Y, Zhao T, et al. Tumour-derived Interleukin 35 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell extravasation and metastasis by inducing ICAM1 expression. *Nat Commun*. 2017;
 104. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Mar 26;6(4):6692. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4389235>
 105. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in

- infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):447–62.
106. Stolte M, Bayerdorffer E, Morgner A, Alpen B, Wundisch T, Thiede C, et al. Helicobacter and gastric MALT lymphoma. *Gut* [Internet]. 2002 May 1;50(Supplement 3):iii19–24. Available from: https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gut.50.suppl_3.iii19
 107. Buckley CD, Barone F, Nayar S, Bénézech C, Caamaño J. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:715–45.
 108. Teillaud JL, Dieu-Nosjean MC. Tertiary Lymphoid Structures: An Anti-tumor School for Adaptive Immune Cells and an Antibody Factory to Fight Cancer? *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jul 21;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00830/full>
 109. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TWW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*. 2020;577(7791):556–60.
 110. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020;577(7791):561–5.
 111. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(7):832–44.
 112. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Sep 20;26(27):4410–7. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2007.15.0284>

113. Lee HJ, Park IA, Song IH, Shin SJ, Kim JY, Yu JH, et al. Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2016 May;69(5):422–30. Available from: <http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2015-203089>
114. Liu X, Tsang JYS, Hlaing T, Hu J, Ni Y, Chan SK, et al. Distinct Tertiary Lymphoid Structure Associations and Their Prognostic Relevance in HER2 Positive and Negative Breast Cancers. *Oncologist* [Internet]. 2017 Nov 12;22(11):1316–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/theoncologist.2017-0029>
115. Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, et al. Unique Ectopic Lymph Node-Like Structures Present in Human Primary Colorectal Carcinoma Are Identified by Immune Gene Array Profiling. *Am J Pathol* [Internet]. 2011 Jul;179(1):37–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944011003208>
116. Väyrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, Mäkelä J, Herzig KH, Karttunen TJ, et al. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer* [Internet]. 2014 May 1;134(9):2126–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.28533>
117. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Kanai Y, Kosuge T, Shimada K. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2015 May 5;112(11):1782–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc2015145>
118. Castino GF, Cortese N, Capretti G, Serio S, Di Caro G, Mineri R, et al. Spatial distribution of B cells predicts prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016;5(4):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1085147>
119. He W, Zhang D, Liu H, Chen T, Xie J, Peng L, et al. The High Level of Tertiary

- Lymphoid Structure Is Correlated With Superior Survival in Patients With Advanced Gastric Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2020;10:980. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32733793>
120. Hennequin A, Derangère V, Boidot R, Apetoh L, Vincent J, Ory D, et al. Tumor infiltration by Tbet⁺ effector T cells and CD20⁺ B cells is associated with survival in gastric cancer patients. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 Feb;5(2):e1054598. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27057426>
 121. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, et al. CD20⁺ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27 - memory phenotype and together with CD8⁺ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3281–92.
 122. Shi JY, Gao Q, Wang ZC, Zhou J, Wang XY, Min ZH, et al. Margin-Infiltrating CD20⁺ B Cells Display an Atypical Memory Phenotype and Correlate with Favorable Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Nov 1;19(21):5994–6005. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-12-3497>
 123. Bruno TC, Ebner PJ, Moore BL, Squalls OG, Waugh KA, Eruslanov EB, et al. Antigen-Presenting Intratumoral B Cells Affect CD4⁺ TIL Phenotypes in Non–Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2017 Oct;5(10):898–907. Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2326-6066.CIR-17-0075>
 124. Rossetti RAM, Lorenzi NPC, Yokochi K, Rosa MBS de F, Benevides L, Margarido PFR, et al. B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses. Kato T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jul 5;13(7):e0199034. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0199034>

