

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
RAYANE BERNARDES ESTEVAM**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS 1, 3 E 9 EM BIÓPSIAS DE
MUCOSA DO ANTRO GÁSTRICO DE PACIENTES COM QUEIXA DIGESTIVA
ALTA.**

UBERABA-MG

2015

RAYANE BERNARDES ESTEVAM

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS 1, 3 E 9 EM BIÓPSIAS DE
MUCOSA DO ANTRO GÁSTRICO DE PACIENTES COM QUEIXA DIGESTIVA
ALTA.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Odontologia, área de concentração Biopatologia da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues.

UBERABA-MG

2015

Dedicatória

À Deus, pois é Dele que recebi toda sabedoria, é Ele Quem guia todos os meus passos.

Aos meus queridos pais, Paulo e Aparecida pelo amor incondicional, incentivo e orações.

Aos meus irmãos Milla e Paulo Henrique pelo apoio e palavras de carinho.

Ao meu noivo Matheus pelo amor, cumplicidade e incentivo na realização desta conquista.

“Eu aprendi que o sucesso deve ser medido não tanto pela posição que alguém alcançou na vida e sim pelos obstáculos que teve que ultrapassar enquanto tentava alcançar o sucesso.”

(Booker T. Washington)

Agradecimentos

- ✓ À minha orientadora prof^{ca} Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues, pela sua imensa dedicação, incentivo e confiança em tornar possível esta conquista. Pela compreensão e pela amizade que sempre me atendeu. Levarei como referência de profissionalismo.
- ✓ Ao Prof. Dr. Virmondês Rodrigues que com a sua experiência e competência colaborou com a conclusão deste estudo.
- ✓ À Polyanna Miranda pelo auxílio prático inicial deste trabalho.
- ✓ À Isabela Flores pelo auxílio e amizade.
- ✓ Às amigas do mestrado Isabella, Camilla e Marcellly, pelo companheirismo no ambiente acadêmico e fora nos momentos de distração e alegria.
- ✓ As demais amigas da pós-graduação, Gisele, Gabriele e Ana Laura, que sempre estiveram presentes, compartilhando dos momentos alegres e tensos no decorrer do curso.
- ✓ À Universidade de Uberaba pelo uso das dependências do Laboratório de Histopatologia e Biologia Molecular.
- ✓ Ao professor André Luís Teixeira Fernandes, Pró-reitor de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão pelo apoio dado para a realização desta conquista.
- ✓ Aos professores pelos ensinamentos e amizade.
- ✓ A Universidade Federal do Triângulo Mineiro pela colaboração para este estudo.
- ✓ As funcionárias do laboratório de Imunologia da UFTM Mônica e Bethânia pelo auxílio.
- ✓ A professora Adriana e Fernanda, pela contribuição na identificação do *H. pylori*.
- ✓ Aos alunos de Iniciação Científica Lucilaine e Marco Túlio pela colaboração.
- ✓ Aos amigos do trabalho Andréa, Mariele, Antônio e Rodolfo pelo auxílio nos momentos em que precisei.
- ✓ Aos demais amigos e familiares pelo apoio emocional, sempre me incentivando a correr atrás dos meus sonhos.
- ✓ Agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO GERAL	06
2 – HIPÓTESE	13
3 – OBJETIVOS	14
GERAL	14
ESPECÍFICOS	14
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	15
5 – ARTIGO CIENTÍFICO	19
RESUMO	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAIS E MÉTODOS	23
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
LEGENDAS FIGURA 1	38
LEGENDAS FIGURA 2	39
FIGURA 1	40
FIGURA 2	41
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO I PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	50
ANEXO II NORMAS REVISTA MEDIATORS OF INFLAMMATION	51

1 – INTRODUÇÃO GERAL

A gastrite é um processo inflamatório da mucosa gástrica cuja etiologia pode estar associada a fatores externos com a resposta do hospedeiro. O termo gastrite ativa é usado para expressar um processo inflamatório crônico acompanhado de neutrófilo (CASTRO et al., 1991). A gastrite crônica está limitada na mucosa superficial no início (gastrite superficial) e em seguida, torna-se mais profunda, e linfócitos T aumentam tanto no epitélio como na lâmina própria (KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014). Uma das principais etiopatogenias das doenças do sistema digestivo como gastrites, úlceras pépticas e câncer gástrico é a infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (NORDENSTEDT et al., 2013). Durante a infecção pelo *H. pylori*, os neutrófilos estão presentes nas glândulas epiteliais e também na lâmina própria subjacente, há um aumento de linfócitos, macrófagos, eosinófilos, nas células inflamatórias da mucosa gástrica (MIZUNO et al., 2005). A gastrite surge como uma resposta imune local contra a bactéria, porém a maioria dos pacientes se mostra assintomática (COVER; BLASER, 1996).

Essa bactéria gram-negativa, altamente móvel, espiralada, é encontrada na superfície luminal do epitélio gástrico (WARREN; MARSHALL, 1984).

Inicialmente a bactéria foi classificada como pertencente ao gênero *Campylobacter*, que é composto por micro-organismos gram-negativos em forma de bastão curvado, oxidase e catalase positivas, que se locomovem através de flagelos polares. Com isto, foram inicialmente chamados de “gastric *Campylobacter* like organism”, e só posteriormente recebendo denominações de *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (GOODWIN et al., 1985).

Após a realização de estudos ultraestruturais em 1989 e de análise da sequência de ácidos nucleicos, a bactéria passou a receber o nome de *Helicobacter* (forma helicoidal),

assim a espécie, por ser mais encontrada na mucosa do antro gástrico, próxima ao piloro, ficou sendo chamada de *Helicobacter pylori* (GOODWIN, 1989).

Atualmente o gênero *Helicobacter* é composto por 27 espécies que participam de propriedades comuns relacionadas com a existência no estômago e podem se localizar no fundo e no corpo, mas é principalmente no antro gástrico que esta bactéria é encontrada em maior densidade (BLASER; BERG, 2001).

Em sua morfologia *H. pylori* apresenta de 3 a 5µm de comprimento e de 0,5 a 1µm de largura. Normalmente tem um formato espiralado, porém pode surgir em forma de um bastão, e raramente formas cocoides também podem aparecer (KUSTERS; VAN VLIET; KUIPERS, 2006). Apresenta de 2 a 6 flagelos unipolares de aproximadamente 3µm de comprimento, com um bulbo em seu final. Estas estruturas fazem com que ela tenha motilidade e movimentos rápidos em soluções viscosas como o muco que recobre células epiteliais (O'TOOLE; LANE; PORWOLLIK, 2000). É um micro-organismo que pode sobreviver no ambiente ácido do estômago, isto devido a sua elevada produção de urease que converte ureia presente no suco gástrico em amônia alcalina e dióxido de carbono (MARSHALL et al., 1990).

A prevalência desta bactéria aumenta com a idade avançada e também com o menor nível socioeconômico durante a infância (WOODWARD; MORRISON; MCCOLL, 2000). Sua transmissão pode incidir por diferentes formas, oral-oral (ALLAKER et al., 2002), fecal-oral (GRUBEL et al., 1997), gástrica-oral (NGUYEN; BARKUN; FALLONE, 1999). No mínimo, 50% da população mundial apresenta infecção pelo *H. pylori* (SHI et al., 2008).

Estudos em mucosas gástricas têm revelado uma série de lesões que, sequencialmente, evoluiriam da condição normal para gastrite crônica não-atrôfica (GCNA), que evoluíram para gastrite atrôfica (GA) e metaplasia intestinal (MI) e, finalmente, para displasia e adenocarcinoma (CORREA, 1995; SIPPONEN; HYVARINEN, 1993). Desta forma, vários estudos apontam que infecção pelo *H. pylori* determina um processo inflamatório crônico da

mucosa gástrica, e pode ainda, persistir por anos e conferir risco aumentado para o desenvolvimento do câncer gástrico (ISRAEL, PEEK; 2001).

Tem sido dado ênfase a estudos que investigam as lectinas endógenas e suas propriedades, por aparecerem envolvidas na modulação da resposta inflamatória, tanto nas doenças agudas, como nas crônicas, e ainda, nas doenças autoimunes e no câncer (NORLING; PERRETTI; COOPER, 2009). As lectinas endógenas são chamadas de Galectinas (Gal) (CVEJIC et al., 2005). As Gals fazem parte de uma família de lectinas que possuem uma elevada afinidade para os resíduos β -galactosídeos (RABINOVICH et al., 2002), e estas proteínas participam de vários fenômenos biológicos, tais como, diferenciação celular, angiogênese, interação celular, apoptose e inflamação (LEFFLER et al., 2004; BARONDES et al., 1994). Na inflamação, as Gals, podem exercer um papel importante na ação da ativação dos mastócitos (CHEN et al., 2009) e sua ação depende do nível de concentração e localização (BARONDES et al., 1994; RABINOVICH et al., 2002; CHEN et al., 2013).