125. Zhu W, Germain C, Liu Z, Sebastian Y, Devi P, Knockaert S, et al. A high density of tertiary lymphoid structure B cells in lung tumors is associated with increased CD4 + T cell receptor repertoire clonality. *Oncoimmunology* [Internet]. 2015 Dec 2;4(12):e1051922. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2015.1051922>
126. Germain C, Devi-Marulkar P, Knockaert S, Biton J, Kaplon H, Letaïef L, et al. Tertiary Lymphoid Structure-B Cells Narrow Regulatory T Cells Impact in Lung Cancer Patients. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Mar 8;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.626776/full>
127. Gnjatich S, Atanackovic D, Matsuo M, Jäger E, Lee SY, Valmori D, et al. Cross-Presentation of HLA Class I Epitopes from Exogenous NY-ESO-1 Polypeptides by Nonprofessional APCs. *J Immunol* [Internet]. 2003 Feb 1;170(3):1191–6. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.170.3.1191>
128. Knief J, Reddemann K, Petrova E, Herhahn T, Wellner U, Thorns C. High Density of Tumor-infiltrating B-Lymphocytes and Plasma Cells Signifies Prolonged Overall Survival in Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. *Anticancer Res* [Internet]. 2016;36(10):5339–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27798897>
129. Yang M, Lu J, Zhang G, Wang Y, He M, Xu Q, et al. CXCL13 shapes immunoactive tumor microenvironment and enhances the efficacy of PD-1 checkpoint blockade in high-grade serous ovarian cancer. *J Immunother Cancer*. 2021;9(1).
130. Kinker GS, Vitiello GAF, Diniz AB, Cabral-Piccin MP, Pereira PHB, Carvalho MLR, et al. Mature tertiary lymphoid structures are key niches of tumour-specific immune responses in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Gut*. 2023;72(10):1927–41.
131. Peng J, Sun BF, Chen CY, Zhou JY, Chen YS, Chen H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal

- adenocarcinoma. *Cell Res.* 2019 Sep;29(9):725–38.
132. Guillaumet-Adkins A, Rodríguez-Esteban G, Mereu E, Mendez-Lago M, Jaitin DA, Villanueva A, et al. Single-cell transcriptome conservation in cryopreserved cells and tissues. *Genome Biol.* 2017 Dec;18(1):45.
 133. Hermansen JU, Tjønnfjord GE, Munthe LA, Taskén K, Skånland SS. Cryopreservation of primary B cells minimally influences their signaling responses. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1):17651.
 134. Lemieux J, Jobin C, Simard C, Néron S. A global look into human T cell subsets before and after cryopreservation using multiparametric flow cytometry and two-dimensional visualization analysis. *J Immunol Methods.* 2016 Jul;434:73–82.
 135. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol* [Internet]. 2016;17(1):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-1070-5>
 136. Harrer C, Otto F, Radlberger RF, Moser T, Pilz G, Wipfler P, et al. The CXCL13 / CXCR5 Immune Axis in Health and Neuroinflammation. 2022;9–13.
 137. Young C, Brink R. The unique biology of germinal center B cells. *Immunity* [Internet]. 2016;54(8):1652–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.015>
 138. Kapoor T, Corrado M, Pearce EL, Pearce EJ, Grosschedl R. MZB1 enables efficient interferon α secretion in stimulated plasmacytoid dendritic cells. *Sci Rep* [Internet]. 2020;1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78293-3>
 139. Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, González-Lahera A, Lavín JL, Vila-Casadesús M, Quílez ME, et al. Cross-sectional study of human coding- and non-coding RNAs in progressive stages of *Helicobacter pylori* infection. *Sci Data.* 2020;7(1):1–9.
 140. Fennen M, Weinhage T, Kracke V, Intemann J, Varga G, Wehmeyer C, et al. A

- myostatin - CCL20 – CCR6 axis regulates Th17 cell recruitment to inflamed joints in experimental arthritis. *Sci Rep* [Internet]. 2021;1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93599-6>
141. Van Den Bulk J, Van Der Ploeg M, Ijsselsteijn ME, Ruano D, Van Der Breggen R, Duhen R, et al. CD103 and CD39 coexpression identifies neoantigen-specific cytotoxic T cells in colorectal cancers with low mutation burden. *J Immunother Cancer*. 2023;11(2):1–12.
 142. Koch MRA, Gong R, Friedrich V, Engelsberger V, Kretschmer L, Wanisch A, et al. CagA-specific Gastric CD8⁺ Tissue-Resident T Cells Control *Helicobacter pylori* During the Early Infection Phase. *Gastroenterology* [Internet]. 2023;164(4):550–66. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.12.016>
 143. He X, Xu C. PD-1 : A Driver or Passenger of T Cell Exhaustion ? *Mol Cell* [Internet]. 2020;77(5):930–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.013>
 144. Kortekaas KE, Santegoets SJ, Sturm G, Ehsan I, van Egmond SL, Finotello F, et al. CD39 Identifies the CD4⁺ Tumor-Specific T-cell Population in Human Cancer. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2020 Oct 1;8(10):1311–21. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerimmunolres/article/8/10/1311/466821/CD39-Identifies-the-CD4-Tumor-Specific-T-cell>
 145. Gu J, Ni X, Pan X, Lu H, Lu Y, Zhao J, et al. Human CD39^{hi} regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. 2016;14(6):521–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2016.30>
 146. Namikawa K, Tanaka N, Ota Y, Takamatsu M, Kosugi M, Tokai Y. Genomic features of *Helicobacter pylori* -naïve diffuse-type gastric cancer. 2022;(November):300–11.
 147. Kim J, Park C, Kim KH, Kim EH, Kim H, Woo JK, et al. Single-cell analysis of gastric pre-cancerous and cancer lesions reveals cell lineage diversity and intratumoral

heterogeneity.

148. Takahashi-Kanemitsu A, Knight CT, Hatakeyama M. Molecular anatomy and pathogenic actions of *Helicobacter pylori* CagA that underpin gastric carcinogenesis. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020;17(1):50–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-019-0339-5>
149. Meliț LE, Mărginean CO, Mărginean CD, Mărginean MO. The Relationship between Toll-like Receptors and *Helicobacter pylori* -Related Gastropathies: Still a Controversial Topic. *J Immunol Res* [Internet]. 2019 Feb 4;2019:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2019/8197048/>
150. Wang P, Gu Y, Yang J, Qiu J, Xu Y, Xu Z, et al. The prognostic value of NLRP1/NLRP3 and its relationship with immune infiltration in human gastric cancer. *Aging (Albany NY)*. 2022;14(24):9980–10008.
151. Carpentieri DF, Wenner W, Liquornik K, Ruchelli E. Significance of lymphoid follicles and aggregates in gastric mucosa of children. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2000;3(2):177–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679037>
152. Zhang L, Smyrk TC, Young WF, Stratakis CA, Carney JA. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2010 Jan;34(1):53–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935059>
153. Chakhachiro Z, Saroufim M, Safadi B, Attieh M, Assaf N, Shamseddine G, et al. Plasma cells and lymphoid aggregates in sleeve gastrectomy specimens. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2020 Feb;99(6):e18926. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/MD.00000000000018926>
154. Winter S, Loddenkemper C, Aebischer A, Räbel K, Hoffmann K, Meyer TF, et al. The

- chemokine receptor CXCR5 is pivotal for ectopic mucosa-associated lymphoid tissue neogenesis in chronic *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *J Mol Med*. 2010;88(11):1169–80.
155. Park JY, Forman D, Waskito LA, Yamaoka Y, Crabtree JE. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2018 Apr 19;10(4):163. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/10/4/163>
 156. Hu Q, Zhang Y, Zhang X, Fu K. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori* infection: a review of current diagnosis and management. *Biomark Res* [Internet]. 2016 Dec 27;4(1):15. Available from: <http://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-016-0068-1>
 157. Ito N, Tsujimoto H, Ueno H, Xie Q, Shinomiya N. *Helicobacter pylori*-mediated immunity and signaling transduction in gastric cancer. *J Clin Med*. 2020;9(11):1–11.
 158. Kuo SH, Yeh KH, Wu MS, Lin CW, Wei MF, Liou JM, et al. First-line antibiotic therapy in *Helicobacter pylori*-negative low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Oct 30;7(1):14333. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14102-8>
 159. 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. *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Mar;114(3):482–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508598705311>
 160. Yang Y, Kohler ME, Chien CD, Sauter CT, Jacoby E, Yan C, et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. *Sci Transl Med*. 2017;9(417):1–13.
 161. Fan XJ, Chua A, Shahi CN, McDevitt J, Keeling PW, Kelleher D. Gastric T lymphocyte