Até o momento 15 galectinas foram descritas. Essa família de proteínas é dividida em três grupos que as diferenciam de acordo com sua estrutura e o número de domínio de reconhecimento a carboidratos (CRDs). Podem se apresentar em forma de monômeros ou homodímeros não covalentes de CDR que são as Galectinas 1, 2, 5, 7, 13, 14 e 15, como quimeras formadas por um CDR ligado a um domínio diferente de lectina (Galectina 3) e por fim como repetições em séries de dois CDRs diferentes em uma exclusiva cadeia polipeptídica (Galectinas 4, 6, 8, 9 e 12) (HIRABAYASHI et al., 2002; CASTRO, 2009). São expressas em vários tipos de células do sistema imune, como linfócitos, células endoteliais, neutrófilos, macrófagos, monócitos, mastócitos e células dendríticas, que provocam uma cascata de ativação pró e anti-inflamatória de leucócitos (NORLING; PERRETTI; COOPER, 2009; RABINOVICH et al., 2002, JORGE et al., 2013).

A interação das Gals com as células do sistema imune no espaço extracelular pode gerar a modulação da produção de citocinas e mediadores, apoptose, quimiotaxia, endocitose e adesão celular. No meio intracelular podem modular respostas biológicas como diferenciação, migração celular, apoptose e interação com as vias de sinalização (LIU; RABINOVICH, 2010). A família das galectinas contribui para a transformação neoplásica, a sobrevivência das células de tumor, invasão de tecidos e metástases de vários tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico (LIU; RABINOVICH, 2005).

As galectinas 1 (Gal-1), galectinas 3 (Gal-3) e galectinas 9 (Gal-9) são as mais estudadas, sendo expressas em várias células e tecidos (CVEJIC et al, 2005, LIU; RABINOVICH, 2005). E estas estão envolvidas em várias funções biológicas relacionadas com a resposta inflamatória e neoplasias (LIU; RABINOVICH, 2005).

A galectina 1 (Gal-1) foi a primeira proteína encontrada na família das galectinas (CHEN et al., 2013). No sistema imune, é encontrada nas células T (BLASER et al., 1998; FUERTES et al., 2004), em macrófagos ativados (RABINOVICH et al., 1998) e em células endoteliais, onde tem um papel importante na inflamação (LOTAN et al., 1994, BAUM et al. 1995). Um crescente conjunto de evidência experimental indica que as galectinas podem desempenhar um papel-chave na iniciação, amplificação ou resolução de processos inflamatórios crônicos (RABINOVICH et al., 2002). A expressão desta galectina está associada com diversos processos biológicos dentre estes estão o controle da adesão celular, apoptose, sinalização celular, gênese de tumores, homeostase de célula T, migração e sua ação depende do nível de suas concentrações e a localização celular (RABINOVITCH et al., 2000; CHEN et al., 2013). Um estudo de paciente com metaplasia intestinal (36 pacientes), com úlcera gástrica (29 pacientes) comparados com controle (10 pacientes), os autores observaram que a expressão da Gal-1 e annexin-A1(AnxA1) em mucosas normais mostraram uma baixa expressão no estroma, enquanto que no epitélio não houve imunomarcagem para Gal-1, e

AnxA1 apresentou baixa imunoreatividade. Nos grupos de metaplasia intestinal e úlcera gástrica ambas proteínas exibiram alta imunomarcção no núcleo epitelial e citoplasma assim como no estroma. Para Gal-1 estes grupos mostraram alta coloração ao longo da extensão do citoplasma. A especificidade destas reações foi confirmada por controles negativos (ROSSI et al., 2014). Os resultados mostraram uma importante contribuição ao evidenciar que ambas proteínas anti-inflamatórias Gal-1 e AnxA1 estão desreguladas em lesões gástricas pré-cancerosas, sugerindo seu envolvimento em estágios iniciais da carcinogênese gástrica possivelmente devido a processos inflamatórios na mucosa gástrica (ROSSI et al., 2014). Em outro estudo, também pela técnica de imunohistoquímica os autores avaliaram a expressão de AnxA1 e Gal-1, em mucosa normal, gastrite crônica, gastrite crônica intestinal e câncer gástrico do tipo difuso, onde observaram uma modesta expressão destas proteínas no estroma de mucosas normais, enquanto no epitélio não apresentou nenhuma expressão destas proteínas. Já gastrite crônica e no adenocarcinoma gástrico, houve uma forte expressão de Gal-1 no estroma e no epitélio (JORGE et al., 2014).

A galectina 3 (Gal-3) apresenta uma diversidade funcional muito extensa, e dependendo da sua localização, pode regular a proliferação celular, interferir na adesão celular, colaborar na angiogênese e ainda inibir a apoptose (INOHARA et al., 1998; KIM et al., 1999; NANGIA-MAKKER et al., 2000; LEE et al., 2006; HOYER et al., 2004). A Gal-3 pode ser localizada tanto no espaço intracelular como no espaço extracelular, tais como na superfície celular ou matriz extracelular, e sua localização é dependente do tipo de tecido, tipo de célula, estado proliferativo e nível de diferenciação celular (MOUTSATSOS; DAVIS; WANG; 1986). Galectina-3 está presente em ambos os compartimentos citoplásmicos e nucleares da célula (WANG et al., 1995). É expressa por várias células, e no sistema imune, foi encontrada em neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos e células endoteliais (LOTAN et al., 1994, BAUM et al., 1995). A Gal-3 pode

desempenhar várias funções dependendo do seu local na célula, até mesmo antagônicas. Esta lectina tem evidenciado vários papéis na patogênica, proliferação e disseminação de metástases (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006), assim sendo, estudos mostram que a mesma pode ser encontrada em uma ampla variedade de linhagens celulares tumorais (BETKA et al., 2003; PLZÁK et al., 2004; TEYMOORTASH et al., 2006).

Num estudo imunohistoquímico os autores observaram uma redução na expressão de Gal-3 em biópsias de pacientes com câncer gástrico no tecido tumoral comparadas com a expressão nas células epiteliais da mucosa normal. Além disso, observaram que a Gal-3 foi detectada principalmente no núcleo das células epiteliais normais, no entanto no tecido tumoral Gal-3 foi detectada no citoplasma e núcleo das células do câncer gástrico. Estes resultados sugerem que a localização celular da Gal-3 pode desempenhar um papel importante na transformação maligna (OKADA et al., 2006).

A galectina 9 (Gal-9) foi identificada primeiramente como um fator quimiotático de eosinófilos (MATSUSHITA et al., 2000). É encontrada em fibroblastos (IMAIZUMI et al., 2002) linfócitos T ativos (IMAIZUMI et al., 2002), linfócitos B, macrófagos, mastócitos e células endoteliais (IMAIZUMI et al., 2002; SEKI et al., 2007). Esta lectina apresenta muitas atividades biológicas, como agregação de células, quimiotaxia, indução de radicais livres e apoptose (KASHIO et al., 2003). Uma diminuição da Gal-9 foi encontrada em pacientes com câncer gástrico (JIANG et al., 2013). Uma diminuição da Gal-9 em tecidos cancerosos é apontada como marcador na tumorigênese do câncer gástrico (YANG et al., 2014).

Os mastócitos são células muito importante do sistema imune que participam da imunidade inata e adquirida. Atuam como células efetoras em reações alérgicas, inflamatórias e na defesa contra patógenos (METCALFE, 2008). Os mastócitos possuem grânulos em seu citoplasma, estes são liberados quando os mastócitos são ativados, assim ajuda a induzir a

inflamação (RODEWALD; FEYERABEND, 2012). Exercem várias funções imunológicas tais como: regulação da resposta inata e adaptativa, imunidade de proteção contra vírus, parasitas estes que provocam doenças, proteção contra câncer, tolerância à rejeição de enxertos, cicatrização de feridas, doenças vasculares e angiogênese dentre outras (RODEWALD; FEYERABEND, 2012).

Assim, a inflamação envolve a ativação das vias de sinalização que conduzem a produção de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. E as galectinas aparecem bem como agentes anti-inflamatórios como a Gal-1 ou pró-inflamatório como a Gal-3 que atuam em diferentes níveis de respostas inflamatórias agudas e crônicas, tais respostas são dependentes da sua expressão e localização e ainda podem estar associadas com o processo inflamatório em resposta ao *H. pylori*. E esta infecção na mucosa gástrica ocasionada pelo *H. pylori* poderia contribuir para um câncer gástrico. Os mastócitos são células que participam dos mecanismos de defesa do organismo e são conhecidos por exercerem um papel fundamental na resposta inflamatória. Desta forma, no presente estudo, foi avaliado em biópsias do antro gástrico de pacientes com gastrite crônica, gastrite ativa, comparadas com o grupo controle, a expressão de Gal-1, Gal-3 e Gal-9, a densidade de mastócitos e a presença ou ausência da infecção por *H. pylori*. O presente estudo foi realizado no formato de artigo científico e será submetido à Revista Mediators of Inflammation, de acordo com suas normas.

2 – HIPÓTESE

Galectinas 1, 3 e 9 são expressas de formas diferentes no processo inflamatório presentes em biópsias de antro gástrico de pacientes com gastrite crônica e ativa quando comparados com o grupo controle e pela presença ou ausência de infecção por *Helicobacter pylori*.

3 – OBJETIVOS

Geral:

- Analisar a expressão das Galectinas e mastócitos em biópsias de antro gástrico em pacientes com queixa digestiva alta.