- responses to *Helicobacter pylori* in patients with *H pylori* colonisation. *Gut* [Internet]. 1994 Oct 1;35(10):1379–84. Available from: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gut.35.10.1379>
162. Matos JI, de Sousa HAC, Marcos-Pinto R, Dinis-Ribeiro M. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 Dec;25(12):1431–41. Available from: <https://journals.lww.com/00042737-201312000-00009>
 163. Mami-Chouaib F, Blanc C, Corgnac S, Hans S, Malenica I, Granier C, et al. Resident memory T cells, critical components in tumor immunology. *J Immunother cancer* [Internet]. 2018 Sep 4;6(1):87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30180905>
 164. Hewavisenti R, Ferguson A, Wang K, Jones D, Gebhardt T, Edwards J, et al. CD103+ tumor-resident CD8+ T cell numbers underlie improved patient survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Immunother cancer* [Internet]. 2020 Jun;8(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32527931>
 165. Duhén T, Duhén R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Jul 13;9(1):2724. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30006565>
 166. Losurdo A, Scirgolea C, Alvisi G, Brummelman J, Errico V, Di Tommaso L, et al. Single-cell profiling defines the prognostic benefit of CD39^{high} tissue resident memory CD8+ T cells in luminal-like breast cancer. *Commun Biol* [Internet]. 2021 Sep 22;4(1):1117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34552178>
 167. Shen Y, Qiu Y, Duan Z quan, Li Y xian, Wang Y, Zhang Y yuan, et al. CD39^{hi} identifies an exhausted tumor-reactive CD8+ T cell population associated with tumor progression

- in human gastric cancer. *Pharmacol Res* [Internet]. 2024 Apr;202:107122. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661824000665>
168. Ukita M, Hamanishi J, Yoshitomi H, Yamanoi K, Takamatsu S, Ueda A, et al. CXCL13-producing CD4⁺ T cells accumulate in the early phase of tertiary lymphoid structures in ovarian cancer. *JCI Insight* [Internet]. 2022 Jun 22;7(12). Available from: <https://insight.jci.org/articles/view/157215>
 169. Sarti Kinker G, da Silva Medina T. Tertiary lymphoid structures as hubs of antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2023;23(12):803.
 170. Shen Y, Teng Y, Lv Y, Zhao Y, Qiu Y, Chen W, et al. PD-1 does not mark tumor-infiltrating CD8⁺ T cell dysfunction in human gastric cancer. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2020 Aug;8(2):e000422. Available from: <https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2019-000422>
 171. Duan Z, Li Y, Qiu Y, Shen Y, Wang Y, Zhang Y, et al. CD39 expression defines exhausted CD4⁺ T cells associated with poor survival and immune evasion in human gastric cancer. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2024 Jan 18;13(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cti2.1499>
 172. Kindlund B, Sjöling Å, Yakkala C, Adamsson J, Janzon A, Hansson LE, et al. CD4⁺ regulatory T cells in gastric cancer mucosa are proliferating and express high levels of IL-10 but little TGF- β . *Gastric Cancer* [Internet]. 2017 Jan;20(1):116–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26782287>
 173. Zhang NN, Qu FJ, Liu H, Li ZJ, Zhang YC, Han X, et al. Prognostic impact of tertiary lymphoid structures in breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021 Dec 15;21(1):536. Available from: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-02242-x>
 174. Fang WL, Huang KH, Chang SC, Lin CH, Chen MH, Chao Y, et al. Comparison of the

- Clinicopathological Characteristics and Genetic Alterations Between Patients with Gastric Cancer with or Without *Helicobacter pylori* Infection. *Oncologist* [Internet]. 2019 Sep;24(9):e845–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30796154>
175. Roberts PO, Plummer J, Leake PA, Scott S, de Souza TG, Johnson A, et al. Pathological factors affecting gastric adenocarcinoma survival in a Caribbean population from 2000–2010. *World J Gastrointest Surg* [Internet]. 2014 Jun 27;6(6):94–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24976902>
 176. Li G, Wang Z, Wang Z, Xu J, Cui J, Cai S, et al. Gastric cancer patients with *Helicobacter pylori* infection have a poor prognosis. *J Surg Oncol* [Internet]. 2013 Dec;108(7):421–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037736>
 177. Sorini C, Tripathi KP, Wu S, Higdon SM, Wang J, Cheng L, et al. Metagenomic and single-cell RNA-Seq survey of the *Helicobacter pylori*–infected stomach in asymptomatic individuals. *JCI Insight*. 2023;8(4).
 178. Kwon SY, Thi-Thu Ngo H, Son J, Hong Y, Min JJ. Exploiting bacteria for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2024 Aug 5;21(8):569–89. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41571-024-00908-9>
 179. Kemi N, Ylitalo O, Väyrynen JP, Helminen O, Junttila A, Mrena J, et al. Tertiary lymphoid structures and gastric cancer prognosis. *Apmis*. 2023;131(1):19–25.

Anexo 1 – Tabela 1

Tabela 1 - Estatísticas descritivas dos pacientes diagnosticados com gastrite crônicas e gastrite atrófica recrutados no A. C. Camargo Cancer Center

	Helicobacter pylori Status		Overall (N=20)
	Positive (N=4)	Negative (N=16)	
Gender			
Masculine	1 (25.0%)	6 (37.5%)	7 (35.0%)
Feminie	3 (75.0%)	10 (62.5%)	13 (65.0%)
Age			
Mean (SD)	55.8 (13.3)	48.3 (18.4)	49.8 (17.5)
Median [Min, Max]	52.5 [44.0, 74.0]	43.5 [21.0, 77.0]	44.0 [21.0, 77.0]
Diagnosis			
Chronic Gastritis	1 (25.0%)	9 (56.3%)	10 (50.0%)
Atrophic Gastritis	3 (75.0%)	7 (43.8%)	10 (50.0%)
Intestinal Metaplasia			
Present	3 (75.0%)	7 (43.8%)	10 (50.0%)
Absent	1 (25.0%)	9 (56.3%)	10 (50.0%)

Fonte: própria autoria

Legenda: SD, Standard Deviation

Anexo 2 Tabela 2

Tabela 2 - Estatísticas descritivas dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico, recrutados no A. C. Camargo Cancer Center e Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

	<i>Helicobacter pylori</i> Status			Overall (n = 17)
	Positive (n = 1)	Negative (n = 13)	Not Available (n = 3)	
Gender				
<i>Masculine</i>	1 (100%)	7 (53.8%)	1 (33.3%)	9 (52.9%)
<i>Feminine</i>	0 (0%)	6 (46.2%)	2 (66.7%)	8 (47.1%)
Age				
<i>Mean (SD)</i>	67.0 (NA)	61.2 (10.2)	70.7 (11.4)	63.2 (10.5)
<i>Median [Min, Max]</i>	67.0 [67.0, 67.0]	63.0 [34.0, 76.0]	74.0 [58.0, 80.0]	65.0 [34.0, 80.0]
Laurén				
<i>Diffuse</i>	1 (100%)	6 (46.2%)	0 (0%)	7 (41.2%)
<i>Intestinal</i>	0 (0%)	6 (46.2%)	3 (100%)	9 (52.9%)
<i>Indetermined</i>	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	1 (5.9%)
TNM Stage				
<i>I</i>	0 (0%)	5 (38.5%)	1 (33.3%)	6 (35.3%)
<i>II</i>	0 (0%)	4 (30.8%)	1 (33.3%)	5 (29.4%)
<i>III</i>	1 (100%)	4 (30.8%)	1 (33.3%)	6 (35.3%)
Grade				
<i>Well</i>	0 (0%)	3 (23.1%)	0 (0%)	3 (17.6%)
<i>Mod</i>	0 (0%)	3 (23.1%)	2 (66.7%)	5 (29.4%)
<i>Poor</i>	0 (0%)	7 (53.8%)	1 (33.3%)	9 (52.9%)
Location				
<i>Antrum</i>	0 (0%)	5 (38.5%)	0 (0%)	6 (35.3%)
<i>Body</i>	0 (0%)	5 (38.5%)	3 (100%)	8 (47.1%)
<i>Fundus</i>	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	1 (5.9%)
<i>Incisure</i>	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	1 (5.9%)
<i>Missing</i>	0 (0%)	1 (7.7%)	0 (0%)	1 (5.9%)

Fonte: própria autoria

Legenda: SD, Standard Deviation

Anexo 3 – Tabela 3

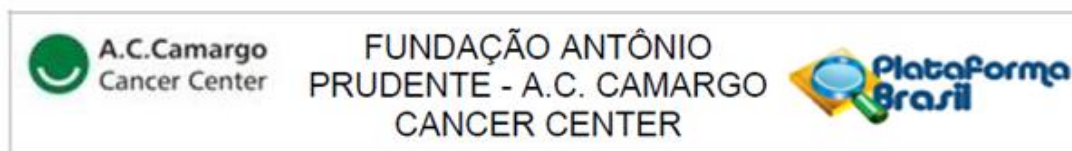
Tabela 3 - Estatísticas descritivas dos pacientes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico, constituintes da coorte retrospectiva do A. C. Camargo Cancer Center