Específicos:

- Avaliar *in situ* a expressão das galectinas 1, 3 e 9 em biópsias do antro gástrico de pacientes com gastrite crônica e ativa comparadas com o grupo controle.
- Avaliar a expressão destas galectinas com a presença e ausência de *Helicobacter pylori*.
- Avaliar a densidade de mastócitos em biópsias de antro gástrico e comparar com a presença e ausência de gastrite e *Helicobacter pylori*.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade de Uberaba (UNIUBE) sob protocolo de número 350.874. No presente estudo foram avaliados 44 pacientes com sintomas do trato digestivo superior, como dor, náuseas, vômitos, disfagia, refluxos e pirose e todos foram submetidos ao exame de Endoscopia Digestiva Alta (EDA). Um fragmento do antro foi retirado para a pesquisa do *Helicobacter pylori* pelo teste rápido da uréase imediatamente após o exame de EDA. Os outros fragmentos do antro gástrico, um fragmento foi fixado em formol tamponado a 4% para a realização do exame anatomopatológico e análise imunohistoquímica. O outro fragmento do antro gástrico foi colocado, a fresco, em RNAlater (Life Technologies Corporation, USA) para extração do DNA e avaliação do *H. pylori* pela técnica de PCR.

Os pacientes estudados foram recrutados no Ambulatório Maria da Glória da UFTM e em uma clínica particular. Os pacientes foram distribuídos de forma aleatória independente de terem sido ou não tratados anteriormente de doença digestiva alta. Quando foi possível, os pacientes que estavam usando medicamentos que poderiam interferir na positividade da pesquisa da bactéria como Inibidores de bomba de prótons (IBP), bloqueadores da histamina (bloqueadores H₂), antibióticos, e corticosteroides, foram orientados a suspender a medicação com pelo menos duas semanas de antecedência à realização do exame de EDA. Não foi levado em consideração o sexo, a idade, a cor, a profissão, a raça e o peso.

Foram excluídos deste estudo os pacientes com cirurgia prévia do trato digestivo superior, gestantes, presença de comorbidades graves como neoplasias e distúrbios de coagulação e pacientes fazendo uso de antibióticos, anti-inflamatórios e corticosteroides.

Teste rápido da urease

Para o teste rápido da urease foi utilizado o kit “UREASE-*H. pylori*” do laboratório RNA com os seguintes dados: Lote 321, Fabricação. 09/07/2013 e Validade 09/01/2014. O teste foi realizado baseado na principal característica bioquímica da bactéria, na produção da enzima urease, que hidrolisa a ureia em gás carbônico e amônia. Desta forma, um fragmento de biópsia da mucosa do estômago foi colocado em um meio contendo ureia e um indicador de pH. Quando a urease estava presente, a ureia foi convertida em amônia o que gerou um aumento do pH e conseqüentemente uma mudança na coloração do meio, passando da cor âmbar para rósea.

Metodologia do Exame Anatomopatológico

Os fragmentos fixados em formol tamponado a 4% foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e a seguir incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica de hematoxilina-eosina para exame anatomopatológico. Os achados histológicos da mucosa gástrica foram interpretados de acordo com a classificação de Sidney, com as modificações/graduação propostas pela reunião de Houston (DIXON et al., 1996).

Dos 44 pacientes, 11 biópsias de pacientes que durante o exame anatomopatológico não apresentavam processo inflamatório na mucosa gástrica (grupo controle), 18 pacientes no exame anatomopatológico apresentavam processo inflamatório com predomínio de células do tipo mononucleares (MN) que foram classificados com gastrite crônica e 15 pacientes com infiltrado inflamatório constituído de polimorfonucleares e mononucleares (PMN/MN) que foram classificados com gastrite ativa.

Coloração de mastócitos

Para a pesquisa de mastócitos as lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em álcool, lavadas em água destilada, coradas pela fucsina-laranja G e mergulhadas rapidamente no álcool 60%. Em seguida, foram coradas pelo azul de toluidina em um rápido mergulho e lavadas rapidamente no álcool 60%. Por fim, as lâminas foram montadas e observadas no microscópio de luz comum em aumento de 400X.

As demais lâminas foram reservadas para imunohistoquímica e foram todas silanizadas (3-aminopropyltriethoxysilane – Sigma) antes de seu processamento.

Imunohistoquímica

Para avaliar a expressão das galectinas 1, 3 e 9, foi realizada a técnica de imunohistoquímica indireta. As lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em álcool e a recuperação antigênica foi realizada em Banho Maria (90°C) no ácido cítrico 0.01 molar pH=6,0 durante 30 minutos. Em seguida os cortes foram diluídos em PBS/BSA 2% e incubados overnight em câmara úmida, com anticorpos primários, anti-Galectin-1 humano (diluição-1:50; R&D Minneapolis USA; cod-AF1152), anti-Galectin-3 humano (diluição-1:75; R&D Minneapolis USA; cod-AF1154) e anti-Galectin-9 humano (diluição-1:75; R&D Minneapolis USA; cod-AF2045). Após a lavagem em PBS 1X/Tween 20, a 0,05% as lâminas foram imersas na solução de água oxigenada 30% e metanol por 10 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário de Biotinylated Link Universal Streptavidin-HRP (Dako Cytomation®) durante 1 hora. As lâminas foram reveladas com DAB diluído em tampão Tris-HCl (Ph 7.2) e água oxigenada. A reação foi interrompida lavando-se em água corrente e posteriormente foi realizada a coloração de fundo com hematoxilina.

Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de tecido colhida por biópsia da região do antro gástrico utilizando-se o kit “QIAamp DNA miniKit” (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 20µl de solução de proteinase K (20 mg/ml) em tubos contendo o fragmento de mucosa gástrica e homogeneizado em vórtex. Posteriormente, os tubos foram incubados à 56°C até ocorrer a completa lise do tecido. A essa solução, foram acrescentados 200µl do tampão de lise (Buffer AL) fornecido pelo fabricante, homogeneizado em vórtex, centrifugado e incubado a 70°C por 10min. A seguir, 200µl de etanol (96-100%) foram adicionados e essa mistura colocada na coluna fornecida pelo kit QIAamp e centrifugada a 8000g por 1min. A coluna foi colocada em outro microtubo coletor de 2ml, e o filtrado do tubo anterior descartado. O material da coluna foi lavado duas vezes (250µl cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas com o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) fornecida pelo kit. Finalmente, o DNA foi eluído com 100µl de tampão AE fornecido pelo kit. A extração do DNA foi realizada a partir de uma amostra de biópsia gástrica de acordo com as recomendações do fabricante.

A presença do DNA do *H. pylori* foi detectada a partir da amplificação do gene 16S *rRNA* por PCR utilizando primers específicos (RILEY *et al.*, 1996). Os primers utilizados foram: H276F: TATGACGGGTATCCGGC; H676R: ATTCCACCTACCTCTCCCA nas seguintes condições 94 °C, 5 minutos; 34 ciclos (94 °C, 2s, 53 °C, 2s, 72 °C, 30 s) e 72 °C, 15 minutos.

O termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) foi utilizado para amplificação de todas as reações. Os produtos obtidos foram corados com brometo de etídeo e visualizados em gel de agarose 1,5% em um transluminador de luz ultravioleta. As amostras que apresentaram um fragmento de 364 pb foram consideradas *H. pylori*-positivas.

Análise morfométrica

Para análise morfométrica dos mastócitos e da imunohistoquímica as células foram quantificadas utilizando imagens dos cortes histológicos capturados com um sistema digital e analisadas usando o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Para este efeito, cada campo a ser quantificado foi capturado com uma câmera ligada a um microscópio de luz comum e a um computador para digitalizar a imagem. O número de células em cada campo foi determinado, bem como a área de cada campo (0,14 mm²). A densidade de células positivas foi expressa pelo número de células por milímetro quadrado. Todo fragmento foi analisado, e a calibração foi realizada por apenas um calibrador.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o Software Statview (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Após análise de variância e normalidade dos dados, os testes Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, foram realizados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 – ARTIGO CIENTÍFICO

Galectin-3 is increased in biopsies of a patient with active gastritis and positive *Helicobacter pylori*

Ms. Rayane Bernardes Estevam^a, Ms. Natalia Maria Jacom Wood da Silva^{a,b}, Ms. Emerson Abdulmassih Wood da Silva^{a,b}, Lucilaine Furtado Hermenegildo^a, PhD. Fernanda Machado Fonseca^b, PhD. Adriana Gonçalves de Oliveira^b, PhD. Betânia Maria Ribeiro^b, Ms. Mônica Sawan^b, PhD.

Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins^a, PhD. Sanívia Aparecida de Lima Pereira^{a,b}, PhD. Sheila Jorge Adad^b, PhD. Virmondes Rodrigues^b, Denise Bertulucci Rocha Rodrigues^{a,b}

^a Laboratory of Biopathology and Molecular Biology, University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil

^b Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil

Corresponding author:

*Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Universidade de Uberaba

Av. Nenê Sabino, 1801, Bairro Universitário, CEP 38.055-500

Uberaba MG, Brazil

Telephone number: +55 34 3319 8815

Fax number: +55 34 3314 8910

E-mail address: denise.rodrigues@uniube.br

Keywords: Galectins; *Helicobacter pylori*; Mast cells.

List of abbreviations

Gal: Galectin; Gal-1: Galectin-1; Gal-3: Galectin-3; Gal-9: Galectin-9; *H. pylori*: *Helicobacter pylori*;

UDE: Upper Digestive Endoscopy; BSA: bovine serum albumin; MN: mononuclear cells; PMN:

Polymorphonuclear cells.

Abstract

OBJECTIVES: This study aimed to analyze the expression of Galectins (Gal) -1, -3 and -9 in biopsies of the gastric antrum of patients with upper gastrointestinal complaint. **METHODOLOGY:** 44 patients with upper digestive tract symptoms were evaluated, and underwent Upper Digestive Endoscopy examination. Sections of the gastric antrum were fixed in buffered formaldehyde at 4% in order to perform the anatomopathological examination and immunohistochemical analysis of Galectins-1, -3 and -9. The other, fresh, section of gastric antrum was placed in RNAlater for DNA

extraction and evaluation of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). P values <0.05 were considered statistically significant. **RESULTS:** Gal-3 was found to be significantly higher in the stroma of patients with active gastritis (p <0.05) and in patients with *H. pylori* infection (p <0.05). Gal-1 was significantly higher in the stroma than in the epithelium (p <0.05), whereas Gal-9 was more expressed in the epithelium than in the stroma (p <0.05). **CONCLUSION:** Modulation of Gal-3 expression is associated with *H. pylori* infection and with the inflammatory process characterized as active gastritis.

Introduction

Gastritis is inflammation of the gastric mucosa in response to a noxious agent [1]. Chronic gastritis is predominantly characterized by mononuclear inflammatory cells, whereas active gastritis is a chronic inflammatory process with a predominance of neutrophils [2, 3]. One of the main etiopathogenesis of gastritis is the infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [4]. This highly mobile Gram-negative spiral bacterium is found on the luminal surface of the gastric epithelium [5], and neutrophils are found in the epithelial glands and in the underlying lamina propria during infection, with an increase of lymphocytes, macrophages, eosinophils in the gastric mucosa [6]. Several studies suggest that *H. pylori* infection determines a chronic inflammation of the gastric mucosa, and that it may also persist for years and confer increased risk for development of gastric cancer [7, 8, 9].

Studies investigating endogenous lectins and their properties have been emphasized over the years, due to the immune modulating properties of these lectins as an inflammatory response, both in acute, chronic diseases and also in autoimmune diseases and cancer [10]. Galectins (Gals) are a family of lectins which have a high β -galactosidase affinity [11], and these proteins participate in various biological phenomena, such as cell differentiation, angiogenesis, cell interaction, apoptosis and inflammation [12, 13, 14]. Gals can play an important role in the activation of mast cells in inflammation [15] and their action depends on

the level of concentration and location [14, 11, 16]. Galectin-1 (Gal-1) appears to have an anti-inflammatory role in the immune system, as it can induce apoptosis of activated T cells, inhibit cytokines such as IL-2 and IFN-gamma, inhibit the production of iNOS and of oxide nitric in macrophages, as well as promote the migration of neutrophils [17, 11]. In biopsies of patients with gastric ulcer and intestinal metaplasia, Gal-1 was highly expressed in the stroma and epithelial cells [18]. Likewise, Gal-1 was found to be overexpressed both in the chronic gastritis and in gastric cancer, suggesting a strong association of these proteins with chronic inflammatory processes and carcinogenesis [19]. Galectin-3 (Gal-3) has a wide functional diversity depending on its location [20, 21, 22, 23, 24]. In the immune system, it appears to play an important proinflammatory role as, in addition to promoting the proliferation of these cells in T lymphocytes, it is also involved in T cell/dendritic cell interaction [25]. In macrophages and neutrophils, Gal-3 is associated with chemotaxis, migration and phagocytosis, whereas, in neutrophils, Gal-3 seems to contribute to leakage and adhesion to laminins, thus facilitating the migration of these cells to the site of infection [26]. Moreover, Gal-3 also increases NADPH oxidase activity [27]. In case of intracellular expression, Gal-3 is associated with inhibition of apoptosis, whereas extracellular expression is associated with induction of apoptosis [28, 29, 30]. A reduction in the expression of Gal-3 has been found in biopsies of patients with gastric cancer [31], and there seems to be an important adhesion of this galectin to *H. pylori* antigens [32]; some authors have observed that this adhesion may influence the severity of the disease [33]. *In vitro* studies suggest that *H. pylori* infection stimulates rapid secretion of Gal-3 in gastric epithelial cells [32]. Galectin-9 (Gal-9) was first identified as an eosinophil chemotactic factor [34, 35]. It is found in fibroblasts [36], activated T lymphocytes [35], macrophages, mast cells and endothelial cells [36, 37]. A decrease in Gal-9 was observed in gastric cancer patients [38], as well as in breast cancer [39]. However,

Gal-9 was identified as an important differential marker in squamous cell carcinomas, leukoplakia, and lichen planus [40].

Therefore, antral biopsies of patients with chronic, active gastritis were performed in this study and then compared with the control group. The density of mast cells, expression of Gal-1, Gal-3 and Gal-9, and presence or absence of *H. pylori* infection were also analyzed.

Materials and Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the University of Uberaba (UNIUBE) under protocol number 350.874. Forty-four patients with symptoms of the upper digestive tract were evaluated, and all of them underwent the Upper Digestive Endoscopy (UDE). One antral section was performed for investigation of *Helicobacter pylori* by rapid urease test immediately after UDE. Another section of the gastric antrum was fixed in buffered formalin 4% for anatomopathological examination and immunohistochemical analysis. Finally, another, fresh, section of gastric antrum was placed in RNAlater (Life Technologies Corporation, USA) for DNA extraction and evaluation of *H. pylori*.

The anatomopathological examination was interpreted in accordance with the Sydney System of classification, whose changes/grading were proposed at the Houston meeting [1]. Out of the 44 patients, 11 patients had no inflammatory process (control group), 18 patients had an inflammatory process with predominance of mononuclear cells (MN) and were classified as chronic gastritis, and 15 patients had an inflammatory infiltrate composed of polymorphonuclear (PMN) and mononuclear cells (MN), and were thus classified with active gastritis.

The slides were stained with toluidine blue for mast cell research, and observed under an ordinary light microscope at 400X magnification.

Immunohistochemistry

Indirect immunohistochemistry was performed in order to evaluate the expression of galectin-1, -3 and -9. The slides were deparaffinized in xylene, hydrated in alcohol, and antigen retrieval was carried out in water bath (90° C) in 0:01 M citric acid buffer (pH=6.0) for 30 minutes. Then, the sections were diluted in PBS/BSA 2% and incubated overnight in a humid chamber with primary antibodies, anti-human Galectin-1 (1:50 dilution; R&D Minneapolis, USA; cod-AF1152), anti-human Galectin-3 (1:75 dilution; R&D Minneapolis, USA; cod-AF1154,) and anti-human Galectin-9 (1:75 dilution; R&D Minneapolis USA; cod-AF2045). After washing in 1X PBS/Tween 20 buffer, at 0.05%, the slides were immersed in hydrogen peroxide solution (30%) and methanol for 10 minutes in order to block endogenous peroxidase. After that, the slides were incubated with secondary antibody Biotinylated Link Universal + Streptavidin-HRP (Dako Cytomation®) for 1 hour and were developed with DAB diluted in Tris-HCl buffer (pH 7.2) and hydrogen peroxide. The reaction was stopped by washing with tap water, and background staining with hematoxylin was subsequently performed.

DNA extraction

DNA extraction was performed from biopsy tissue samples of the antrum region obtained using the kit “QIAamp DNA Minikit” (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s specifications. Briefly, 20µl of Proteinase K solution (20 mg/ml) was added to tubes containing the gastric mucosa section homogenized by vortexing. Subsequently, the tubes were incubated at 56°C until complete lysis of the tissue. Then, 200µl of lysis buffer (Buffer AL) provided by the manufacturer were added to this solution, homogenized by vortexing, centrifuged and incubated at 70°C for 10min. After that, 200µl of ethanol (96-100%) were added to this solution, and the mixture was placed in the column provided by QIAamp kit, and centrifuged at 8000g for 1 min. The column was placed in

another 2mL microtube collector, and the filtrate of the previous tube was discarded. The column material was washed twice (250µl each) with the first buffer (Buffer AW1), and twice with the second wash buffer (Buffer AW2) in the kit. Finally, the DNA was eluted with 100µl of buffer AE supplied with the kit. DNA extraction was performed from a gastric biopsy sample according to the manufacturer's instructions.

The presence of *H. pylori* DNA was detected from the 16S rRNA gene amplification by PCR using specific primers [41]. The primers used were: H276F: TATGACGGGTATCCGGC; H676R: ATTCCACCTACCTCTCCCA the following conditions 94 ° C, 5 minutes; 34 cycles (94 ° C, 2 seconds, 53 ° C, 2 seconds, 72 ° C, 30 seconds) and 72 ° C, 15 minutes. Samples that showed a fragment of 364 bp were considered positive *H. pylori*.

Morphometric Analysis

For morphometric analysis of mast cells and of immunohistochemistry, cells were quantified using histological section images captured with a digital system and analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Therefore, each field to be quantified was captured with a camera attached to an ordinary light microscope and a computer to scan the image. The number of cells in each field was determined, as well as the area of each field (0.14 mm²). The density of positive cells was expressed as number of cells per square millimeter. All fragment were analyzed, and calibration was performed by only one calibrator.

Statistical Analysis

Data were analyzed using Statview software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). After analysis of variance and normality of the data, the Mann-Whitney, Wilcoxon, and Kruskal-Wallis tests were performed. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Gastric antrum biopsies of 44 patients were analyzed in the present study. The expression of Gal-1, Gal-3 and Gal-9 was evaluated in two compartments (epithelium and stroma). In the histopathological examination, biopsies were grouped according to the presence and nature of the inflammatory process (chronic or active gastritis) and compared with the control group (without gastritis). Galectin expression was further analyzed vis à vis the presence or absence of *H. pylori* infection.

Upon analysis of Gal-1 expression in the epithelium and stroma, a significantly higher expression was observed in the stroma (Wilcoxon test, $p < 0.05$) than in the epithelium (Figure 1A) (Figures 2A and 2B). There was no significant difference when grouping the patients into control group, chronic gastritis or active gastritis groups (Kruskal-Wallis test/Dunn test; $p > 0.05$) (Figure 1A). Nevertheless, there was no significant difference in this galectin when it was grouped according to the presence or absence of *H. pylori* infection (Mann-Whitney test; $p > 0.05$) (Figure 1B).

Gal-3 was significantly more expressed in the stroma of biopsies of patients with active gastritis in comparison with the group of patients with chronic gastritis and the control group (Kruskal-Wallis test; $p = 0.0086$) (Figure 1C) (Figure 2C). Similarly, there was a significant increase in Gal-3 expression in the stroma of biopsies of patients with *H. pylori* infection in relation to patients without infection (Mann-Whitney test; $p = 0.0125$) (Figure 1D). However, there was no significant difference in Gal-3 distribution in the epithelium in comparison with the stroma (Wilcoxon test; $p > 0.05$) (Figure 1C) (Figure 2D).

Expression of Gal-9 was significantly higher in the epithelium than in the stroma (Wilcoxon test, $p < 0.05$) (Figure 1E) (Figure 2E). When patients were grouped into control group, chronic gastritis or active gastritis groups, there was no significant difference (Kruskal-Wallis test; $p > 0.05$) (Figure 1E). Moreover, there was no significant difference in this galectin

when grouped according to the presence or absence of *H. pylori* infection (Mann-Whitney test; $p>0.05$) (Figure 1F).

The density of mast cells was evaluated in the antrum biopsies (Figure 2F). No significant differences were observed when patients were grouped based on the nature of the inflammatory process or on the presence of *H. pylori* infection. No significant correlation between the density of mast cells and the expression of the galectins studied herein (Spearman; $p>0,05$) (data not shown).

Discussion

In this study, mast cell density and *in situ* expression of galectins 1, 3 and 9 were assessed by immunohistochemistry in 44 gastric antrum biopsy samples of patients with chronic gastritis, active gastritis and control group. The presence or absence of *H. pylori* was also examined by PCR. Gal-1, Gal-3 and Gal-9 were expressed both in the glandular epithelium and in the gastric antrum stroma, with each galectin showing a particular pattern of expression in these two compartments.

Gal-3 expression in the stroma was significantly higher in patients with active gastritis in this study. Studies show that the active gastritis is usually associated with *H. pylori* infection marked by infiltration of polymorphonuclear cells [1]. Various immune cells can express Gal-3 [42, 43]. In neutrophils, Gal-3 appears to contribute to laminin adhesion and even activate the respiratory burst of the cells [26]. Therefore, in addition to contributing to neutrophil migration, Gal-3 plays a role in host defense mechanism. In this study, Gal-3 expression was significantly higher in patients with active gastritis that had been infected by *H. pylori*. Studies show a significant adhesion of that galectin to the O-antigen carbohydrate structure of *H. pylori* [14]. Other authors point out that *H. pylori* infection stimulates rapid

secretion of Gal-3 by gastric epithelial cells [32, 44] and that this adhesion may influence the severity of the disease [33]. The biological properties of Gal-3 described herein suggest that it may contribute to the adhesion of *H. pylori* to gastric mucosa and, at the same time, increase recruitment and promote activation of immune response cells. The increased confluence of Gal-3 in biopsies positive for *H. pylori* and a higher inflammatory infiltrate corroborate this hypothesis.

Nonetheless, an increase in Gal-3 expression has been observed in several types of human tumors [45, 29, 42], including gastric cancer [46, 47]. Moreover, malignant gastric tissues express an increase in Gal-3 in comparison with normal tissues [48].

However, the expression of this galectin appears to be contradictory, since other authors found a decrease in Gal-3 in gastric cancer and have pointed galectin as an unfavorable prognosis in gastric cancer [31]. Diversification of Gal-3 expression is also associated with the location of its expression. Galectin-3 can be found both in the intracellular space and in the extracellular space, such as on the cell surface or in the extracellular matrix, and its location depends on the tissue type, cell type, proliferative state, and level of cellular differentiation [49]. In this study, Gal-3 was similarly expressed in the epithelium and stroma.

The expression of Gal-1, which has important immunomodulatory and anti-inflammatory properties [50], was investigated in this study. There was a significantly higher expression of Gal-1 in the stroma than in the epithelium. In another study, a discrete expression of Gal-1 was observed in the stroma and absent in the epithelium in biopsies of control patients and patients with chronic gastritis. On the other hand, gastric cancer patients showed a strong expression of Gal-1 in the stroma and in the epithelium [19].

In this study, Gal-1 expression, grouped by the presence and nature of the inflammatory process showed no significant difference in either compartment, epithelium and stroma. Similarly, there were no differences when patients were grouped based on the

presence of *H. pylori* infection. These data suggest that neither the inflammation nor the presence of bacteria affect the modulation of Gal-1 expression.

The biological properties of Gal-9 are the same as those of Galectins -1 to -8. In addition to chemotactic activity for eosinophils, Gal-9 expression seems to be modulated differently in several tumors [51, 52]. In this study, the expression of Gal-9 among patients grouped according to the presence and nature of inflammation did not show any significant difference in the epithelium or stroma. Similarly, no significant difference was observed when patients were grouped based on the presence or absence of *H. pylori* infection. However, Gal-9 expression was significantly higher in the epithelium than in the stroma, regardless of the nature of inflammatory process found or the presence of *H. pylori* infection. Therefore, an inversion in the intensity of expression in the epithelium and stroma was observed between Gal-1 and Gal-9 and, like the former, Gal-9 modulation was not dependent on the nature of inflammation or on *H. pylori* infection.

Furthermore, the density of mast cells was also assessed in this study, and no significant differences were observed when grouping patients by nature of inflammation or by presence of *H. pylori* infection. The tests showed no significant correlations between the density of mast cells and the expression of the galectins studied herein. Although some studies show a role of Gal-3 in mast cell biology [53], in our study, there was no correlation between this galectin and mast cells.

Therefore, Gal-3 expression was significantly higher in both the active chronic inflammatory process, as well as associated with *H. pylori* infection. The expression of Gal-1 and Gal 9 independent of inflammation or *H. pylori* infection there was no significant difference.

Conclusion

Modulation of Gal-3 is expression is associated with *H. pylori* infection and with the inflammatory process characterized as active gastritis.

Acknowledgements

We thank University of Uberaba (UNIUBE) and Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM/CEFORES) and FAPEMIG, CNPq and CAPES for financial support.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest in conducting this work.

References

- [1] Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P., 1996. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system. *Am J Surg Pathol.* 20, 1161-81.

- [2] Castro, L.P., Oliveira, C.A., Prolla J.C., Novaes de Magalhães A.F., Marcondes de Rezende J., 1991. Sistema Sydney: uma nova classificação das gastrites. *Gastroenterol Endosc Dig.* 10, 75-82.

- [3] Kayaçetin, S., Guresçi, S., 2014. What is gastritis? What is gastropathy? How is it classified? *Turk J Gastroenterol.* 25, 233-47.

- [4] Nordenstedt, H., Graham, D.Y., Kramer, J.R., Rugge, M., Vertovsek, G., Fitzgerald, S., Alsarraj, A., Shaib, Y., Velez, M.E., Abraham, N., Anand, B., Cole, R., El-Serag, H.B., 2013. *Helicobacter pylori*-Negative. Gastritis: Prevalence and Risk Factors. *AM J Gastroenterol.* 108, 65-71.

- [4] Marshall, B.J., Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 8390, 1311-5.

- [5] Warren, J.R., Marshall, B.J., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 8390, 1311-5.
- [6] Mizuno, T., Ando, T., Nobata, K., Tsuzuki, T., Maeda, O., Watanabe, O., 2005. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J Gastroenterol*. 40, 6305-11.
- [7] Correa, P., 1995. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1, 37-43.
- [8] Sipponen, P., Hyvarinen, H., 1993. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol*. 196, 3-6.
- [9] Israel, D.A., Peek, R.M., 2001. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther*. 15, 1271-90.
- [10] Norling, L.V., Perretti, M., Cooper, D., 2009. Endogenous galectins and control of the host inflammatory response. *J Endocrinol*. 201, 169-184.
- [11] Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T., Iacobelli, S., 2002. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response. *Trends Immunol*. 23, 313-20.
- [12] Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qjan, Y., Poirier, F., 2004. Introduction galectins. *Glycoconj*. 19, 433-40.

- [13] Cvejic, D., Savin, S., Petrovic, I., Paunovic, I., Tatic, S., Krgovic, K., Havelka, M., 2005. Galectin-3 expression in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Histopathology*. 47, 209-214.
- [14] Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H., 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 269, 20807-10.
- [15] Chen, H.Y., Fermin, A., Verdhana, S., Weng, I.C., Lo, K.F.R., Chang, E.Y.C., Maverakis, E., Yang, R.Y., Hsu, D.K., Dustin, M.L., Liu, F.T., 2009. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci*. 106, 14496-14501.
- [16] Chen, J., Zhou, S.J., Zhang, Y., Zhang, G.Q., Zha, T.Z., Feng, Y.Z., Zhang, K., 2013. Clinicopathological and prognostic significance of galectin-1 and vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 19, 2073-9.
- [17] Rabinovich, G.A., Iglesias, M.M., Modesti, N.M., Castagna, L.F., Wolfenstein-Todel, C., Riera, C.M., Sotomayor, C.E., 1998. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol*. 160, 4831-40.
- [18] Rossi, A.F.T., Duarte, M.C., Poltronieri, A.B., Valsechi, M.C., Jorge, I.C., Neto, D.S., Rahal, P., Oliani, S.M., Silva, A.E., 2014. Deregulation of Annexin-A1 and Galectin-1 Expression in Precancerous Gastric Lesions: Intestinal Metaplasia and Gastric Ulcer. *Mediators Inflamm*. doi: 10.1155/2014/478138.

- [19] Jorge, Y.C., Mataruco, M.M., Araújo, L.P., Rossi, A.F.T., Oliveira, J.G., Valsechi, M.C., Caetano, A., Miyazaki, K., Fazzio, C.S.J., Thome, J.A., Rahal, P., Olini, S.M., Silva, A.E., 2013. Expression of Annexin-A1 and Galectin-1 Anti-Inflammatory Proteins and mRNA in Chronic Gastritis and Gastric Cancer. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2013/152860.
- [20] Inohara, H., Akahani, S., Raz, A., 1998. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Experimental cell research.* 245, 294-302.
- [21] Kim, H.R., Lin Hm, B.H., Raz, A., 1999. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer research.* 59, 4148-4154.
- [22] Nangia-Makker, P., Honjo, Y., Sarvis, R., Akahani, S., Hogan, V., Pienta, K.J., Raz, A., 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *The American journal of pathology.* 156, 899-909.
- [23] Lee, J.W., Song, S.Y., Choi, J.J., Choi, C.H., Kim, T.J., Kim, J., Lee, J.H., Kim, B.G., Bae, D.S., 2006. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplásica. *J Cancer Res Clin Oncol.* 132, 241-7.
- [24] Hoyer, K.K., Pang, M., Gui, D., Shintaku, I.P., Kuwabara, I., Liu, F.T., Said, J.W., Baum, L.G., Teitell, M.A., 2004. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *The American journal of pathology.* 164, 893-902.
- [25] Swarte, V.V., Mebius, R.E., Joziase, D.H., Van der Eijnden, D.H., Kraal, G., 1998. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. *Eur J Immunol.* 28, 2846-71.

- [26] Kubarra, I., Liu, F.T., 1996. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol.* 156, 3939-44.
- [27] Karlsson, A., Follin, P., Leffler, H., Dahigren, C., 1998. Galectin-3 activates the NADPH oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood.* 91, 3430-8.
- [28] Yang, R.Y., Hsu, D.K., Liu, F.T., 1996. Expression of galectin-3 modulates T cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 6737-42.
- [29] Hsu, D.k., Dowling, C.A., Jeng, K.C., Chen, J.T., Yang, R.Y., Liu, F.T., 1999. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer.* 81, 519-526.
- [30] Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Kim, H.R., Hoogan, V., Inohara, H., Kagawa, S., Raz, A., 2003. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer.* 63, 8302-11.
- [31] Okada, K., Shimura, T., Suehiro, T., Mochiki, E., Kuwano, H., 2006. Reduced galectin-3 expression is an indicator of unfavorable prognosis in gastric cancer. *Anticancer.* 26, 136976.
- [32] Fowler, M., Thomas, R.J., Atherton, J., Roberts, I.S., High, N.J., 2006. Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. pylori* adhesion. *Cell Microbiol.* 8, 44-54.

[33] Guruge, J.L., Falk, P.G., Lorenz, R.G., Dans, M., Wirth, H.P., Blaser, M.J., Bergi, D.E., Gordon, J.I., 1998. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 3925-3930.

[34] Matsushita, N., Nishi, N., Seki, M., Matsumoto, R., Kuwabara, I., Liu, F.T., Hata, Y., Nakamura, T., Hirashima, M., 2000. Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction. *J Biol Chem*. 275, 8355-8360.

[35] Asakura, H., Kashio, Y., Nakamura, K., Seki, M., Dai, S., Shirato, Y., Abedin, M.J., Yoshida, N., Nishi, N., Imaizumi, T., Saita, N., Toyama, Y., Takashima, H., Nakamura, T., Ohkawa, H., Hirashima, M., 2002. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via INF-gamma-induced galectin-9. *J Immunol*. 169, 5912-5918.

[36] Imaizumi, T., Kumagai, M., Sasaki, N., Kurotaki, H., Mori, F., Seki, M., Nishi, N., Fujimoto, K., Tanji, K., Shibata, T., Tamo, W., Matsumiya, T., Yoshida, H., Cui, X.F., Takanashi, S., Hanada, K., Okumura, K., Yagihashi, S., Wkabayashi, K., Nakamura, T., Hirashima, M., Satoh, K., 2002. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukoc Biol*. 72, 486-491.

[37] Seki, M., Sakata, K.M., Oomizu, S., Arikawa, T., Sakata, A., Ueno, M., Nobumoto, A., Niki, T., Saita, N., Ito, K., Dai, S.Y., Katoh, S., Nishi, N., Tsukano, M., Ishikawa, K., Yamauchi, A., Kucroo, V., Hirashima, M., 2007. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*. 56, 3968-3976.

[38] Jiang, J., Jin, M.S., Kong, F., Cao, D., Ma, H.X., Jia, Z., Wang, Y.P., Suo, J., Cao, X., 2013. Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. PloS One. doi: 10.1371/journal.pone.0081799.

[39] Yang, J., Zhu, L., Cai, Y., Suo, J., Jin, J., 2014. Role of down regulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. Int J. Oncol. 45, 1313-20.

[40] Muniz, J.M., Borges, C.R.B., Beghini, M., Araújo, M.S., Alves, P.M., Lima, L.M.B., Pereira, S.A.L., Nogueira, R.D., Napimoga, M.H., Rodrigues, V., 2015. Galectin-9 as an important marker in the differential diagnosis between oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia and oral lichen planus. Immunobiology. 220, 1006-11.

[41] Riley, L.K, Franklin C.L, Hook JR R.R, Besch-Williford C., 1996 Identification of murine *Helicobacters* by PCR and restriction enzyme analyses. J Clin Microbiol, v. 34, p. 9429-9446.

[42] Lotan, R., Belloni, P.N., Tressler, R.J., Lotan, D., Xu, X.C., Nicolson, G.L., 1994. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. Glycoconj J. 11, 462-468.

[43] Baum, L.G., Pang, M., Seilhamer, J.J., Levine, W.B., 1995. Synthesis of an endogeneous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. Glycoconj J. 12, 63-68.

- [44] Edwards, N.J., Monteiro, M.A., Faller, G., Walsh, E.J., Moran, A.P., Roberts, I.S., High, N.J., 2000. Lewis X structures in the O-antigen side chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. *Mol Microbiol.* 35, 1530-1539.
- [45] Zhang, H., Liang, X., Duan, C., Liu, C., Zhao, Z., 2014. Galectin-3 as a marker and potential therapeutic target in breast cancer. *PloS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0103482.
- [46] Baldus, S.E., Zirbes, T.K., Weingarten, M., Fromm, S., Glossmann, J., Hanisch, F.G., Monig, S.P., Schoder, W., Flucke, U., Thiele, J., holscher, A.D., Dienes, H.P., 2000. Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. *Tumour Biol.* 21, 258-66.
- [47] Miyazaki, J., Hokari, R., Kato, S., Tsuzuki, Y., Kawaguchi, A., Nagao, S., Itoh, K., Miura, S., 2002. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. *Oncol Rep.* 9, 1307-12.
- [48] Kim, S.J., Choi, I.J., Cheong, T.C., Lee, S.J., Lotan, R., Park, S.H., Chun, H.K., 2010. Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. *Gastroenterology.* 138, 1035-45.
- [49] Moutsatsos, I.K., Davis, J.M., Wang, J.L., 1986. Endogenous lectins from cultured cells: subcellular localization of carbohydrate-binding protein 35 in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 102, 477-483.

[50] Rabinovich, G.A., Sotomayor, C.E., Riera, C.M., Bianco, I., Correa, S.G., 2000. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol.* 30, 1331-9.

[51] Okudaira, T., Hirashima, M., Ishikawa, C., Makishi, S., Tomita, M., Matsuda, T., 2007. A modified version of galectin-9 suppresses cell growth and induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines. *International. Journal. Cancer.* 120, 2251-2261.

[52] Wiersma, V.R., de Bruyn, M., Helfrich, W., Bremer, E., 2013. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. *Medicinal. Research. Reviews.* 33, 102-126.

[53] Chen, H.Y., Sharma, B.B., Yu, L., Zuberi, R., Weng, I.C., Kawakami, Y., Kawakami, T., Hsu, D.K., Liu, F.T., 2006. Role of Galectin-3 in Mast Cell Functions: Galectin-3-Deficient Mast Cells Exhibit Impaired Mediator Release and Defective JNK Expression. *The Journal of Immunology.* 8, 4991-4997.

Figure 1 Legends

Figure 1A. Density distribution of Gal-1 expression in the epithelium and stroma in gastric antrum biopsies grouped according to the presence or absence of gastritis. The horizontal line represents the median, the bar represents the dispersion of 25-75%, and the vertical line represents the dispersion of 10-90%. (Wilcoxon test, $p < 0.05$) (Kruskal-Wallis test/Dunn test, $p > 0.05$).

Figure 1B. Density distribution of Gal-1 expression in gastric antrum biopsies in patients with presence or absence of *H. pylori*. The horizontal line represents the median, the bar represents the dispersion of 25-75%, and the vertical line represents the dispersion of 10-90%. (Mann-Whitney test; $p > 0.05$).Figure 1B.

Figure 1C. Density distribution of Gal-3 expression in the epithelium and stroma in gastric antrum biopsies grouped according to presence or absence of gastritis. The horizontal line represents the median, the bar represents the dispersion of 25-75%, and the vertical line represents the dispersion of 10-90%. (Wilcoxon test; $p > 0.05$) (Kruskal-Wallis test, $p = 0.0086$).

Figure 1D. Density distribution of Gal-3 expression in gastric antrum biopsies in patients with presence or absence of *H. pylori*. The horizontal line represents the median, the bar represents the dispersion of 25-75%, and the vertical line represents the dispersion of 10-90%. (Mann-Whitney test; $p=0.0125$).

Figure 1E. Density distribution of Gal-9 expression in the epithelium and stroma in gastric antrum biopsies in patients grouped according to presence or absence of gastritis. The horizontal line represents the median, the bar represents the dispersion of 25-75%, and the vertical line represents the dispersion of 10-90%. (Wilcoxon test, $p<0.05$) (Kruskall Wallis test/Dunn test, $p>0.05$).

Figure 1F. Density distribution of Gal-9 expression in gastric antrum biopsies in patients with presence or absence of *H. pylori*. The bar represents the median, the bar represents the dispersion of 25-75%, and the vertical line represents the dispersion of 10-90%. (Mann-Whitney test; $p>0.05$).

Figure 2 Legends

Expression of galectins and mast cells in gastric antrum biopsies in patients with chronic and active gastritis.

2A. Immunostaining of Gal-1 in the stroma of the gastric antrum of patients with active gastritis (40X).

2B. Immunostaining of Gal-1 in the stroma of the gastric antrum of patients with chronic gastritis (40X).

2C. Immunostaining of Gal-3 in the gastric antrum of patients with active gastritis (40X).

2D. Immunostaining of Gal-3 at a lower magnification (20X), distributed both in the epithelium and in the stroma of the gastric antrum.

2E. Immunostaining of Gal-9 in the epithelium of the gastric antrum of patients without gastritis (40X).

2F. Mast cells stained with toluidine blue (100X).

Figura 1

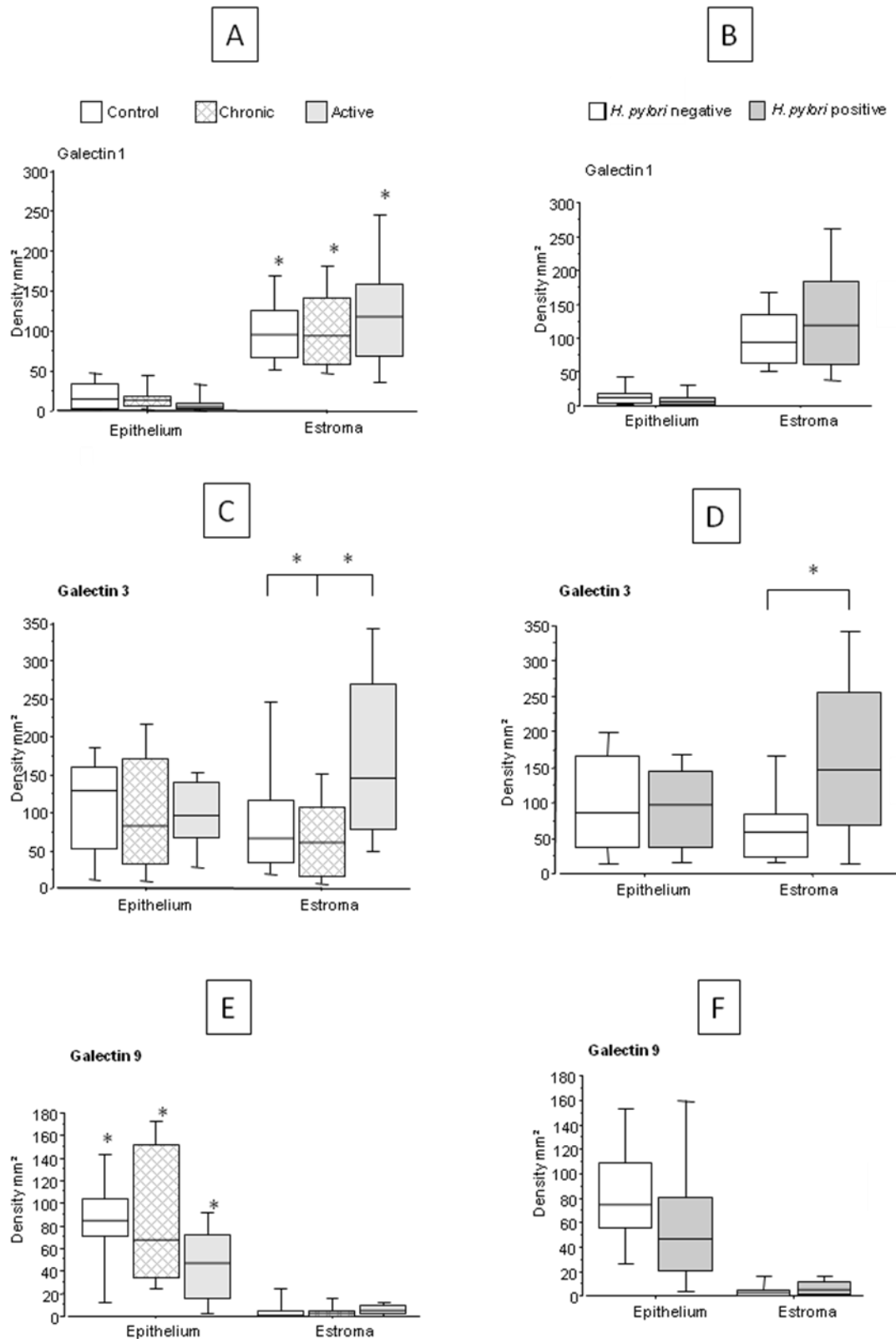
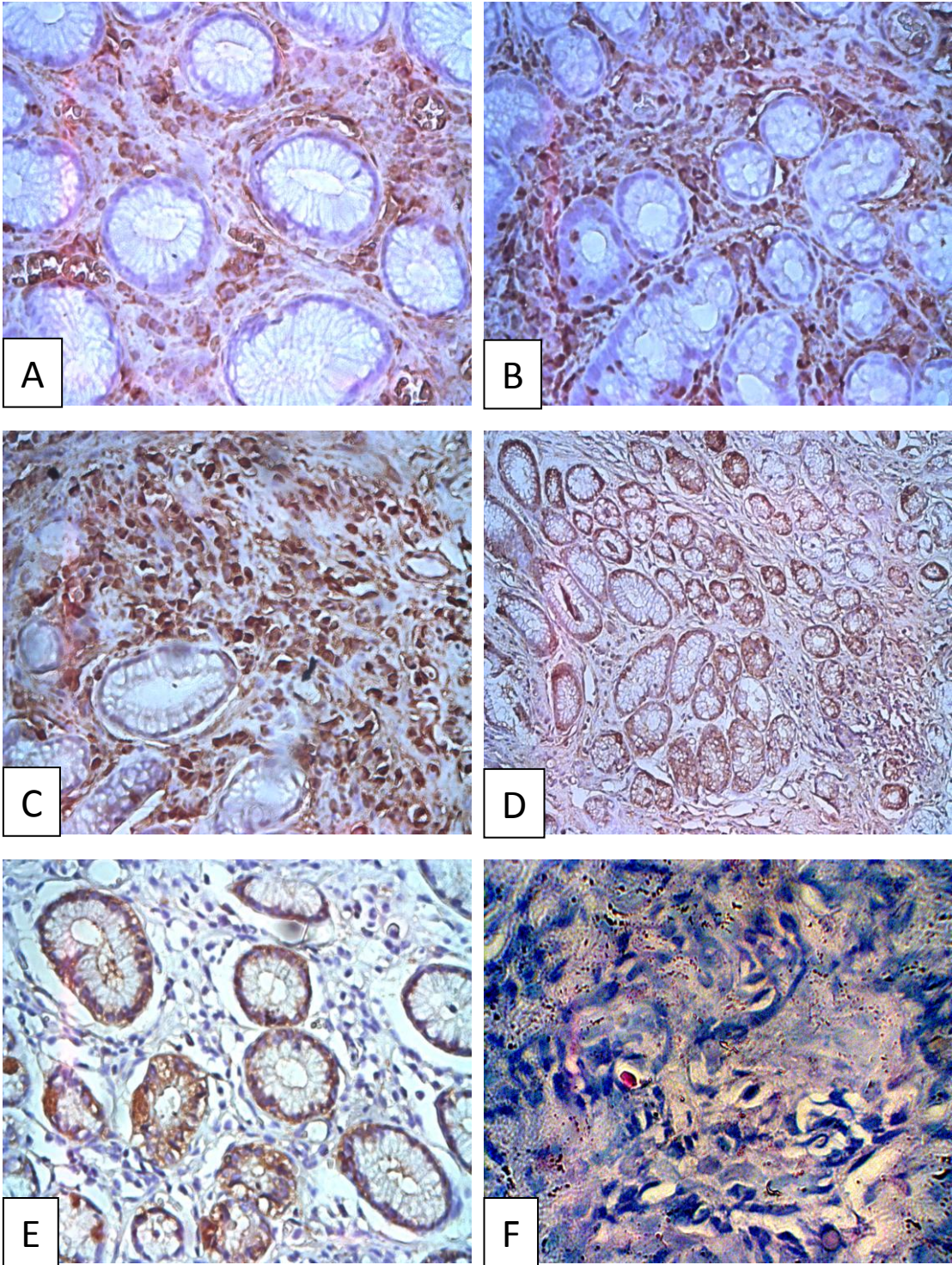


Figura 2



6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allaker, R.P. et al., 2002. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol.* 51, 312-7.

Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H., 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 269, 20807-10.

Baum, L.G. et al., 1995. Synthesis of an endogeneous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation. *Glycoconj J.* 12, 63-68.

Betka, J., Smetana, K.J.R., Gabius, H.J., 2003. An endogenous lectin, as a tool for monitoring cell differentiation in head and neck carcinomas with implications for lectin-glycan functionality. *Acta oto-laryngologica.* 123, 261-263.

Blaser, C et al., 1998. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J immunol.* 28, 2311-2319.

Blaser, M.J., Berg, D.E., 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest.* 107, 767-73.

Castro, L.P., Oliveira, C.A., Prolla J.C., Novaes de Magalhães A.F., Marcondes de Rezende J., 1991. Sistema Sydney: uma nova classificação das gastrites. *Gastroenterol Endosc Dig.* 10, 75-82.

Castro, M.A.Y., 2009. Expressão da galectina 1 e 3 na Leucemia Mielóide Crônica e sua progressão para a doença. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. 167f.

Chen, H.Y. et al., 2009. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 14496-14501.

Chen, J. et al., 2013. Clinicopathological and prognostic significance of galectin-1 and vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 19, 2073-9.

Correa, P., 1995. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1, 37-43.

Cover, T.L., Blaser, M.J., 1996. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv Intern Med.* 41, 85-117.

Cvejic, D., Savin, S., Petrovic, I., Paunovic, I., Tatic, S., Krgovic, K., Havelka, M., 2005. Galectin-3 expression in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Histopathology.* 47, 209-214.

Dumic, J., Dabelic, S., Flogel, M., 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 1760, 616-635.

Fuertes, M.B. et al., 2004. Regulated expression of galectin-1 during T-cell activation involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and p70S6 kinase. *Mol Cell Biochem.* 267, 177-185.

Goodwin, C.S., 1989. *Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 8670, 1019-20.

Goodwin, C.S. et al., 1985. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol.* 19, 257-67.

Grubel, P. et al., 1997. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 35, 1300-3.

Helena Nordenstedt, M.D. et al., 2013. *Helicobacter pylori*-Negative. Gastritis: Prevalence and Risk Factors. *AM J Gastroenterol.* 108, 65-71.

Hirabayashi, J. et al., 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 1572, 232-254.

Hoyer, K.K. et al., 2004. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *The American journal of pathology.* 164, 893-902.

Imaizumi, T. et al., 2002. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 72, 486-491.

Inohara, H., Akahani, S., Raz, A., 1998. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Experimental cell research*. 245, 294-302.

Israel, D.A., Peek, R.M., 2001. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther*. 15, 1271-90.

Jiang, J. et al., 2013. Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PloS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0081799.

Jorge, Y.C et al., 2013. Expression of Annexin-A1 and Galectin-1 Anti-Inflammatory Proteins and mRNA in Chronic Gastritis and Gastric Cancer. *Mediators Inflamm*. doi: 10.1155/2013/152860.

Kashio, Y. et al., 2003. Galectin-9 Induces Apoptosis Through the Calcium-Calpain-Caspase-1 Pathway¹. *The Journal of Immunology*. 170, 3631-3636.

Kayaçetin, S., Guresçi, S., 2014. What is gastritis? What is gastropathy? How is it classified? *Turk J Gastroenterol*. 25, 233-47.

Kim, H.R., Lin Hm, B.H., Raz, A., 1999. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer research*. 59, 4148-4154.

Kusters, J.G., Van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 19, 449-90.

Lee, J.W. et al., 2006. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplásica. *J Cancer Res Clin Oncol.* 132, 241-7.

Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qjan, Y., Poirier, F., 2004. Introduction galectins. *Glycoconj.* 19, 433-40.

Liu, F.T., Rabinovich, G.A., 2005. Galectinas como moduladores da progressão do tumor. *Nat Ver Cancer.* 5, 29-41.

Liu, F.T., Rabinovich, G.A., 2010. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann NY Acad Sci.* 1183, 158-82.

Lotan, R. et al., 1994. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. *Glycoconj J.* 11, 462-468.

Marshall, B.J. et al., 1990. Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology.* 99, 697-702.

Matsushita, N. et al., 2000. Requirement of divalent galactoside-binding activity of ecalectin/galectin-9 for eosinophil chemoattraction. *J Biol Chem.* 275, 8355-8360.

Metcalf, D.D., 2008. Mast cells and mastocytosis. *Blood.* 112, 946-65.

Mizuno, T. et al., 2005. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J Gastroenterol.* 40, 6305-11.

Moutsatsos, I.K., Davis, J.M., Wang, J.L., 1986. Endogenous lectins from cultured cells: subcellular localization of carbohydrate-binding protein 35 in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 102, 477-483.

Nangia-Makker, P. et al., 2000. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *The American journal of pathology.* 156, 899-909.

Nguyen, T.N., Barkun, A.N., Fallone, C.A., 1999. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter.* 4, 185-97.

Norling, L.V., Perretti, M., Cooper, D., 2009. Endogenous galectins and control of the host inflammatory response. *J Endocrinol.* 201, 169-184.

O'Toole, P.W., Lane, M.C., Porwollik, S., 2000. . *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect.* 2, 1207-14.

Okada, K., Shimura, T., Suehiro, T., Mochiki, E., Kuwano, H., 2006. Reduced galectin-3 expression is an indicator of unfavorable prognosis in gastric cancer. *Anticancer.* 26, 136976.

Plzak, J. et al., 2004. Galectin-3—an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *European Journal of cancer.* 40, 2324-2330.

Rabinovich, G.A. et al., 1998. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol.* 160, 4831-40.

Rabinovich, G.A. et al., 2002. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response. *Trends Immunol.* 23, 313-20.

Rabinovich, G.A., Sotomayor, C.E., Riera, C.M., Bianco, I., Correa, S.G., 2000. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol.* 30, 1331-9.

Rodewald, H.R., Feyerabend, T.B., 2012. Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction? *Immunity.* 37, 13-24.

Rossi, A.F.T. et al., 2014. Deregulation of Annexin-A1 and Galectin-1 Expression in Precancerous Gastric Lesions: Intestinal Metaplasia and Gastric Ulcer. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2014/478138.

Seki, M. et al., 2007. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism.* 56, 3968-3976.

Shi, R. et al., 2008. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. *Helicobacter.* 13, 157-65.

Sipponen, P., Hyvarinen, H., 1993. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol.* 196, 3-6.

Teymoortash, A., Pientka, A., Schrader, C., Tiemann, M., Werner, J.A., 2006. Expression of galectin-3 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck and its relationship with distant metastasis. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 132, 51-56.

Wang, L., Inhorro, H., Pienta, K.J., Raz, A., 1995. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 217, 292-303.

Warren, J.R., Marshall, B.J., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 8390, 1311-5.

Woodward, M., Morrison, C., Mccoll, K., 2000. An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Epidemiol.* 53, 175-81.

Yang, J., Zhu, L., Cai, Y., Suo, J., Jin, J., 2014. Role of down regulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. *Int J. Oncol.* 45, 1313-20.