	<i>Helicobacter pylori</i> Status			Overall (n = 54)
	Positive (n = 15)	Negative (n = 29)	Not Available (n = 10)	
Gender				
<i>Masculine</i>	7 (46.7%)	15 (51.7%)	9 (90.0%)	31 (57.4%)
<i>Feminine</i>	8 (53.3%)	14 (48.3%)	1 (10.0%)	23 (42.6%)
Age				
<i>Mean (SD)</i>	49.3 (11.6)	60.9 (17.0)	66.6 (14.2)	58.8 (16.2)
<i>Median [Min, Max]</i>	50.0 [33.0, 68.0]	64.0 [32.0, 89.0]	71.0 [45.0, 89.0]	59.5 [32.0, 89.0]
Laurén				
<i>Diffuse</i>	9 (60.0%)	14 (48.3%)	1 (10.0%)	24 (44.4%)
<i>Intestinal</i>	3 (20.0%)	11 (37.9%)	4 (40.0%)	18 (33.3%)
<i>Mixed</i>	3 (20.0%)	4 (13.8%)	4 (40.0%)	11 (20.4%)
<i>Indetermined</i>	0 (0%)	0 (0%)	1 (10.0%)	1 (1.9%)
TNM Stage				
<i>I</i>	13 (86.7%)	22 (75.9%)	4 (40.0%)	39 (72.2%)
<i>II</i>	1 (6.7%)	5 (17.2%)	4 (40.0%)	10 (18.5%)
<i>III</i>	1 (6.7%)	2 (6.9%)	2 (20.0%)	5 (9.3%)
Status				
<i>Antrum</i>	15 (100%)	25 (86.2%)	7 (70.0%)	47 (87.0%)
<i>Body</i>	0 (0%)	4 (13.8%)	3 (30.0%)	7 (13.0%)

Fonte: própria autoria

Legenda: SD, Standard Deviation

Anexo 4 - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas do A. C. Camargo Cancer Center



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização epigenética e transcricional dos linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) de pacientes com adenocarcinoma gástrico como estratégia para a descoberta de alvos imunoterapêuticos

Pesquisador: TIAGO DA SILVA MEDINA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 29715120.7.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos na emenda apresentada. Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta para o projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto em referência (registro CEP nº. 2847/20) terá um dos objetivos desenvolvido por Alexandre Silva Chaves, aluno de Doutorado.

Anexo 5 – Comprovante de submissão de artigo científico



Alexandre Chaves <alexandre.chaves1066@gmail.com>

Your manuscript submission - 678127

1 mensagem

Frontiers Cell and Developmental Biology Editorial Office

<cellbiology.editorial.office@frontiersin.org>

8 de março de 2021

às 20:53

Responder a: Frontiers Cell and Developmental Biology Editorial Office <cellbiology.editorial.office@frontiersin.org>

Para: Alexandre Chaves <alexandre.chaves1066@gmail.com>

Dear Dr Chaves

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "B cell orchestration of anti-tumor immune responses: a matter of cell localization and communication" to be considered for publication in Frontiers in Cell and Developmental Biology, section Molecular Medicine.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate.

Best regards,

Your Frontiers in Cell and Developmental Biology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team

www.frontiersin.org

Avenue du Tribunal Fédéral 34

Lausanne, Switzerland

Office T 41 21 510 1789

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: B cell orchestration of anti-tumor immune responses: a matter of cell localization and communication

Manuscript ID: 678127

Authors: Gabriela Sarti Kinker, Glauco Akelington Freire Vitiello, Wallax Augusto Silva Ferreira, Alexandre Silva Chaves, Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima and Tiago da Silva Medina

Journal: Frontiers in Cell and Developmental Biology, section Molecular Medicine

Article type: Review

Submitted on: 08 Mar 2021

Research Topic: Tumor Microenvironment (TME) and Tumor Immune Microenvironment (TIME): New Perspectives for Prognosis and Therapy

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1470&name=molecular_medicine

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf