

UNIVERSIDADE DE UBERABA

**“ESTUDO DO *Helicobacter pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA:
HISTÓRIA CLÍNICA, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA, EXAME
ANATOMOPATOLÓGICO E RESPOSTA IMUNE”**

EMERSON ABDULMASSIH WOOD DA SILVA

UBERABA

2014

EMERSON ABDULMASSIH WOOD DA SILVA

**“ESTUDO DO *Helicobacter pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA:
HISTÓRIA CLÍNICA, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA, EXAME
ANATOMOPATOLÓGICO E RESPOSTA IMUNE”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Biopatologia, Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: **Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues**

UBERABA

2014

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Silva, Emerson Abdulmassih Wood da.
S38e Estudo do *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica: história clínica, endoscopia digestiva alta, exame anatomopatológico e resposta imune / Emerson Abdulmassih Wood da Silva. – Uberaba, 2014.
109 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2014.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

1. Imunologia. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Estômago - Inflamação. 4. Citocinas. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

CDD 616.079

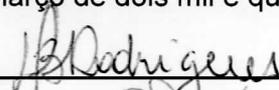
Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia, a que se submeteu o aluno Emerson Abdulmassih Wood da Silva – matrícula 6102932, orientado pela Prof^a. Dr^a. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues.

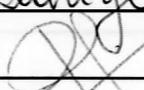
Aos vinte e oito do mês de março do ano de dois mil e quatorze, às 14 horas, na sala 2C06 na Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo Colegiado do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: Denise Bertulucci Rocha Rodrigues - **Presidente**, Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins e Sheila Jorge Adad para julgar o trabalho do candidato Emerson Abdulmassih Wood da Silva, apresentado sob o título: **“ESTUDO DO *Helicobacter pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA: HISTÓRIA CLÍNICA, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA, EXAME ANATOMOPATOLÓGICO E RESPOSTA IMUNE.”** O Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir o candidato dissertou sobre o seu trabalho e foi arguida pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas arguições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

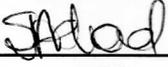
APROVADO

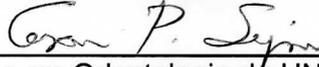
REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOPATOLOGIA, a versão final da dissertação, considerada aprovada devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Odontologia, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno Aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, O Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, vinte e oito dias do mês de março de dois mil e quatorze.

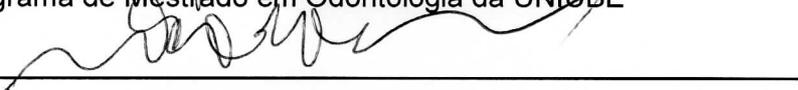
Prof^a. Dr^a. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues 

Prof^a. Dr^a. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins 

Prof^a. Dr^a. Sheila Jorge Adad 

Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri 
Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Flávia Michele da Silva 
Secretária do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Ciência do Aluno: 

DEDICATÓRIA

À minha esposa Natalia, amiga, companheira e pela cumplicidade de todos os momentos vividos.

Aos meus filhos Larissa, Bruno e Guilherme pela luz de vida que sempre me trouxeram.

À minha mãe Helena, com o seu eterno carinho para comigo e irmãos e ao meu pai Prof. Mário (*in memoriam*) portador de uma cultura invejável e incentivador permanente de todas as minhas conquistas.

Aos meus irmãos Margaret, Anderson, Joyce e Mário Jr. pela segurança de família que sempre tivemos.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Primeiramente a Deus, pela existência e possibilidade de concluir mais uma etapa da minha vida.
- ✓ À Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues, minha orientadora, que com paciência e carinho e competência me ajudou a concluir este estudo.
- ✓ Ao Dr. Wesley Marques de Melo que mobilizou a sua clínica para realização dos exames de endoscopia com boa vontade, dedicação e profissionalismo.
- ✓ À Profa. Dra. Sheila Adad pela imensa colaboração, amizade e incentivo realizando os exaustivos e detalhados exames anatomopatológicos dos pacientes e ainda cedendo fotos dos exames para engrandecimento deste trabalho.
- ✓ Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues que com a sua experiência e competência colaborou com a conclusão deste estudo.
- ✓ Ao Prof. Dr. Daurin Narciso da Fonseca que foi bastante prestativo ao permitir trabalhar com os pacientes de seu Serviço de Endoscopia Digestiva Alta da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
- ✓ Às Doutoradas Iracema Saldanha Junqueira, Jussara Gonçalves e Rosemary Nomelini,
- ✓ médicas do Serviço de Endoscopia Digestiva da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que mostraram entusiasmo e dedicação na coleta de material dos pacientes.
- ✓ Aos funcionários do Serviço de Endoscopia e do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que sem a participação deles não teria conseguido concluir este trabalho.
- ✓ A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo e que não foram citados aqui.
- ✓ Aos pacientes que aceitaram participar deste trabalho e com boa vontade nos forneceram dados preciosos.

RESUMO

RESUMO

INTRODUÇÃO: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria altamente prevalente em nosso meio e está diretamente envolvida em várias doenças do trato digestivo superior como gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico. Muito se tem estudado acerca da agressividade desta bactéria na etiopatogenia principalmente do câncer gástrico. E neste estudo foram pesquisados dados preditivos do ponto de vista clínico, endoscópico, anatomopatológico bem como os mecanismos da resposta imune frente à presença desta bactéria. **OBJETIVOS:** Estudar a presença de infecção por *H. pylori* na mucosa gástrica com a história clínica, antecedentes clínicos, doenças concomitantes, dados no exame de endoscopia digestiva alta (EDA) do exame anatomopatológico (EAP) e da resposta imune. **METODOLOGIA:** Foram avaliados 126 pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta com queixas clínicas do trato digestivo superior. Para este estudo, antes da realização do exame de endoscopia digestiva alta foi feito um questionário clínico, e durante o exame endoscópico, realizaram-se biópsias múltiplas do esôfago, corpo e antro gástrico e teste rápido da urease. O material obtido das biópsias foi levado ao laboratório de patologia para exame anatomopatológico e em parte do material obtido do corpo gástrico de 49 pacientes, escolhidos de modo randomizado, foi feito um estudo da resposta imune através da realização da PCR em tempo real para quantificar a expressão de *mRNA* para citocinas e fatores de transcrição. **RESULTADOS:** Não encontramos nenhum dado clínico que pudesse estar relacionado à presença do *H. pylori* no estômago. Achados endoscópicos tiveram relevância com a presença e ausência da bactéria, isto é, estômago normal, ausência da bactéria e alterações endoscópicas com a presença da bactéria. Já no exame anatomopatológico tanto a gastrite no corpo gástrico e no antro gástrico tiveram significância com a positividade da bactéria ($p < 0,05$). O *H. pylori* esteve presente no antro gástrico de 42 (33,3%) dos 126 pacientes pelo EAP. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa na expressão do IFN- γ , IL-4, IL-10, essas citocinas foram detectadas nos paciente com gastrite e com infecção pelo *H. pylori* juntamente com a expressão dos seus fatores de transcrição (T-bet, GATA-3 e FoxP3). Existiu uma correlação positiva entre as citocinas do padrão Th1, Th2, Treg com seus respectivos fatores de transcrição. A IL-17 foi

significativamente maior nas biópsias da mucosa do corpo gástrico dos pacientes com mais intenso processo inflamatório local. CONCLUSÕES: O *H. pylori* não mostrou nenhum fator clínico preditivo de infecção. No exame de endoscopia digestiva alta destacaram-se dados do laudo do exame como sugestivos de provável infecção da bactéria e o exame anatomopatológico mostrou-se necessário para classificar as diferentes gastrites e/ou alterações histopatológicas provocadas pela bactéria. A IL-17 pareceu ser a principal interleucina responsável pela manutenção do processo inflamatório crônico gástrico em pacientes infectados pelo *H. pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, gastrite, citocinas, fatores de transcrição.

ABSTRACT

ABSTRACT

BACKGROUND: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a highly prevalent bacteria in our environment and is directly involved in various diseases of the upper digestive tract such as gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Much has been studied about the aggressiveness of this bacterium in the pathogenesis of gastric cancer mainly. And this study predictive data from a clinical, endoscopy, pathology and mechanisms of the immune response due to the presence of this bacterium were investigated. **AIMS:** To study the presence of *H. pylori* infection in gastric mucosa with clinical history, medical history, concomitant diseases, examination of data in endoscopy (EDA) histopathological examination (EAP) and the immune response. **METHODOLOGY:** 126 patients undergoing upper endoscopy examination with clinical complaints of the upper digestive tract were evaluated. For this study, before the examination of upper gastrointestinal endoscopy was done a clinical questionnaire and during the endoscopic examination, there were multiple biopsies of the esophagus, gastric body and antrum and rapid urease test. The material obtained from the biopsies was taken to the pathology laboratory for pathological examination and in part from material obtained from the gastric body of 49 patients, selected randomly allocated to a study of the immune response was done by performing the real-time PCR to quantify *mRNA* expression for cytokines and transcription factors. **RESULTS:** We found no clinical symptom that could be related to the presence of *H. pylori* in the stomach. Endoscopic findings have relevance to the presence and absence of bacteria, i.e. normal stomach, the absence of bacteria and endoscopic changes with the presence of bacteria. You either pathological examination gastritis in the gastric body and antrum were significant with the positivity of bacteria ($p < 0.05$). *H. pylori* was present in the gastric antrum of 42 (33.3%) of 126 patients in EAP. Although no significant difference was found in the expression of IFN- γ , IL-4, IL-10, these cytokines were detected in patients with gastritis and *H. pylori* infection by the expression along with its transcription factors (T-bet GATA-3 and FoxP3). There was a positive correlation between cytokines of Th1, Th2, Treg with their respective transcription factors. IL -17 was significantly greater in mucosal biopsies of patients with gastric body more intense local inflammatory process. **CONCLUSIONS:** The *H. pylori* showed no clinical factor predictive of infection. On examination of endoscopy stood out data from the test as suggestive of probable infection of the bacteria and the

pathology examination was necessary to classify the different gastritis and/or histopathological changes caused by the bacterium. IL-17 appeared to be the major interleukin responsible for the maintenance of chronic gastric inflammation in patients infected with *H. pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastritis, cytokines, transcription factors

SUMÁRIO

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	2
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT	9
SUMÁRIO.....	13
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	16
LISTA DE TABELAS.....	18
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE GRÁFICOS.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	232
1.1 <i>H. pylori</i> (aspectos gerais)	23
1.2 <i>Helicobacter pylori</i> e afecções no trato gastrointestinal superior.....	25
1.3 Aspectos imunológicos do <i>H. pylori</i> em afecções no trato gastrointestinal superior.	27
2. HIPÓTESE	343
3. OBJETIVOS	365
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. METODOLOGIA.....	38
4.1 Pacientes e amostras biológicas	38
4.2 Distribuição dos pacientes	39
4.3 Critérios de exclusão do estudo	41
4.4 Metodologia da Endoscopia Digestiva Alta	41
4.5 Metodologia do Exame Anatomopatológico	47

4.6 Diagnóstico da infecção pelo <i>H. pylori</i>	51
4.6.1 Teste rápido da urease	51
4.6.2 Pesquisa de <i>H. pylori</i> no exame anatomopatológico.....	52
4.6 Extração de RNA.....	53
4.7 Confeção de cDNA	54
4.8 Reação de PCR em Tempo Real	55
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	587
6. RESULTADOS	59
6.1 Características clínicas da amostra (N=126).....	7360
6.2 Características clínicas da amostra em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e/ou corpo gástrico pesquisado através do Exame Anatomopatológico (EAP) (N=126).	7360
6.3 Características endoscópicas da amostra em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e/ou corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126).	73
6.4 Características da amostra no EAP em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e/ou corpo gástrico (N=126).	7368
6.4.1 Esôfago (EAP).....	68
6.4.2 Corpo gástrico (EAP)	68
6.4.3 Antro gástrico (EAP).....	73
6.5 - Características imunológicas da amostra em relação à positividade do <i>H. pylori</i>	74
7. DISCUSSÃO	82
8. CONCLUSÕES	887
9. REFERÊNCIAS	890
10. ANEXOS	965
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	96
Autorização	988
Questionário Médico para Pesquisa Clínica	99

Protocolo do Exame de Endoscopia Digestiva Alta	101
Protocolo do Exame Anatomopatológico.	103
Parecer da Diretoria de Pesquisa da UFTM	103
Parecer Consubstanciado do CEP (UNIUBE).....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C: graus Celsius

cagA: gene da citotoxina associada

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DRGE: Doença do Refluxo Gastroesofágico

ER: Esofagite de Refluxo

et al: E colaboradores

H. pylori: *Helicobacter pylori*

IBP: Inibidor de bomba de prótons

IL: Interleucina

Ile: Isoleucina

kDa: Quilodalton

MALT: *Mucosa-associated lymphoid tissue*

MG: Minas Gerais

mg: Miligrama

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial de hidrogênio iônico

RNA: Ácido Ribonucleico

SNP: Polimorfismo de um único nucleotídeo

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

Th: células T helper

TNF: Fator de necrose tumoral

TRL: receptores *toll-like*

U: unidades

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UNIUBE: Universidade de Uberaba

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Códigos de <i>primers</i> taqman utilizados na reação de PCR em tempo real.....	56
Tabela 2 - Comparação de dados clínicos com a presença do <i>H. pylori</i> pesquisado no antro gástrico através do EAP (N=126).....	61
Tabela 3 – Em uso de IBP e positividade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico.....	62
Tabela 4 – Em uso de IBP e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico.....	62
Tabela 5 – Esofagite de refluxo (EDA) pela classificação de Los Angeles (LA) e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP	64
Tabela 6 – Corpo gástrico normal e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP	64
Tabela 7 – Gastrite de corpo gástrico e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP	65
Tabela 8 – Antro gástrico normal e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP	66
Tabela 9 – Classificação da gastrite de antro gástrico e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP.....	66
Tabela 10 - Comparação de positividade do teste da urease realizado no antro gástrico.....	67
Tabela 11 – Corpo gástrico normal (EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo.....	69
Tabela 12 - Gastrite ativa no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico pesquisado (EAP)	69
Tabela 13 - Gastrite crônica no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico pesquisado (EAP).....	70
Tabela 14 - Antro gástrico normal (EAP) e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP	71
Tabela 15 - Gastrite ativa no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP	72
Tabela 16 - Gastrite crônica no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Metodologia utilizada	40
Figura 2 – Esôfago normal	42
Figura 3 - Esofagite erosiva grau B	43
Figura 4 - Estômago normal	44
Figura 5 - Gastrite erosiva antral	44
Figura 6 - Gastrite enantematosa de fundo gástrico	45
Figura 7 - Gastrite nodular.....	45
Figura 8 - Escala analógica visual proposta pela reunião de Houston de 1994, para.....	48
Figura 9 - Gastrite crônica sem atividade inflamatória: infiltrado	48
Figura 10 - Gastrite crônica intensa; presença de folículo linfóide (HE - 40x).....	49
Figura 11 - Foco com atividade inflamatória: neutrófilos permeando o epitélio foveolar	49
Figura 12 - Gastrite com atrofia glandular discreta (grau I ou focal).....	50
Figura 13 – Resultado do teste da urease	51
Figura 14 – Kit teste da urease – laboratório RNA	52
Figura 15 - Numerosos bacilos compatíveis com <i>Helicobacter pylori</i> no interior de.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Frequência da densidade do *H. pylori* no antro gástrico.....67
- Gráfico 2 - Quantidade relativa de *mRNA* da IL-17 agrupados com presença de inflamação nas biópsias da mucosa do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni: $p < 0,05$; $p < 0,05$ respectivamente)..... 74
- Gráfico 3 - Quantidade relativa de *mRNA* da IL-4 agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni: $p = 0,60$; $p = 0,91$; $p = 0,65$, respectivamente)75
- Gráfico 4 - Quantidade relativa de *mRNA* da IFN- γ agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni $p = 0,57$; $p = 0,75$; $p = 0,50$, respectivamente)75
- Gráfico 5 - Quantidade relativa de *mRNA* da IL-10 agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni $p = 0,16$; $p = 0,39$; $p = 0,91$, respectivamente).76

Gráfico 6 - Quantidade relativa de <i>mRNA</i> do IFN, IL4, IL-10 e IL-17 em biópsias da região do corpo do gástrico comparados presença ou ausência da infecção pelo <i>H.pylori</i> (Teste t não pareado: IFN: p= 0,27 ; IL-4: p=0,31 ; IL-10: p=0,55, IL-17:p=0,056).....	76
Gráfico 7 - Quantidade relativa de <i>mRNA</i> da T-bet agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni p=0,54; p=0,64;p=0,39, respectivamente).	77
Gráfico 8 - Quantidade relativa de <i>mRNA</i> da GATA-3 agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni: p=0,08; p=0,27;p=0,91, respectivamente).	77
Gráfico 9 - Número relativo de cópias de <i>mRNA</i> do FoxP3 em biópsias da região do corpo do estômago comparados com o anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite (Bonferroni: p=0,08; p=0,27;p=0,91, respectivamente).....	78
Gráfico 10 - Quantidade relativa de <i>mRNA</i> do T-bet, GATA-3, FoxP3 em biópsias da região do corpo do gástrico comparados presença ou ausência da infecção pelo <i>H.pylori</i> (Teste t não pareado: T-bet: p=0,41, GATA-3: p=0,17; FoxP3: p=0,34).	78
Gráfico 11 – Correlação da IL-10 com a expressão do FoxP3 (p < 0,05).....	79
Gráfico 12 – Correlação da IL-4 com a expressão do GATA-3 (p<0,05).....	79
Gráfico 13 – Correlação da IFN- γ com a expressão do T-bet (p<0,05).....	80

1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa, espiralada, altamente móvel, encontrada na superfície luminal do epitélio gástrico sendo isolada pela primeira vez em 1983 por Warren e Marshall (WARREN; MARSHALL, 1983). Outros estudos para esta bactéria também foram realizados por estes dois autores e posteriormente publicados já no próximo ano (MARSHALL; WARREN, 1984).

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

Em 1989, após estudos ultra estruturais e de análise da sequência de ácidos nucleicos, a bactéria passou a receber a denominação de *Helicobacter* (forma helicoidal), diferenciando do gênero anteriormente enquadrado *Campylobacter* (bastão curvado). A espécie, por ser mais encontrada na mucosa do antro gástrico, próxima ao piloro, por fim ficou sendo chamada de *Helicobacter pylori* (GOODWIN, 1989)

1.1 *H. pylori* (aspectos gerais)

H. pylori apresenta de 3 a 5µm de comprimento e de 0,5 a 1µm de largura. Usualmente tem um formato espiralado, porém pode aparecer como um bastão, enquanto que raramente formas cocoides também podem surgir (KUSTERS; VAN VLIET; KUIPERS, 2006).

A bactéria 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).

O *H. pylori* é provavelmente a infecção bacteriana crônica mais comum nos seres humanos e está presente em quase metade da população mundial. A presença da bactéria na mucosa gástrica é associada com gastrite crônica ativa, está envolvida em doenças gástricas mais graves, incluindo a gastrite crônica atrófica (um dos precursores do carcinoma gástrico), úlcera péptica e de tecido linfoide associado aos linfomas (COVER; BLASER, 1996).

Desde 1994 a Organização Mundial de Saúde estabeleceu ser esta bactéria um fator essencial na patogênese do carcinoma gástrico, isto é, agente carcinogênico tipo I (UEMURA et al., 2001; WEN; MOSS, 2009).

O microrganismo pode sobreviver em ambiente ácido do estômago particularmente devido a sua alta produção de urease que converte a ureia presente no suco gástrico em amônia alcalina e dióxido de carbono (MARSHALL et al., 1990).

O *H. pylori* induz a inflamação crônica da mucosa subjacente e a infecção é geralmente contraída nos primeiros anos de vida e tende a persistir indefinidamente, a menos que seja tratada (EVERHART, 2000).

A transmissão do *H. pylori* pode ocorrer de diferentes formas de pessoa para pessoa: oral-oral (ALLAKER et al., 2002), fecal-oral (GRUBEL et al., 1997), gástrica-oral (NGUYEN; BARKUN; FALLONE, 1999). A cavidade bucal pode ser importante no processo de transmissão da bactéria ou na reinfecção do estômago após ter feito o tratamento de erradicação (DOWSETT; KOWOLIK, 2003).

Sua prevalência aumenta com a idade avançada e com um menor nível socioeconômico durante a infância e, portanto variando consideravelmente em torno do mundo (WOODWARD; MORRISON; MCCOLL, 2000).

A maior prevalência em grupos etários mais velhos faz pensar em piores condições de vida das crianças em décadas anteriores. Pelo menos 50% da população do mundo tem infecção pelo *H. pylori* (EVERHART, 2000; SHI et al., 2008)

No Brasil, a prevalência do *H. pylori* foi estimada em torno de 70%, aumentou com a idade, independe do sexo e foi mais baixa na população branca. Não foi observada relação entre infecção e cigarro, drogas e álcool. Uma relação positiva foi observada com realização

de endoscopia digestiva alta, do tipo de água potável, independente se atualmente ou durante a infância. Maior taxa de infecção também foi observada por falta de vaso sanitário em casa durante a infância. Menor renda familiar e nível de escolaridade demonstrou uma positividade para a infecção. Uma maior associação também foi observada em ambientes com maior aglomeração (ZATERKA et al., 2007).

1.2 *H. pylori* e afecções no trato gastrointestinal superior

O processo básico que o *H. pylori* induz como dano é a gastrite com seus mecanismos imunológicos celulares e humorais. Obviamente a extensão e a distribuição desta gastrite é que determina o resultado clínico e com isto três fenótipos gástricos são identificados. O fenótipo mais comum é uma gastrite simples e benigna, caracterizada por uma pangastrite leve e com um mínimo de perturbação de secreção de ácido gástrico. Este fenótipo é comumente observado em indivíduos que são assintomáticos e que de um modo geral não desenvolvem doenças gastrintestinais severas. O segundo fenótipo é chamado como úlcero duodenal e é responsável por até 15% dos indivíduos infectados, particularmente em países ocidentais onde estes tipos de úlceras são mais comuns. Neste fenótipo a gastrite tem um padrão antral e a produção de ácido clorídrico pelo corpo é mantida e sendo produzida em maior quantidade, pois corpo gástrico é preservado. Uma maior quantidade de úlceras duodenais surge. O terceiro e mais grave fenótipo é o do “fenótipo de câncer gástrico” caracterizado pela presença de gastrite predominante no corpo e atrofia gástrica multifocal com hipo ou acloridria. Estas anormalidades afetam 1% dos indivíduos infectados que desenvolvem inflamação crônica induzida pela infecção e assim aumenta o risco de câncer gástrico. Este fenótipo é mais prevalente em regiões da Ásia, onde este tipo de câncer é mais comum (AMIEVA; EL-OMAR, 2008).

Com isto, a infecção pelo *H. pylori* é um cofator no desenvolvimento de três importantes doenças do trato gastrointestinal superior: úlceras duodenais e gástricas (reportada a desenvolver-se em torno de 1 a 10% dos pacientes infectados), câncer gástrico (em 0,1 a 3%) linfoma tipo MALT (em <0,01%). O risco destas doenças em pacientes infectados varia amplamente entre as populações. A grande maioria dos pacientes com

infecção por *H. pylori* permanecerão assintomáticos e conseqüentemente não terão nenhuma complicação, nem manifestação clínica (MCCOLL, 2010).

Um grande número de estudos foi feito para estudar a relação entre a infecção pelo *H. pylori* e Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), porém esta ainda permanece indefinida. Sabe-se que a infecção por *H. pylori* resulta em diferentes níveis de gravidade e padrões de inflamação gástrica de indivíduo para indivíduo. Isto por sua vez pode conduzir a efeitos variados sobre a secreção de ácido clorídrico. Por exemplo, foi proposto que os pacientes com predominância de gastrite antral, que é o fenótipo mais encontrado nos Estados Unidos, exibem aumento da secreção ácida e estão em risco aumentado de desenvolvimento de úlcera duodenal (hipersecretores). Por outro lado, aqueles indivíduos com gastrite predominante no corpo ou pangastrite tendem a decrescer a secreção ácida gástrica e aumentam o risco de desenvolver câncer (PANDOLFINO; HOWDEN; KAHRILAS, 2004)

Sabe-se que a erradicação desta infecção pode estar associada a um amplo espectro de efeitos sobre a secreção de ácido gástrico, daí se o paciente tem baixa pressão do esfíncter inferior do esôfago ou falha dos mecanismos de *clearance* do esôfago, que predis põem a um maior risco de Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), que sem dúvida, também afetam os resultados. Desta forma, podem-se imaginar cenários onde a erradicação da infecção por *H. pylori* poderia estar associada a um agravamento, nenhuma mudança ou até mesmo melhora da DRGE. Um estudo recente descobriu que a gastrite predominantemente antral foi a mais comum associada ao este fenótipo do *H. pylori* em países ocidentais e que a terapia de erradicação neste subgrupo de pacientes levou a melhorias nas condições de azia e regurgitação no período de um ano de acompanhamento (VAKIL et al., 2006).

Diante das doenças trazidas por esta bactéria foram estabelecidas indicações para o diagnóstico e tratamento do *H. pylori* conforme enunciadas a seguir (CHEY; WONG; PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF, 2007):

Estabelecidas:

- Doença ulcerosa péptica ativa (úlceras gástrica ou duodenal)
- História confirmada de doença ulcerosa péptica (não previamente tratados para *H. pylori*)
- Linfoma gástrico tipo MALT (baixo grau)
- Após ressecção endoscópica de câncer gástrico precoce
- Dispepsia não investigada (dependendo da prevalência de *H. pylori*)

Controversas:

- Dispepsia não ulcerosa
- DRGE
- Pessoas usando anti-inflamatórios não esteroides
- Anemia por deficiência de ferro inexplicada
- Populações com maior risco de câncer gástrico

1.3 Aspectos imunológicos do *H. pylori* em afecções no trato gastrointestinal superior.

O *H. pylori* é reconhecido pelo sistema imunológico inato através dos receptores *toll-like* (TLR) que identificam a sua estrutura molecular. O estímulo dos receptores TLR faz com que uma verdadeira cascata inflamatória seja desencadeada (BLASER; ATHERTON, 2004).

A presença do *H. pylori* no estômago dá início a uma resposta inflamatória inespecífica e daí levando a uma produção de citocinas e quimiocinas pelas células da mucosa gástrica. Estas células reconhecem a presença da bactéria e com isto respondem através dos receptores TLR, como já citado acima (SMITH et al., 2003). Os TLR são moléculas da superfície celular que participam do reconhecimento de padrões de moléculas de patógenos pelo sistema imune inato.

O sistema imunológico adquirido é também ativado pelo *H. pylori* (BAMFORD et al., 1998). E nesta situação o reconhecimento da bactéria necessita de uma apresentação do

antígeno, o qual tem o seu processo de recepção e processamento dificultado pela bactéria (MOLINARI et al., 1998).

O *H. pylori* evita também a proliferação e a ativação dos linfócitos T e induz a sua apoptose (GEBERT et al., 2003).

Fatores genéticos do hospedeiro, além do tipo de cepa bacteriana, parecem determinar respostas inflamatórias inespecíficas que podem interferir em respostas inflamatórias imuno-específicas das células T. Genes de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias têm polimorfismos que podem alterar a transcrição ou a expressão genética. Genes com polimorfismos de IL-1 β e do antagonista receptor de IL-1 (IL-1RA) do hospedeiro modulam os níveis de ativação inflamatória, que podem influenciar a natureza e a extensão da gastrite e a atrofia induzida pelo *H. pylori* (GARCIA-GONZALEZ et al., 2001).

A resistência à infecção e o processo de lesões teciduais estão intimamente relacionadas ao padrão da resposta imune adaptativa gerada e aos seus mecanismos de controle. O primeiro ponto representa a diferenciação da população de linfócitos T auxiliares em pelo menos duas subpopulações polares, denominadas Th1 e Th2 (MOSMANN et al., 1986).

Utilizando clones de linfócitos T murinos antígeno-específicos, foram identificados dois subgrupos distintos de linfócitos T CD4+, caracterizados de acordo com o perfil de citocinas secretadas, abrindo, desta forma, um importante caminho para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da resposta imune associada a doenças (MOSMANN et al., 1986). As células que apresentam secreção de IL-2 e IFN- γ foram denominadas de linfócitos Th1 (linfócitos T auxiliar do tipo 1). As células com produção predominante de IL-4 e IL-5 foram denominadas Th2 (linfócito T auxiliar do tipo 2). Estudos posteriores confirmaram que esses fenótipos distintos de linfócitos T auxiliares também estão presentes em humanos e ainda identificaram uma célula intermediária, que produz citocinas de dois fenótipos polares, denominados Th0 (MAGGI et al., 1988; ROMAGNANI, 1991; UMETSU et al., 1988). Posteriormente, estudos demonstraram uma nova subpopulação denominada Th3 (linfócitos T auxiliar do tipo 3) cujo perfil de citocinas predominante é o TGF- β (Fator de Transformação e Crescimento) (KITANI et al., 2000). O FoxP3 foi identificado como um marcador molecular para células Treg e sua expressão é

essencial para o desenvolvimento e a função dessa célula. Aparentemente, o FoxP3 age estabelecendo e mantendo o programa genético da Treg e funciona como um regulador negativo da ativação de células T e talvez como regulador transcricional de citocinas anti-inflamatórias (FONTENOT et al., 2005). O FoxP3 é requerido para o desenvolvimento de Treg CD25^{high} (FONTENOT, 2003; GAVIN, 2003; RUDENSKY, 2003). Células Tregs surgem no timo e são encontradas no sangue periférico e em órgãos linfóides secundários (VUKMANOVIC-STEJIC, 2002; SMITH, 2002; DUNNE, 2002). Células T reguladoras naturais expressam CD25 constitutivamente. Entretanto, a maioria das T ativadas expressa CD25 com afinidade baixa ou moderada para cadeia α do receptor de IL-2, marcador de ativação das células T. Somente 3% delas expressam CD25 com alta intensidade (CD25^{high}) (WING, 2002; KARLSSON, 2002; RUDIN).

Um regulador chave do desenvolvimento dos Th1 é o T-bet, e foi sugerido que uma célula precursora comum Th1/Th17 poderia se diferenciar por uma via T-bet-dependente (MATHUR et al., 2006). O T-bet é um membro da família de fatores de transcrição da família dos T-box e está aumentado nas células Th1 em desenvolvimento, mas não nas células Th2, e é crucial para a expressão otimizada de IFN- γ e IL-12 (VELDHOEN; STOCKINGER, 2006). A expressão de T-bet pode ser estimulada nas células T CD4⁺ por sinais de IFN- γ e IL-27 através de STAT 1 (HARRINGTON et al., 2005).

Existe um equilíbrio na resposta imune com uma tendência de prevalecer uma delas, isto é, a resposta Th1, chamada anteriormente de “resposta celular” ou a Th2, dita “humoral”.

Na infecção pelo *H. pylori* quando predomina a resposta Th1 há uma redução do número de bactérias, porém uma progressão da gastrite para atrofia gástrica, isto é, maior dano epitelial. A ausência de citocinas Th1, como IFN- γ , protege a mucosa gástrica contra o desenvolvimento de atrofia gástrica induzida pelo *H. pylori*, enquanto que a falta de citocinas Th2, como o IL-10, induz uma inflamação bem mais intensa e consequente atrofia da mucosa gástrica (EL-OMAR et al., 2001).

A resposta imune celular induzida pelo *H. pylori* pelas células Treg pode estar determinando implicações nas respostas Th1 e Th2 do hospedeiro. Nas respostas Th1, predominam IL-2, IFN- γ e TNF e na Th2 predominam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-12. O

desenvolvimento de atrofia da mucosa gástrica tem sido relacionado com aumento de citocinas específicas como a IL- β , o TNF e o INF- γ (BODGER et al., 2001).

O TNF- α tem um papel importante na defesa do hospedeiro contra o *H. pylori*, mas concentrações elevadas desta citocina podem causar graves patologias. A produção do TNF- α regulada em parte ao nível da transcrição, e muitos estudos têm implicado os polimorfismos do TNF- α como potenciais determinantes de susceptibilidade a doenças (YEA et al., 2001).

Polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias como o TNF e IL-6 e de citocinas anti-inflamatórias como genes IL-4 e IL-10 são também reconhecidos. O polimorfismo do gene do TNF, que tem efeito inibidor da secreção ácida do estômago, provavelmente também levaria a um risco menor de desenvolvimento da DRGE (BEALES, 2000).

Recentes estudos descobriram uma população de células IL-23-dependente que produz IL-17, mas não IFN ou IL-4, sugerindo que esta se trate, de fato, de uma subclasse de célula T adicional (CASTELLINO; GERMAIN, 2006). Esses achados têm indicado uma grande diversificação das células T CD4⁺ além daquelas compreendidas nas linhagens Th1 e Th2 (HARRINGTON; MANGAN; WEAVER, 2006). Este conhecimento tem forçado uma reavaliação do papel das Th1 na autoimunidade. As células Th17 não expressam o fator principal das células Th1 e Th2, T-bet e Gata-3 (HARRINGTON et al., 2005; PARK et al., 2005; VELDHOEN; STOCKINGER, 2006), respectivamente. Além disso, a expressão do fator Th1, T-bet, parece ser negativamente regulada pela diferenciação da Th17. O principal regulador das células Th17 é o receptor nuclear ROR γ t (LITTMAN et al.,) Tem sido demonstrado que a expressão ROR γ t é ativada pela indução de células Th17 combinando com IL-6 e TGF- β . ROR γ t também provou ser necessária e suficiente para especificação da indução de Th17.

Estudos vinculando o TGF- β , IL-23 e IL-17 em patogêneses imunes previamente atribuídas a linhagem Th1 têm levado ao delineamento de uma nova célula T CD4⁺ efetora significativa ligada à IL-17 (HARRINGTON et al., 2005; SCHNYDER et al., 2005).

Num estudo realizado em 862 pacientes Taiwaneses através de exames de EDA com biópsias da mucosa esofágica e gástrica, concluiu-se que pacientes com IL-1 β e seus

polimorfismos tem um risco aumento de ER. Também foi demonstrado que os polimorfismos da IL-10 foram associados a um risco aumentado de gastrite e também, como demonstrado em estudos anteriores (WU et al., 2003) um maior risco de câncer gástrico. Neste estudo, como em outros, não foi encontrada relação entre a infecção do *H. pylori* e um maior risco de ER. Mesmo assim, o trabalho ainda ressalta que devido as diferenças étnicas e diferentes parâmetros regionais uma compreensão completa deva ser feita e uma cuidadosa análise de cada população do estudo para delinear a associação entre os fatores genéticos e ambientais na evolução das doenças (CHENG, H. H. et al., 2010).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória induzida pela infecção do *H. pylori* e é um potente inibidor da secreção ácida do estômago. Com isto ocorre uma hipocloridria favorecendo ainda mais a colonização do *H. pylori* e uma gastrite mais severa (CAMARGO et al., 2006). Ainda tem sido demonstrado que os polimorfismos IL-1 β -31 e IL-1 β -511 estão associados com um aumento na produção de IL-1 β e, portanto, estão relacionados com o desenvolvimento de câncer gástrico (EL-OMAR et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2002). Assim, as pessoas que apresentam polimorfismos da IL-1 β e que também são colonizadas por uma cepa de *H. pylori* toxigênico têm um risco aumentado de desenvolvimento de câncer gástrico (FIGUEIREDO et al., 2002).

A interleucina-17 (IL-17) pertence a uma família de citocinas que compreendem seis membros (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F). A IL-17A (comumente referida como IL-17) tem sido extensivamente estudada e tem um importante papel no sistema imunitário de mamíferos (MOSELEY et al., 2003).

Esta citocina é predominantemente secretada pelas células Th17. Embora produzida por células da imunidade adaptativa, a IL-17 funciona como uma clássica efetora de resposta inata, similar ao IL-1 β , TNF- α e aos agonistas de receptores Toll-like, como os LPS (HARRINGTON et al., 2005). Especificamente, a IL-17, induz expressão de muito mediadores inflamatórios inatos, incluindo IL-6, proteínas de fase aguda, fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e prostaglandina E2. IL-17 também sinergiza potencialmente com citocinas inflamatórias, como TNF- α , amplificando seus efeitos por ordens de magnitude (KOMIYAMA et al., 2006; MCALLISTER et al., 2005) Então, IL-17 é um mecanismo pelo qual o sistema imune adaptativo comunica com o sistema inato para

promover inflamação. Mas, como muitas citocinas de efeito inflamatório, a IL-17 tem papéis opostos *in vivo*, dependendo do contexto da doença (HARRINGTON et al., 2005; HARRINGTON et al., 2006).

Estudos demonstram na infecção por *H. pylori* níveis elevados de IL-17 e bem como as transcrições de RNA da IL-17 na mucosa gástrica e células mononucleares da lâmina própria. Diante disto, a erradicação do *H. pylori* diminui a expressão da IL-17. A neutralização da IL-17 em culturas celulares que resultou em uma diminuição significativa da secreção de IL-8. Como as células da mucosa gástrica e células mononucleares da lâmina própria expressam receptores de IL-17, a IL-17 atua sobre essas células para liberar a IL-8. O aumento dos níveis de IL-17 e IL-8 foram detectados em tecidos da mucosa antral procedentes de úlcera gástrica e em pacientes *H. pylori* positivos não ulcerosos. No local da úlcera, a IL-17 mostrou uma forte associação com o número de infiltração de células mononucleares e neutrófilos. A mucosa gástrica é um local bem ativo para a síntese de IL-17 e IL-8 em pacientes infectados com *H. pylori* e com úlcera gástrica. A IL-17 em conjunto com a IL-8 parece estar envolvida na indução de úlcera gástrica, pois a IL-8 contribui para o recrutamento de neutrófilos para o local da úlcera (MIZUNO et al., 2005).

Tem sido descrito na literatura que as citocinas pró-inflamatórias determinam uma inflamação da mucosa gástrica por neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e essa resposta mais intensa ocorre nos indivíduos infectados pelas cepas de maior virulência como as *cagA* positivas (CRABTREE et al., 1991).

2

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Pacientes com a infecção pelo *Helicobacter pylori* estabelecem um perfil pró-inflamatório gástrico mais intenso.

3

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a mucosa gástrica de pacientes infectados pelo *H. pylori* comparando com a história clínica, antecedentes clínicos, doenças concomitantes, dados no exame de endoscopia digestiva alta (EDA), do exame anatomopatológico (EAP) e da resposta imune.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença do *H. pylori* em pacientes com sintomas digestivos altos
- Detectar as alterações endoscópicas na mucosa gástrica de pacientes *H. pylori* positivos
- Avaliar as alterações histopatológicas da mucosa gástrica em biópsias do estômago de pacientes *H. pylori* positivos.
- Analisar a expressão de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), Th2(IL-4), Th17 (IL-17) e Treg (IL-10) através PCR em tempo real.
- Analisar a expressão de fatores de transcrição do perfil Th1 (T-bet), Th2 (GATA-3), e Treg (FoxP3) através PCR em tempo real.

4

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

Para realização deste estudo, o mesmo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade de Uberaba (UNIUBE) sob parecer número 350.874 de 06/08/2013 e com a anuência da Diretoria de Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) .

4.1 Pacientes e amostras biológicas

Foram selecionados pacientes que apresentavam sintomas do trato digestivo superior e com indicação clínica de exame de Endoscopia Digestiva Alta (EDA).

Os pacientes foram distribuídos de forma aleatória independente de já 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 em o sexo, a idade, a cor, a profissão, a raça e o peso.

Só fizeram parte do presente estudo os pacientes que concordaram em participar do mesmo, lendo e assinando o Temo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os pacientes estudados foram recrutados no Ambulatório Maria da Glória da UFTM e na clínica particular do Dr. Emerson A. Wood da Silva, situada em Uberaba-MG.

Antes de serem submetidos ao exame de EDA, os pacientes responderam a um questionário clínico detalhado ao pesquisador responsável. O motivo deste questionário se deveu ao fato do grande objetivo deste trabalho em correlacionar sintomatologia, antecedentes clínicos e cirúrgicos e doenças concomitantes com a presença da infecção pelo *H. pylori* e daí obter algum preditivo clínico desta infecção.

Os pacientes que realizaram EDA na UFTM tiveram o seu material encaminhado para o Laboratório de patologia da UFTM e parte deste material também foi para o Laboratório de Imunologia da UFTM.

Já os pacientes procedentes da clínica particular do Dr. Emerson A. Wood da Silva, que concordaram em participar o presente estudo, foram encaminhados para exame de EDA a ser realizada com médico participante desta pesquisa clínica. As biópsias obtidas durante a EDA, foram encaminhadas para estudo em Laboratórios de Anatomia Patológica também participantes do trabalho em questão. Uma outra parte do material coletado foi encaminhada ao Laboratório de Imunologia da UFTM

A seleção dos casos ocorreu a partir da análise de planilha eletrônica montada no Software Excel (Microsoft Corporation, USA). Esta planilha foi constituída de informações inseridas conforme questionário feito pelos pesquisadores responsáveis.

A confidencialidade das informações dos pacientes foi garantida pela codificação alfa numérica da identificação do paciente em planilha eletrônica e com direito de saída.

4.2 Distribuição dos pacientes

Participaram do presente estudo um total de 126 pacientes com sintomas do trato digestivo superior e que foram submetidos ao exame de EDA.

Durante o exame de EDA, todos os pacientes foram submetidos a biópsias da mucosa distal do esôfago, do corpo e do antro gástrico, conforme padronização na literatura e estabelecida pela Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva Alta (SOBED).

O número de biópsias ficou na dependência das alterações encontradas durante o exame de endoscopia, porém não menos que quatro fragmentos de cada local (esôfago distal, corpo e antro gástrico).

Fragmentos procedentes das biópsias do terço distal do esôfago, corpo e antro gástrico foram colocados separadamente em frascos com formol tamponado a 4% para a realização do exame anatomopatológico comum de rotina.

Um fragmento a mais da mucosa do antro gástrico foi retirado para execução da pesquisa do *H. pylori* pelo teste rápido da urease imediatamente após o exame de EDA.

Os 126 pacientes foram distribuídos em grupos diferentes na dependência da positividade do *H. pylori* no corpo gástrico e no antro gástrico e assim comparados com o grupo que não apresentou a positividade para a bactéria através dos seguintes meios diagnósticos realizados: teste rápido da urease no antro gástrico, exame anatomopatológico para investigar a presença do *H. pylori* no corpo e antro gástrico.

De forma randomizada também foram selecionados 49 dos 126 pacientes para estudo imunológico do corpo gástrico. Para este estudo, no momento do exame de EDA um fragmento do corpo gástrico foi colocado, a fresco, em frasco contendo RNAlater® (Life Technologies Corporation®, USA) para conservação e resfriamento.

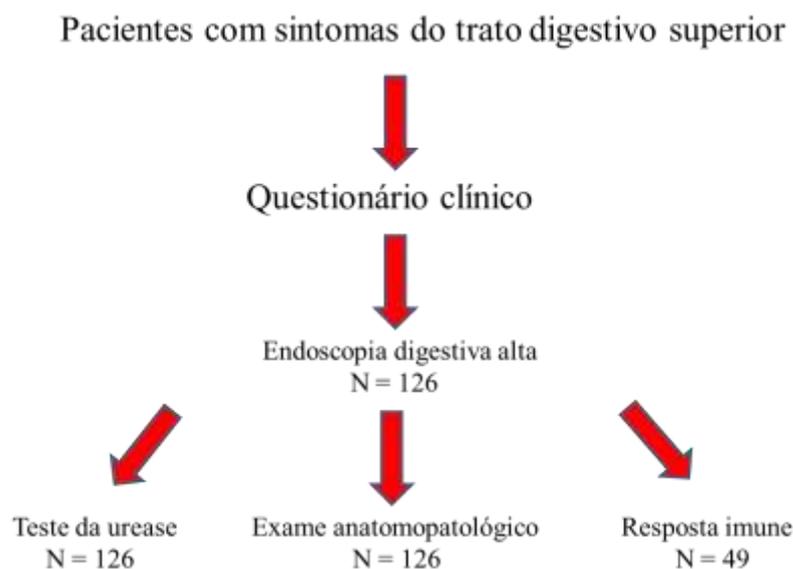


Figura 1- Metodologia utilizada

4.3 Critérios de exclusão do estudo

Foram excluídos deste estudo os pacientes com:

- 1) Não concordância em participar
- 2) Cirurgia prévia do trato digestivo superior
- 3) Grávidas
- 4) Pacientes com presença de comorbidades graves como neoplasias, doenças do colágeno e distúrbios de coagulação.
- 5) Pacientes fazendo uso de antibióticos, anti-inflamatórios, corticosteroides e/ou outros medicamentos que o médico pesquisador no momento do questionário clínico achou oportuno a exclusão do estudo em questão.
- 6) Pacientes que no momento do exame de endoscopia, a critério do médico pesquisador, não apresentavam condições físicas ou mentais de participação do estudo.

4.4 Metodologia da Endoscopia Digestiva Alta

Os exames endoscópicos foram realizados segundo a técnica convencional com aparelhos videoendoscópios (Olympus® GIF Q150, Tóquio, Japão) por médicos experientes e seguindo uma sistemática preconizada pela SOBED e com padronização dos diagnósticos e locais das biópsias.

Os pacientes se apresentavam em jejum de doze horas. Inicialmente recebiam anestesia tópica do orofaringe com aplicações de *spray* de xilocaína a 10% e administrada solução IV, contendo midazolam (de 2,5 a 5,0mg) e meperidina (de 30 a 50mg), para fins de sedação.

Os possíveis diagnósticos endoscópicos adotados foram: esôfago normal, esofagite erosiva, úlcera esofágica, hérnia do hiato esofágico, esôfago de Barrett, hiato esofágico alargado, estômago normal, gastrite erosiva, gastrite enantematosa, úlcera gástrica (ativa ou cicatrizada), duodenite, úlcera duodenal (ativa ou cicatrizada), duodeno normal. Na parte de anexos encontra-se o protocolo do exame endoscópico usado no estudo.

O esôfago foi considerado normal à endoscopia quando, além de ausentes as alterações descritas acima, seu revestimento mucoso mostrava-se liso, de coloração róseo-nacarada, com fina trama vascular em paliçada passível de ser distinguida por transparência (MALUF FILHO et al.,1999) (Figura 2).



Figura 2 – Esôfago normal

A esofagite erosiva de refluxo foi considerada como o aspecto anormal da mucosa esofágica com soluções de continuidade superficiais (erosões) de forma arredondada ou linear, desnudadas ou revestidas de exsudato de fibrina, ou ainda semelhantes a aftas, isoladas ou confluentes. Consideraram-se ulcerações esofágicas as soluções de continuidade mais profundas da mucosa. Para a classificação da gravidade endoscópica da esofagite de refluxo utilizou-se aquela proposta pela Classificação de Los Angeles:

GRAU A: uma (ou mais) solução de continuidade da mucosa confinada às pregas mucosas, não maiores que 5mm cada;

GRAU B: pelo menos uma solução de continuidade da mucosa com mais de 5mm de comprimento, confinada às pregas mucosas e não contíguas entre o topo de duas pregas (Figura 3).



Figura 3 - Esofagite erosiva grau B

GRAU C: pelo menos uma solução de continuidade da mucosa contígua entre o topo de duas (ou mais) pregas mucosas, mas não circunferencial (ocupa menos que 75% da circunferência do esôfago);

GRAU D: uma ou mais solução de continuidade da mucosa circunferencial (ocupa no mínimo 75% da circunferência do esôfago).

Obs.: As complicações (estenose, Barrett) são apresentadas à parte e podem ou não ser acompanhadas pelos vários graus de esofagite.

O estômago foi considerado normal, quando apresentava coloração uniformemente rósea, com superfície lisa e íntegra e pregas gástricas tortuosas e de distribuição regular no corpo gástrico, as quais desaparecem no antro (Figura 4).



Figura 4 - Estômago normal

Gastrite erosiva foi caracterizada por erosões, rupturas superficiais da mucosa gástrica representadas como lesões planas ou levemente deprimidas, esbranquiçadas, com halo avermelhado, tipo aftas; ou como pápulas avermelhadas com depressão central; ou ainda como pontos avermelhados lembrando petéquias, podendo ter exsudato esbranquiçado aderido ou friabilidade ao toque do endoscópio ou da pinça de biopsia (Figura 5).



Figura 5 - Gastrite erosiva antral

Gastrite enantematosa foi caracterizada por vermelhidão da mucosa sem erosão, podendo ser focal ou comprometer áreas extensas da mucosa gástrica (Figura 6).

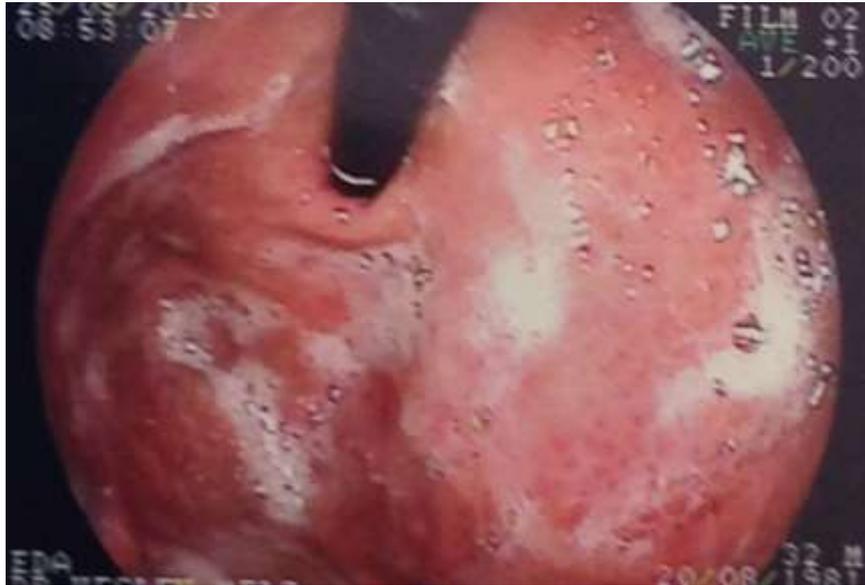


Figura 6 - Gastrite enantematosa de fundo gástrico

Gastrite nodular foi considerada quando nodulações surgem na mucosa do estômago, e este tipo de gastrite na maioria das vezes está relacionado com a presença de infecção pelo *H. pylori* (Figura 7).



Figura 7 - Gastrite nodular

Considerou-se úlcera ativa a quebra da integridade da mucosa em área circunscrita, em geral arredondada ou ovalada ou, ainda, fusiforme ou em forma de estrela, mais profunda que as erosões, atingindo a camada muscular da mucosa. Úlcera cicatrizada foi caracterizada pela presença de cicatriz linear branca ou vermelha na mucosa.

O duodeno foi considerado normal quando não apresentava deformidade no bulbo e a superfície da mucosa era lisa, íntegra, de coloração rósea. Duodenite erosiva e úlcera duodenal foram consideradas as alterações da mucosa duodenal semelhantes às descritas para a gastrite erosiva e para a úlcera gástrica.

4.5 Metodologia do Exame Anatomopatológico

Após a coleta por biópsia, os fragmentos esofágicos e gástricos foram colocados em formol tamponado a 4% e enviados ao Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da UFTM e para outros laboratórios de escolha do paciente quando os mesmos eram procedentes de clínica privada, para serem processados.

Os fragmentos fixados em formol 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 estudo histopatológico.

Os achados histológicos na mucosa esofagiana foram analisados de acordo com os seguintes parâmetros:

- a) Exocitose de eosinófilos no epitélio escamoso;
- b) Exocitose de neutrófilos no epitélio escamoso;
- c) Aumento de mononucleares intra-epiteliais (acima de 10 células mononucleares/campo de grande aumento – objetiva de 40x) e espongirose (edema intercelular);
- d) Hiperplasia da camada basal (mais de 15% da espessura do epitélio);
- e) Superficialização de alças capilares (projeção no terço superior do epitélio, ou seja, alongamento de papilas);
- f) Epitélio colunar com metaplasia intestinal.

Cortes histológicos das biópsias gástricas também foram corados pela técnica Warthin Starry, para facilitar a pesquisa de *H. pylori*, além dos cortes corados pelo método de hematoxilina-eosina (DIXON et al., 1996).

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), utilizando-se a escala analógica visual do referido artigo, que também é recomendada pelo Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos da Sociedade Brasileira de Patologia (BACCHI et al., 2005), conforme ilustrada na figura 8 e descritos a seguir:

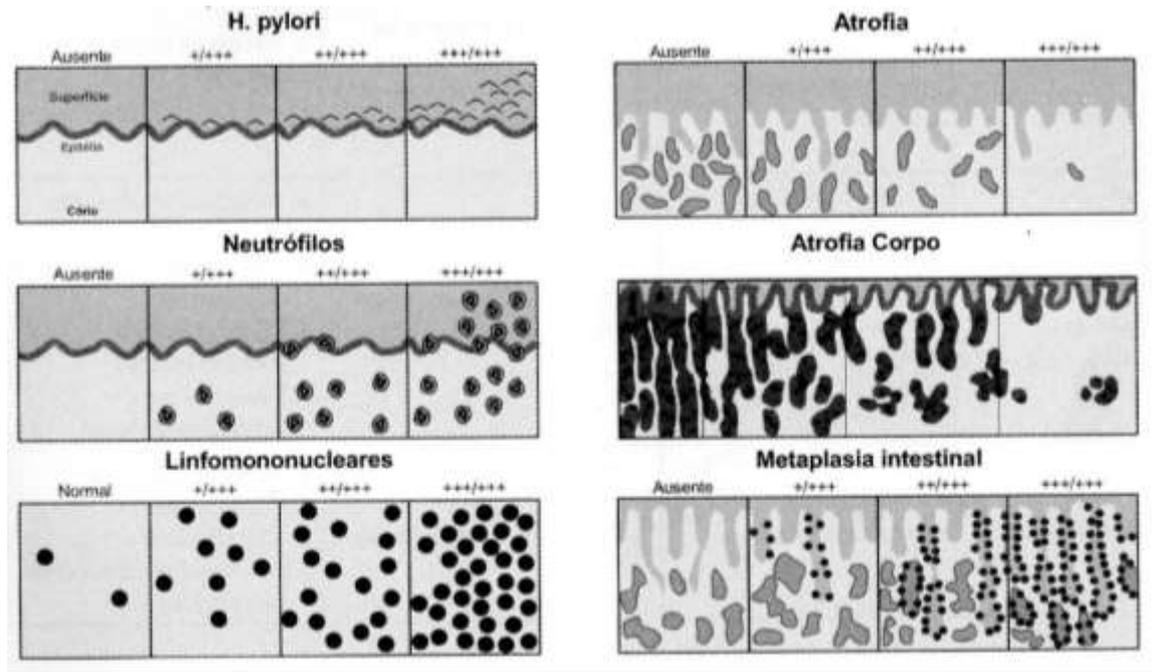


Figura 8 - Escala analógica visual proposta pela reunião de Houston de 1994, para classificação/graduação de gastrites (BACCHI et al., 2005)

- a) Ausência de gastrite - nenhuma alteração do epitélio superficial ou glandular, com raros mononucleares na lâmina própria (grau 0);
- b) Intensidade da gastrite com base na análise semi-quantitativa de mononucleares na lâmina própria e/ou no epitélio superficial ou glandular, graduada em leve (grau I), moderada (grau II) ou intensa (grau III); (Figura 9)

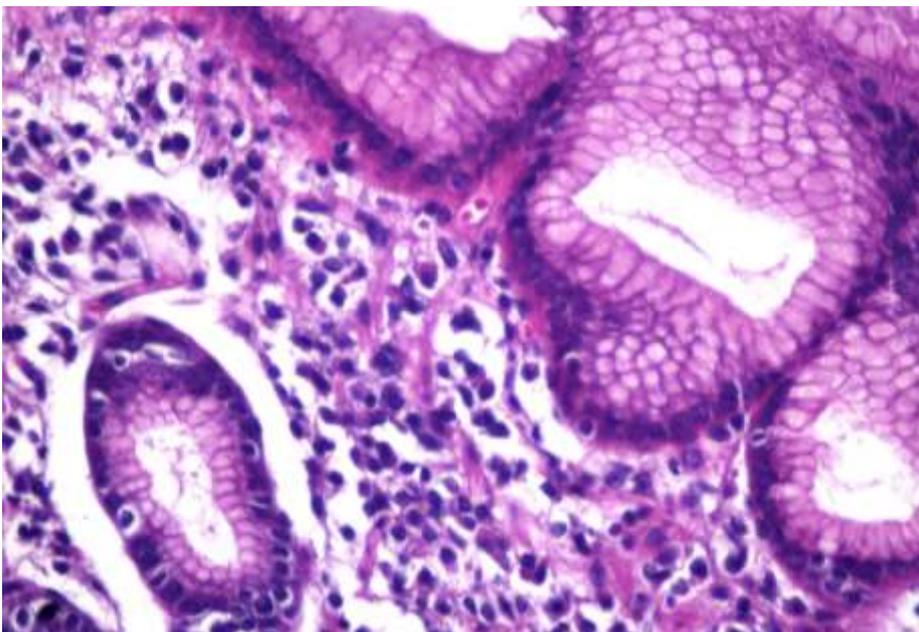


Figura 9 - Gastrite crônica sem atividade inflamatória: infiltrado linfoplasmocitário, sem polimorfonucleares (HE - 400x).

c) Intensidade da atividade inflamatória com base na presença de polimorfonucleares na lâmina própria e/ou no epitélio superficial ou glandular, graduada em leve (grau I), moderada (grau II) ou intensa (grau III) (Figura 10 e 11):

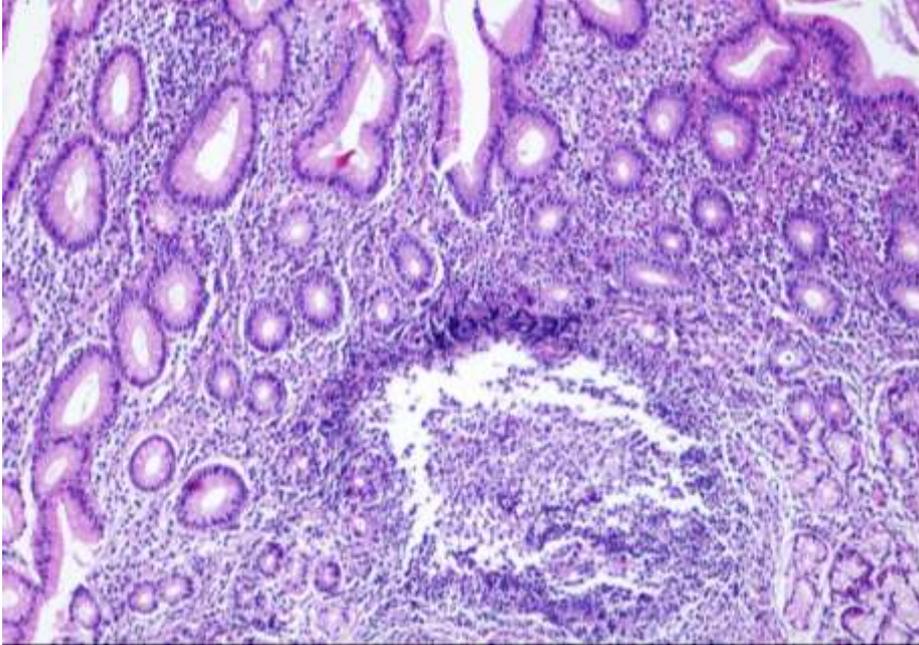


Figura 10 - Gastrite crônica intensa; presença de folículo linfóide (HE - 40x)

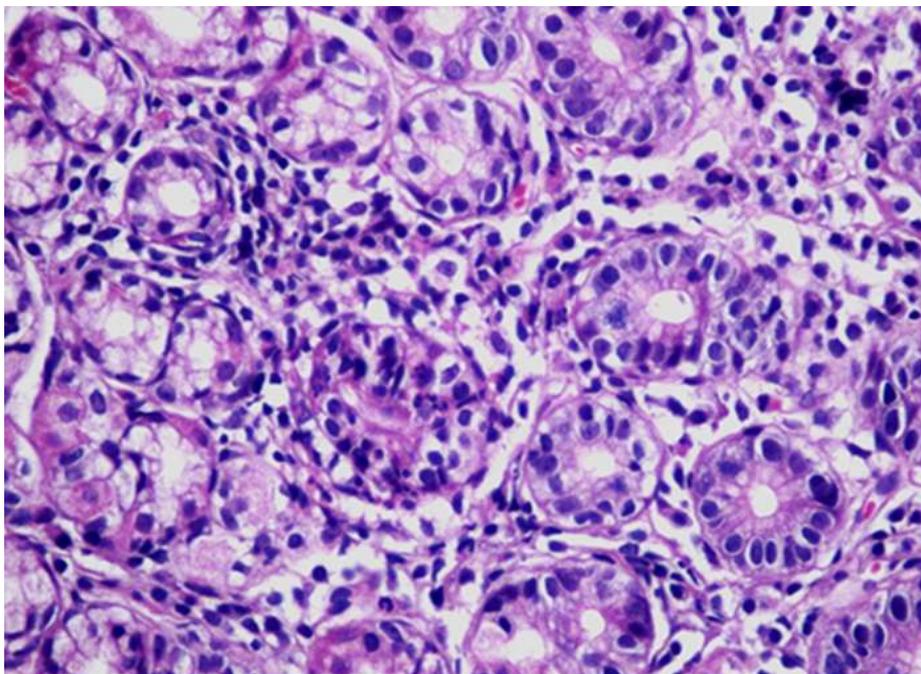


Figura 11 - Foco com atividade inflamatória: neutrófilos permeando o epitélio foveolar (HE - 400x)

d) Presença de atrofia gástrica de acordo com a diminuição do número de corpos glandulares, graduada em leve (grau I), moderada (grau II), intensa (grau III);

e) Presença de metaplasia intestinal de acordo com a presença de epitélio com características morfológicas do epitélio intestinal, classificada em completa (tipo I) ou incompleta (tipos II ou III), de acordo com a presença ou não de enterócitos absorventes e, a seguir graduada, segundo a extensão em graus I, II ou III (DIXON et al, 1996). (Figura 12)

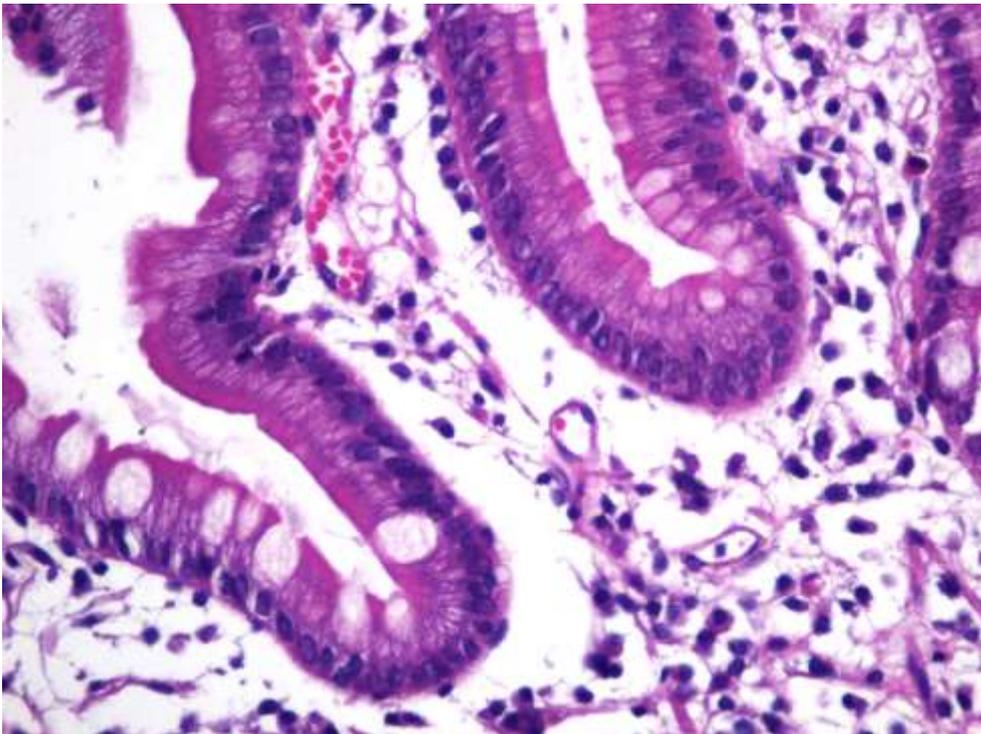


Figura 12 - Gastrite com atrofia glandular discreta (grau I ou focal) substituída por metaplasia intestinal completa (células caliciformes e enterócitos absorventes), sem displasia (HE – 400x).

4.6 Diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*

Foram utilizados diferentes métodos de diagnóstico e comprovação da presença do *H. pylori* pelo fato da existência de possíveis casos de falsos negativos devido a vários fatores como a escassez de bactérias e/ou uso prévio de bloqueadores H⁺.

4.6.1 Teste rápido da urease

O teste rápido da urease é o método mais simples, menos dispendioso e que fornece resultado dentro de minutos e até 2 horas, dependendo da quantidade de bactérias presentes na mucosa.

Este teste é baseado na principal característica bioquímica da bactéria, que é a produção da enzima urease, que hidrolisa a ureia em gás carbônico e amônia. Desta forma, um fragmento de biópsia da mucosa do estômago é colocado em um meio contendo ureia e um indicador de pH. Caso a urease esteja presente, a ureia é convertida em amônia o que gera um aumento do pH e conseqüentemente uma mudança na coloração do meio, passando da cor âmbar para rósea (Figura 13).

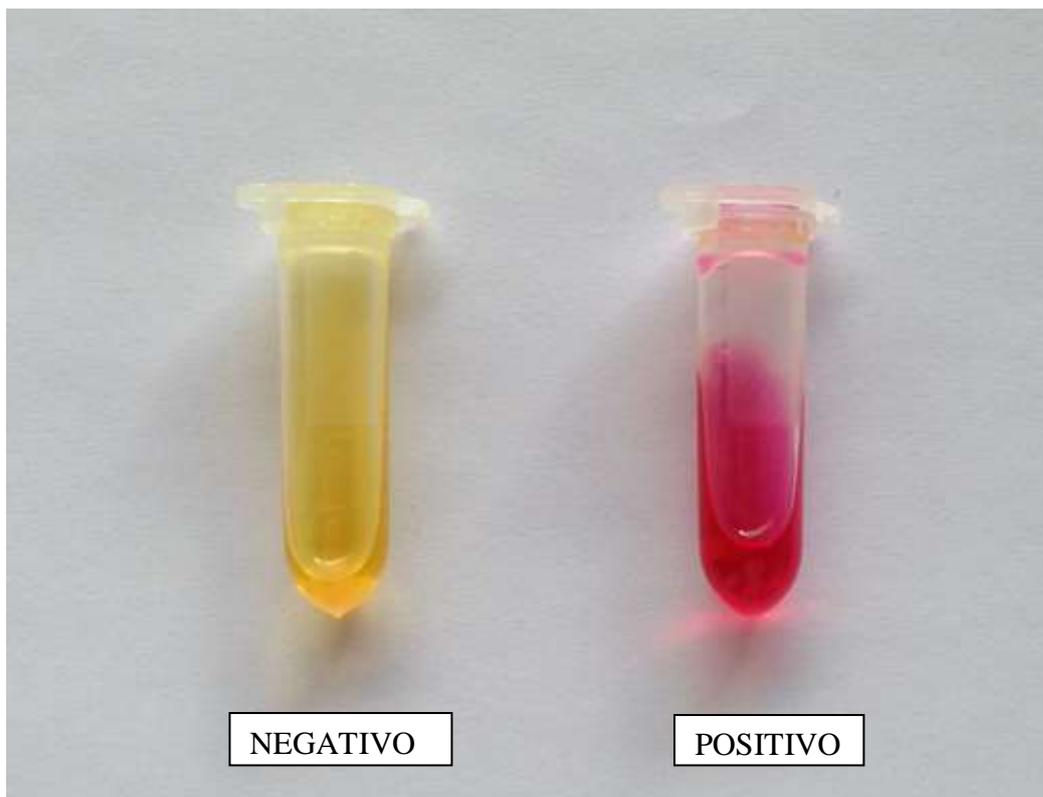


Figura 13 – Resultado do teste da urease

Falsos negativos podem ser obtidos com este teste em razão da distribuição irregular da bactéria na mucosa gástrica, escassez do microorganismo, devido ao uso recente de antimicrobianos ou inibidor de bomba protônica e até mesmo falsos positivos, se outros patógenos produtores de urease estiverem presentes na amostra coletada (BITTENCOURT et al., 2006).

Para esta pesquisa 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. (Figura 14).

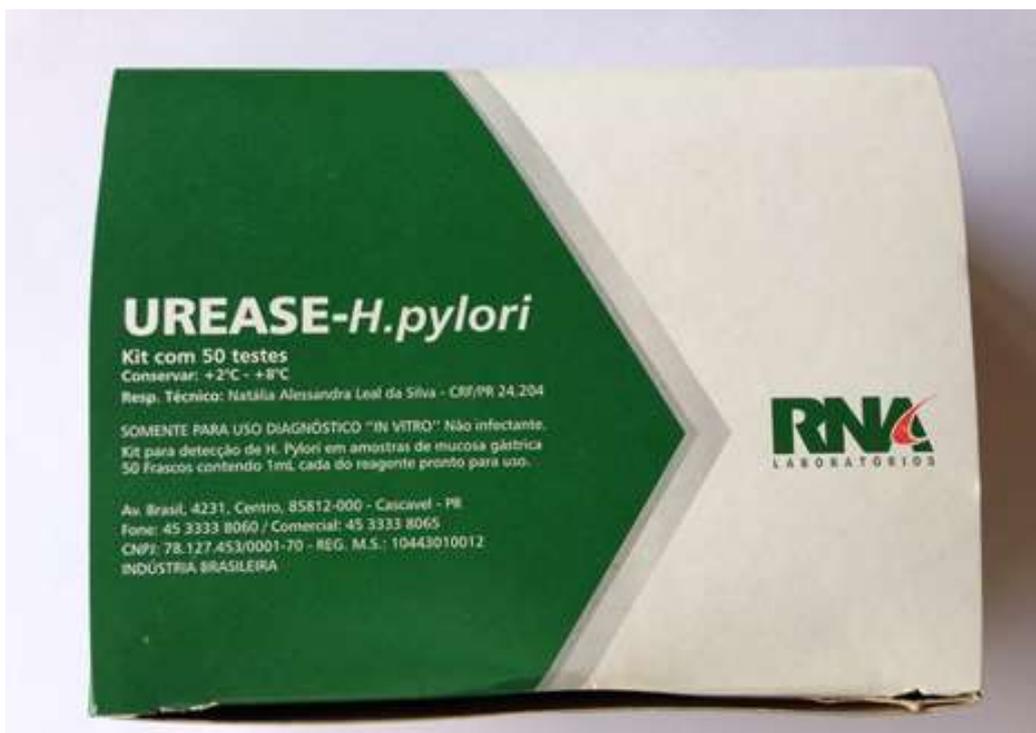


Figura 14 – Kit teste da urease – laboratório RNA

4.6.2 Pesquisa de *H. pylori* no exame anatomopatológico

Após a coleta por biópsia, os fragmentos gástricos foram colocados em formol tamponado a 4% e enviados ao Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital de Clínicas da UFTM e para outros laboratórios de escolha do paciente quando os mesmos eram procedentes de clínica privada, para serem processados.

Os fragmentos fixados em formol foram desidratados em álcool e xilol e a seguir incluídos em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram obtidos e corados pelo método Warthin Starry à base de prata para a pesquisa de *H. pylori* (DIXON et al., 1996).

A quantificação da densidade bacilar foi feita baseando-se em uma graduação de acordo com a quantidade de bacilos observados e assim classificando-se os achados em ausentes, positivo escasso (+/+++), moderado (++/+++) e intenso (+++/+++) (Figura 15).

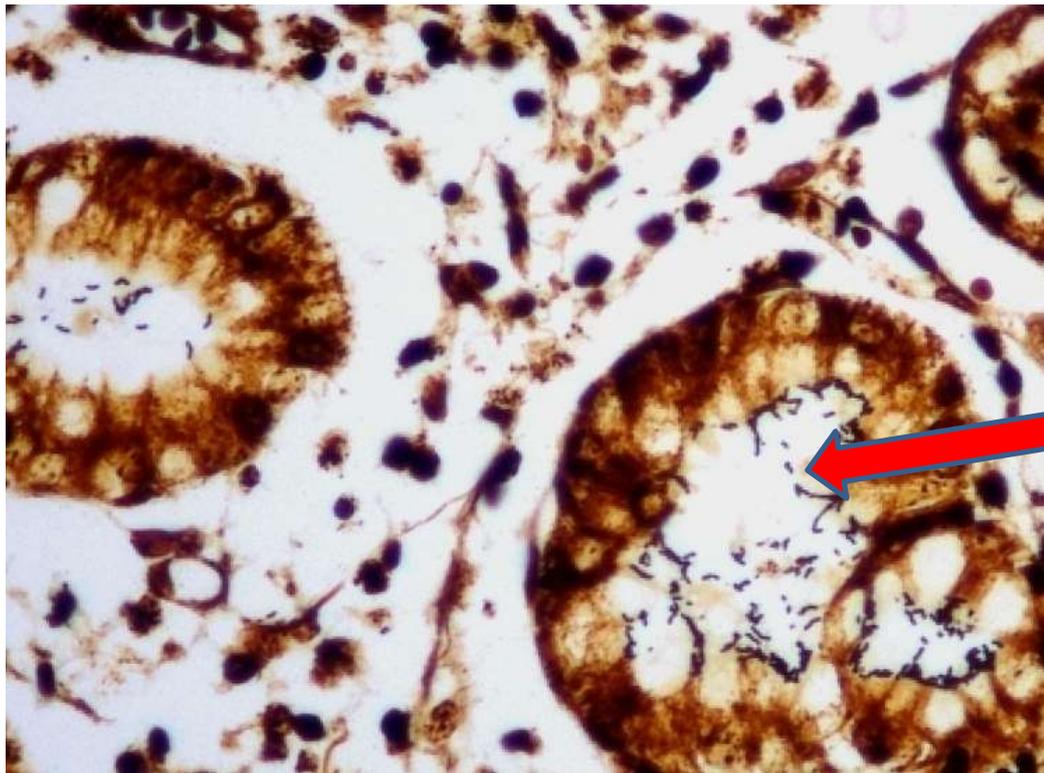


Figura 15 - Numerosos bacilos compatíveis com *Helicobacter pylori* no interior de foveólas (Warthin Starry – 1000x).

4.6 Extração de RNA

Um fragmento de mucosa do corpo gástrico que foi obtido durante o exame de endoscopia digestiva alta e foi destinado à extração de RNA. A extração do RNA total foi realizada utilizando-se kit de extração de RNA (RNA SV Total RNA Isolation System, Promega - EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os fragmentos de tecidos, armazenados em nitrogênio, foram processados por maceração mecânica. Os fragmentos resultantes deste procedimento foram transferidos para tubo eppendorf contendo tampão de lise, e misturados por inversão; foi então adicionado 350µl de tampão de diluição. As amostras foram aquecidas em banho-maria a 70°C por 3 minutos e centrifugadas a 10 minutos a 13000xg à 4°C. Após esta centrifugação o sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorfs e adicionado 200µl de etanol a 95%. O material foi transferido para um conjunto de separação do kit, contendo uma membrana de separação, sendo posteriormente centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C.; o RNA foi lavado, por 1 minuto, por centrifugação (13000xg à 4°C) em 600µl de tampão apropriado. A presença de DNA contaminante foi eliminada com tratamento com DNase por 15 minutos à temperatura ambiente. . Após esta incubação foi adicionado 200µl de DNase stop e centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C. O material foi novamente lavado por 2 vezes (1 minuto a 13000xg à 4°C). Esta membrana separadora contendo o RNA foi transferida para outro tubo e adicionado 30µl de água livre de nucleasse, e centrifugado por 1 minuto a 13000xg à 4°C. Após estes procedimentos, o RNA obtido foi eluído em 30µl de água deionizada e livre de RNase, para quantificação e confecção de DNA complementar (cDNA).

4.7 Confecção de cDNA

O cDNA foi confeccionado a partir de 1 µg de RNA, 0,5 µg de Oligo dT (Promega - EUA) e água ultra pura (Milli-Q) autoclavada. Esse material foi levado ao termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc - EUA) para um ciclo de 5 minutos a 70°C. Após resfriamento imediato, foram adicionados dNTP (2,5mM), transcriptase reversa M-MLV RT (Improm II, Promega - EUA) e tampão para reação M-MLV-5x Buffer (Promega - EUA). Essa reação foi levada ao termociclador para mais um ciclo de 1 hora à 42°C, seguido de 3 minutos a 10°C. No final, foram adicionados ao cDNA confeccionado 75µl de água ultra pura autoclavada, sendo estas amostras congeladas em seguida a -20°C, até o momento de uso.

O cDNA foi utilizado para quantificação dos produtos de interesse por PCR em tempo real.

4.8 Reações de PCR em tempo real

A expressão quantitativa de *mRNA* dos genes IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, T-bet, GATA-3 e FoxP3 foram analisadas por reações de PCR em tempo real, nas amostras de cDNA de fragmento de esôfago. Foi utilizado o sistema SYBR Green no aparelho GeneAmp 7500 (Applied Biosystems – USA). Primers adequados para tais reações conforme lista abaixo, foram criados a partir do programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen - USA). O sistema SYBR Green realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (ABI Prism Software - EUA) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos, como a β -actina, uma proteína constitutiva presente no citoesqueleto de diversos tipos celulares. O cDNA sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagente FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Suíça) como determinado pelo fabricante, sendo que para cada amostra utilizou-se 6,5 μ l do mix SYBR Green, 0,5 μ l do primer sense e anti-sense, 2,5 μ l do cDNA e 5 μ l de água estéril. A reação básica de amplificação compreendeu 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar. Foi utilizado o método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$), por meio de fórmulas aritméticas para alcançar o resultado da quantificação relativa de *mRNA*, de acordo com boletim publicado da Applied Biosystems (Manual do Usuário N° 2: Quantificação Relativa de Expressão Gênica - PN 4303859 - EUA).

Tabela 1 - Códigos de *primers taqman* utilizados na reação de PCR em tempo real

Citocinas/fatores de transcrição	Código dos <i>primers</i>
Hu β -actina	Hs01060665_g1
Hu IFN- γ	Hs00989291_m1
Hu IL-4	Hs00174122_m1
Hu IL-10	Hs00961622_m1
Hu IL-17	Hs00174383_m1
Hu T-bet	Hs00203436_m1
Hu GATA-3	Hs00231122_m1
Hu FoxP3	Hs01085834_m1

5

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando os softwares Statview® (Abacus concept, EUA) e IBM SPSS Statistics® (IBM Corporation®) (Versão 21). As variáveis contínuas foram submetidas a testes de Normalidade e variância. (Kolmogorov-Smirnov). Foram aplicados testes paramétricos para os níveis relativos de *mRNA* para as citocinas e fatores de transcrição. Para a comparação entre duas variáveis foi aplicado o teste t não pareado e para a comparação de 3 ou mais variáveis a análise de variância com o teste de Bonferroni como pós teste. O teste T pareado foi usado para comparar duas variáveis (níveis relativos de citocinas de diferentes padrões) no mesmo paciente. Para comparação de duas ou mais variáveis nominais foi utilizado o teste do Qui-quadrado. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

6

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Características clínicas da amostra (N=126)

Os 126 pacientes do presente estudo tinham idade entre 18 e 87 anos, com média de $44,9 \pm 15,5$ anos, sendo que 84 (66,7%) pacientes eram do sexo feminino e 42 (33,3%) pacientes eram do sexo masculino.

A média do IMC da amostra foi de $26,8 \pm 6,1$ kg/m². A cor de pele predominante foi a branca em 106 (84,1%) dos pacientes. Cento e quatro (82,5%) pacientes negavam o tabagismo e 22 (17,5 %) eram fumantes.

6.2 Características clínicas da amostra em relação à positividade do *H. pylori* no antro e/ou corpo gástrico pesquisado através do exame anatomopatológico (EAP) (N=126).

O *H. pylori* esteve presente no antro gástrico através do EAP em 42 (33,3%) dos 126 pacientes estudados e já no corpo gástrico o mesmo foi positivo no EAP em 43 (34,1%) pacientes.

Dentre os 126 pacientes que foram submetidos ao questionário clínico (Tabela 2), não foi encontrada diferença significativa em relação aos dados clínicos com a presença do *H. pylori* no antro gástrico diagnosticado pelo EAP nos referidos pacientes.

Baseando-se somente na anamnese, e em situações clínicas frequentes como dor epigástrica, pirose, tabagismo, etilismo, obesidade, e diabetes dentre outras, não foi obtido uma prévia para o diagnóstico da bactéria. A dor epigástrica foi o sintoma mais frequente acometendo 105 (83,3%) pacientes, seguida pelo sintoma pirose que se manifestou em 86 (68,3%) pacientes. ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Comparando os pacientes do sexo masculino e do sexo feminino com a presença do *H. pylori* no antro gástrico, houve uma maior prevalência da bactéria nos pacientes do sexo feminino, porém sem significância estatística. Dos 84 (66,7%) pacientes do sexo feminino, 28 (22,2%) apresentaram positividade para a presença da bactéria no antro gástrico enquanto que

dos 42 (33,3%) dos pacientes do sexo masculino, 14 (11,1%) pacientes apresentaram positividade para a mesma no antro gástrico (Tabela 2).

Não houve diferença estatística significativa quando estudamos os pacientes que haviam feito tratamento anterior para DRGE. Dos 126 pacientes estudados, 48 (38,1%) pacientes haviam feito o tratamento para a DRGE e dentre eles 16 (12,7%) pacientes tiveram a bactéria presente no antro gástrico e 32 (25,4%) não tiveram a positividade para o *H. pylori*.

Tabela 2 - Comparação de dados clínicos com a presença do *H. pylori* pesquisado no antro gástrico através do EAP (N=126)

Dados clínicos	Número	<i>H. pylori</i> +	<i>H. pylori</i> -
Sexo masculino	42 (33,3%)	14 (11,1%)	28 (22,2%)
Sexo feminino	84 (66,7%)	28 (22,2%)	56 (44,4%)
Dor epigástrica	105 (83,3%)	35 (27,8%)	70 (55,6%)
Náuseas	56 (44,4%)	21 (16,7%)	35 (27,8%)
Pirose	86 (68,3%)	27 (21,4%)	59 (46,8%)
Disfagia	30 (23,8%)	15 (11,9%)	15 (11,9%)
Regurgitação	42 (33,3%)	17 (13,5%)	25 (19,9%)
Tabagismo	22 (17,5%)	6 (4,8%)	16 (12,7%)
Etilismo	50 (39,7%)	20 (15,9%)	30 (23,8%)
Obesidade	27 (21,4%)	13 (10,3%)	14 (11,1%)
Diabetes	12 (9,5%)	5 (4,0%)	7 (5,6%)
Tratamento anterior DRGE	48 (38,1%)	16 (12,7%)	32 (25,4%)
Tratamento anterior gastrite	37 (29,4%)	8 (6,3%)	29 (23,0%)
Tratamento anterior <i>H. pylori</i>	19 (15,1%)	3 (2,4%)	16 (12,7%)

p<0,05

Entre os pacientes em uso de IBP em relação à presença do *H. pylori* no corpo gástrico, o uso de IBP mostrou uma diminuição significativa na positividade para o *H. pylori* nesta região do estômago. Dos 51 (40,5%) pacientes que estavam em uso de IBP, apenas 13 (10,3%) pacientes tiveram a presença da bactéria no corpo gástrico enquanto que 38 (30,2%) pacientes não apresentaram positividade para a mesma no corpo gástrico (Tabela 3).

Tabela 3 – Em uso de IBP e positividade do *H. pylori* no corpo gástrico

		<i>H. pylori</i> presente no corpo gástrico		Total
		Ausente	Presente	
Em uso de IBP	Não	45 35,7%	30 23,8%	75 59,5%
	Sim	38 30,2%	13 10,3%	51 40,5%
Total		83 65,9%	43 34,1%	126 100,0%

p<0,05

Entre os pacientes em uso de IBP em relação à presença do *H. pylori* no antro gástrico, o uso de IBP mostrou uma diminuição significativa na positividade para o *H. pylori* nesta região do estômago. Dos 51 (40,5%) pacientes que estavam em uso de IBP, apenas 10 (7,9%) pacientes tiveram a presença da bactéria no antro gástrico enquanto que 41 (32,5%) pacientes não apresentaram positividade para a mesma no antro gástrico (Tabela 4).

Tabela 4 – Em uso de IBP e positividade do *H. pylori* no antro gástrico

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Em uso de IBP	Não	43 34,1%	32 25,4%	75 59,5%
	Sim	41 32,5%	10 7,9%	51 40,5%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

p<0,05

6.3 Características endoscópicas da amostra em relação à positividade do *H. pylori* no antro e/ou corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126).

O teste da urease realizado em fragmentos de antro gástrico colhidos durante a EDA mostrou uma positividade em 24 (19,0%) pacientes, a pesquisa da bactéria no antro através do EAP foi positiva em 42 (33,3%) pacientes e a positividade do *H. pylori* no corpo gástrico, também pelo EAP foi de 43 (34,1%) pacientes.

Considerando-se a normalidade do esôfago e do duodeno como dados da EDA não houve diferença estatística significativa para a presença do *H. pylori* nestes achados ($p > 0,05$). Dos 61 (48,4%) pacientes com esôfago normal, 24 (19,0%) pacientes tinham a presença do *H. pylori* no antro gástrico e 37 (29,4%) pacientes não tinham. Os pacientes que apresentaram duodeno normal foram 112 (88,9%) e destes 37 (29,4%) pacientes tinham o *H. pylori* presente no antro gástrico e 75 (59,5%) pacientes não tinham em esta positividade.

A EDA mostrou alterações no corpo gástrico de 19 (15,1%) pacientes, porém no antro gástrico dos mesmos pacientes estudados, estas alterações endoscópicas foram mais frequentemente encontradas em 50 (39,7%) pacientes.

A ausência da esofagite de refluxo diagnosticada durante o exame de EDA apresentou diferença significativa diante da ausência do *H. pylori* no antro gástrico ($p < 0,05$), pois podemos observar que dos 97 (77,0%) pacientes que não apresentaram esofagite de refluxo pela EDA, 59 (46,8%) pacientes não tiveram positividade do *H. pylori* no antro gástrico. Também verificamos que 29 (23%) pacientes que tiveram esofagite de refluxo um total de 25 (19,8%) pacientes não tiveram a presença da bactéria no antro gástrico. (Tabela 5).

Tabela 5 – Esofagite de refluxo (EDA) pela classificação de Los Angeles (LA) e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Esofagite de refluxo (LA)	Grau A	18 14,3%	3 2,4%	21 16,7%
	Grau B	7 5,6%	1 0,8%	8 6,3%
	Ausente	59 46,8%	38 30,2%	97 77,0%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

p<0,05

A tabela 6 mostra que os pacientes que apresentaram corpo gástrico normal na EDA foram 107 (84,9%) e que dentre eles 78 (61,9%) pacientes não tiveram a positividade da bactéria no antro gástrico pelo EAP. Resultados estatisticamente significativos (p<0.05).

Tabela 6 – Corpo gástrico normal e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Corpo gástrico normal	Não	6 4,8%	13 10,3%	19 15,1%
	Sim	78 61,9%	29 23,0%	107 84,9%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

p<0,05

Dos 126 pacientes estudados, 111 (88,1%) pacientes apresentaram um corpo gástrico normal e dentre eles 81 (64,3%) pacientes não tiveram o *H. pylori* presente no antro gástrico. Já entre os 15 (11,9%) pacientes que apresentaram gastrite, 12 (9,5%) pacientes tiveram a bactéria diagnosticada no antro do estômago. Resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Gastrite de corpo gástrico e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Gastrite de corpo gástrico- classificação	Enantematosa	3 2,4%	9 7,1%	12 9,5%
	Erosiva plana	0 0,0%	3 2,4%	3 2,4%
	Ausente	81 64,3%	30 23,8%	111 88,1%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0,05$

A tabela 8 mostra que os pacientes que apresentaram antro gástrico normal na EDA foram 50 (39,7%) e que dentre eles 40 (31,7%) pacientes não tiveram a positividade da bactéria no antro gástrico pelo EAP. Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Antro gástrico normal e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Antro gástrico normal	Não	44 34,9%	32 25,4%	76 60,3%
	Sim	40 31,7%	10 7,9%	50 39,7%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0,05$

Dentre os 126 pacientes estudados, 54 (42,9%) pacientes apresentaram um antro gástrico normal e dentre eles 42 (33,3%) pacientes não tiveram o *H. pylori* presente no antro gástrico. Já entre os 72 (57,14%) pacientes que apresentaram gastrite, 30 (23,8%) pacientes tiveram a bactéria diagnosticada no antro do estômago. Resultados com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Tabela 9)..

Tabela 9 – Classificação da gastrite de antro gástrico e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Gastrite de antro gástrico- classificação	Enantematosa	26 20,6%	13 10,3%	39 31,0%
	Erosiva elevada	4 3,2%	7 5,6%	11 8,7%
	Erosiva plana	12 9,5%	8 6,3%	20 15,9%
	Nodular	0 0,0%	2 1,6%	2 1,6%
	Gastrite Ausente	42 33,3%	12 9,5%	54 42,9%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0,05$

O gráfico 1 mostra a frequência da densidade do *H. pylori* no antro gástrico. Podemos observar que densidade intensa da bactéria foi a mais frequente atingindo 17 (13,5%) pacientes, seguida da densidade moderada com 13 (10,3%) pacientes e a escassa com 11 (8,7%) pacientes. G

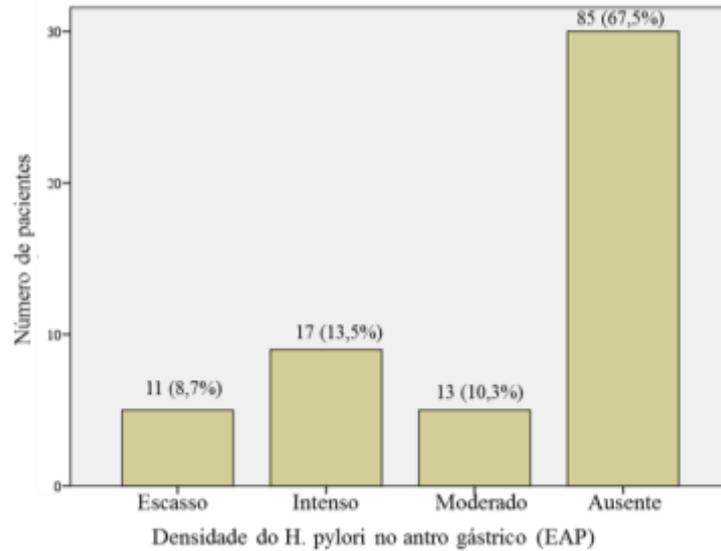


Gráfico 1 - Frequência da densidade do *H. pylori* no antro gástrico

A Tabela 10 mostra que houve diferença estatística significativa entre os dados obtidos com o teste da urease no antro gástrico com a densidade do *H. pylori* no antro gástrico. Vinte e quatro (19,0%) pacientes com teste de urease positivo tiveram a positividade com a presença do *H. pylori* no antro gástrico ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Comparação de positividade do teste da urease realizado no antro gástrico

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Teste da urease (antro gástrico)	Negativo	6 4,8%	8 6,3%	8 6,3%	80 63,5%	102 81,0%
	Positivo	5 4,0%	9 7,1%	5 4,0%	5 4,0%	24 19,0%
Total		11 8,7%	17 13,5%	13 10,3%	85 67,5%	126 100,0%

$p < 0,05$

6.4 Características da amostra no EAP em relação à positividade do *H. pylori* antro e/ou corpo gástricos (N=126).

A positividade do *H. pylori* no corpo gástrico através do EAP foi de 43 (34,1%) pacientes e o *H. pylori* foi positivo no antro gástrico também pesquisado através do EAP em 42 (33,3%) pacientes. Somente um (0,07%) paciente foi positivo no corpo gástrico e não se mostrou positivo no antro gástrico ($p < 0,05$).

6.4.1 Esôfago (EAP)

Oitenta e três (65,9%) pacientes tiveram o esôfago dado como normal nas biópsias feitas durante o exame de endoscopia digestiva alta. Destes pacientes, 29 (23,0%) apresentaram a pesquisa do *H. pylori* positiva no antro gástrico através EAP e 54 (42,9%) pacientes tiveram negativa a presença da bactéria, o que não mostrou significância estatística ($p > 0,05$) a relação do *H. pylori* no antro gástrico e a normalidade do esôfago.

O mesmo aconteceu com os pacientes que tiveram diagnóstico anatomopatológico de esofagite de refluxo, isto é: 28 (22,2%) pacientes com esofagite de refluxo sendo 6 (4,8%) pacientes com *H. pylori* presente no antro gástrico e 22 (17,5%) com a bactéria ausente. Não houve significância estatística ($p > 0,05$).

6.4.2 Corpo gástrico (EAP)

Na tabela 11 podemos observar que de todos os 59 (46,8%) pacientes que apresentaram um corpo do estômago normal ao EAP, somente 1 (0,08%) paciente teve a positividade para o *H. pylori* no corpo gástrico, enquanto que 67 (53,2%) pacientes tiveram alterações histopatológicas no corpo do estômago e que dentre eles, 41 (32,5%) pacientes apresentaram a positividade para a bactéria.

Ainda na Tabela 11, observa-se que a densidade de infecção mais encontrada do *H. pylori* em relação às alterações histológicas do corpo gástrico foi de forma “moderada”, atingindo 24 (19,0%) pacientes dos 67 (53,2%) pacientes.

Todos os dados observados na referida Tabela 11 tiveram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Corpo gástrico normal (EAP) e a densidade do *H. pylori* no corpo gástrico (pesquisado no EAP)

		<i>H. pylori</i> (corpo gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Corpo gástrico normal (EAP)	Não	11 8,7%	6 4,8%	24 19,0%	26 20,0%	67 53,2%
	Sim	1 0,08%	0 0,0%	0 0,0%	58 46,0%	59 46,8%
Total		12 9,5%	6 4,8%	24 19,0%	84 66,7%	126 100,0%

$p < 0,05$

Na tabela 12, podemos observar que 29 (59,2%) dos pacientes não apresentaram gastrite ativa no corpo gástrico e dentre eles somente 1 (2,0%) apresentou a infecção pelo *H. pylori* ($p < 0,05$). Daí a estreita relação entre ausência de gastrite ativa e ausência da bactéria.

Os pacientes que tiveram gastrite ativa presente foram 20 (40,8%) e o tipo de atividade mais encontrada foi a discreta com 14 (28,6%) pacientes e a densidade de infecção pelo *H. pylori* predominante foi a moderada com 7 (14,3%) pacientes infectados ($p < 0,05$)

Tabela 12 - Gastrite ativa no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do *H. pylori* no corpo gástrico pesquisado (EAP)

		<i>H. pylori</i> (corpo gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Gastrite ativa no corpo gástrico	Atividade discreta	7 5,6%	3 2,4%	14 11,1%	2 1,6%	26 20,6%
	Atividade intensa	0 0,0%	1 0,8%	0 0,0%	0 0,0%	1 0,8%
	Atividade moderada	4 3,2%	2 1,6%	8 6,3%	3 2,4%	17 13,5%
	Atividade ausente	1 0,8%	0 0,0%	2 1,6%	79 62,7%	82 65,1%
Total		12 9,5%	6 4,8%	24 19,0%	84 66,7%	126 100,0%

$p < 0,05$

Na tabela 13, podemos observar que 62 (49,29%) pacientes não apresentaram gastrite crônica no corpo gástrico e dentre eles nenhum apresentou a infecção pelo *H. pylori* ($p < 0,05$).

Os pacientes que tiveram gastrite crônica presente foram 64 (50,71%) e o tipo de atividade mais encontrada foi a discreta com 48 (38,09%) pacientes, seguida pela moderada com 14 (11,11%) e a densidade de infecção pelo *H. pylori* predominante foi a moderada com 19 (15,07%) pacientes infectados ($p < 0,05$).

Tabela 13 - Gastrite crônica no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do *H. pylori* no corpo gástrico pesquisado (EAP)

		<i>H. pylori</i> (corpo gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Gastrite crônica no corpo gástrico (EAP)	Crônica discreta	7 5,6%	4 3,2%	19 15,1%	18 14,3%	48 38,1%
	Crônica intensa	0 0,0%	0 0,0%	1 0,8%	1 0,8%	2 1,6%
	Crônica moderada	5 4,0%	2 1,6%	4 3,2%	3 2,4%	14 11,1%
	Crônica ausente	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	62 49,2%	62 49,2%
	Total	12 9,5%	6 4,8%	24 19,0%	84 66,7%	126 100,0%

$p < 0,05$

6.4.3 Antro gástrico (EAP)

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre antro gástrico normal ao EAP em relação à presença do *H. pylori* no antro gástrico, uma vez que, entre os 27 (21,4%) pacientes com antro gástrico normal no EAP nenhum evidenciou a presença do *H. pylori* no antro gástrico, enquanto que dos 99 (78,6%) pacientes com alterações histológicas no antro gástrico, 42 (33,3%) pacientes apresentaram positividade para a presença da bactéria no antro gástrico ($p < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Antro gástrico normal (EAP) e positividade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Antro gástrico normal	Não	57 45,2%	42 33,3%	99 78,6%
	Sim	27 21,4%	0 0,0%	27 21,4%
Total		84 66,7%	42 33,3%	126 100,0%

$p < 0,05$

Pode-se observar que 80 (63,5%) pacientes não apresentaram gastrite ativa no antro gástrico e dentre eles somente 4 (3,2%) apresentaram a infecção pelo *H. pylori* ($p < 0,05$) (Tabela 15).

Quarenta e seis (36,5%) pacientes tiveram gastrite ativa no antro gástrico e o tipo de atividade mais encontrada foi a com 19 (15,07%) pacientes, seguida pela intensa com 16 (12,69%) e por último a moderada em 11 (8,73%) pacientes. A densidade predominante de infecção pelo *H. pylori* foi a intensa em 17 (13,49%) pacientes, seguida da moderada com 13 (10,31%) pacientes e a escassa em 11 (8,73%) pacientes infectados ($p < 0,05$).

Tabela 15 - Gastrite ativa no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)				Total
		Escasso	Intenso	Moderado	Ausente	
Gastrite ativa no antro gástrico	Atividade discreta	6 4,8%	2 1,6%	2 1,6%	9 7,1%	19 15,1%
	Atividade intensa	1 0,8%	11 8,7%	4 3,2%	0 0,0%	16 12,7%
	Atividade moderada	2 1,6%	4 3,2%	5 4,0%	0 0,0%	11 8,7%
	Atividade ausente	2 1,6%	0 0,0%	2 1,6%	76 60,3%	80 63,5%
Total		11 8,7%	17 13,5%	13 10,3%	85 67,5%	126 100,0%

$p < 0,05$

Trinta e quatro (27,0%) pacientes não apresentaram gastrite crônica no antro gástrico e dentre eles nenhum apresentou a infecção pelo *H. pylori* ($p < 0,05$) (Tabela 16).

Dos 92 (73,01%) pacientes que tiveram gastrite crônica a mais encontrada foi de forma discreta com 50 (39,68%) pacientes, seguida pela moderada com 27 (21,42%) e depois a crônica intensa em 15 (11,9%) pacientes. A densidade predominante de infecção pelo *H. pylori* foi a intensa em 17 (13,5%) pacientes, seguida da moderada com 13 (10,3%) pacientes e a escassa em 11 (8,7%) pacientes infectados ($p < 0,05$).

Tabela 16 - Gastrite crônica no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do *H. pylori* no antro gástrico pesquisado através do EAP

	<i>H. pylori</i> (antro gástrico)				Total	
	Escasso	Intenso	Moderado	Ausente		
Gastrite crônica no antro gástrico	Crônica discreta	4 3,2%	0 0,0%	4 3,2%	42 33,3%	50 39,7%
	Crônica intensa	3 2,4%	9 7,1%	3 2,4%	0 0,0%	15 11,9%
	Crônica moderada	4 3,2%	8 6,3%	6 4,8%	9 7,1%	27 21,4%
	Crônica ausente	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	34 27,0%	34 27,0%
Total	11 8,7%	17 13,5%	13 10,3%	85 67,5%	126 100,0%	

$p < 0,05$

6.5 - Características imunológicas da amostra em relação à positividade do *H. pylori*

No presente estudo foi avaliada por reações de PCR em tempo real a expressão quantitativa de *mRNA* dos genes do TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, T-bet, GATA-3, nas biópsias da região do corpo gástrico. Dos resultados obtidos da quantificação relativa de *mRNA* com base da expressão do gene constitutivo da β -actina observou-se que a expressão da IL-17 foi significativamente maior nos pacientes com gastrite crônica moderada quando comparados com os pacientes normais e com os pacientes que apresentavam gastrite discreta (ANOVA/Bonferroni: $p < 0,05$; $p < 0,05$ respectivamente) (Gráfico 2).

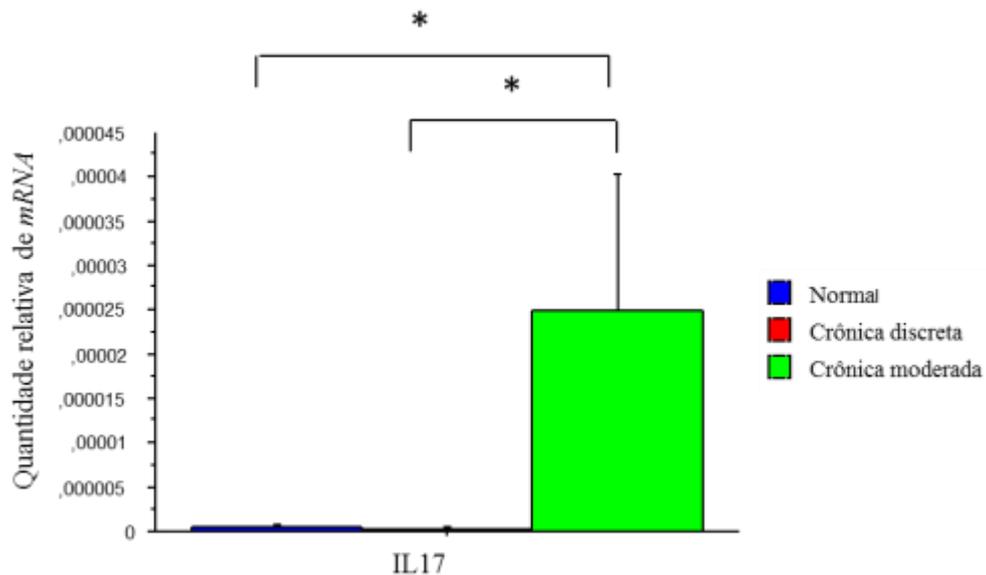


Gráfico 2 - Quantidade relativa de *mRNA* da IL-17 agrupados com presença de inflamação nas biópsias da mucosa do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni: $p < 0,05$; $p < 0,05$ respectivamente).

Em relação à quantificação relativa de *mRNA* da IL-4 comparada nos pacientes normais com o anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite crônica discreta e moderada não houve diferença significativa entre os grupos analisados (ANOVA/Bonferroni: $p=0,60$; $p=0,91$; $p=0,65$, respectivamente) (Gráfico 3).

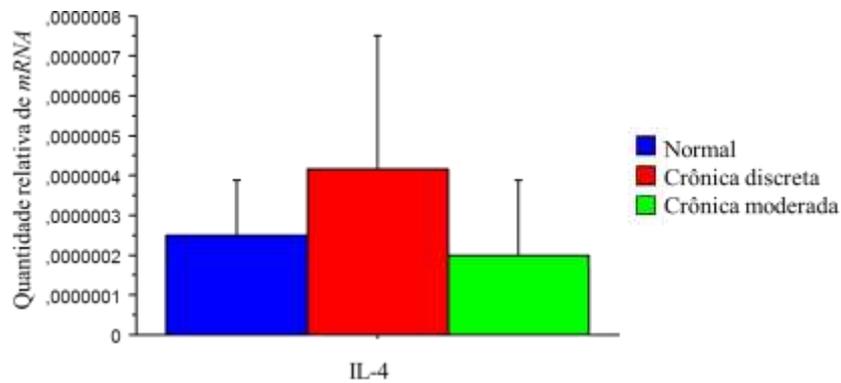


Gráfico 3 - Quantidade relativa de *mRNA* da IL-4 agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni: $p=0,60$; $p=0,91$; $p=0,65$, respectivamente)

Em relação à quantificação relativa de *mRNA* da IFN- γ comparada nos pacientes normais com o anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite crônica discreta e moderada não houve diferença significativa entre os grupos analisados (ANOVA/Bonferroni: $p=0,57$; $p=0,75$; $p=0,50$ respectivamente) (Gráfico 4).

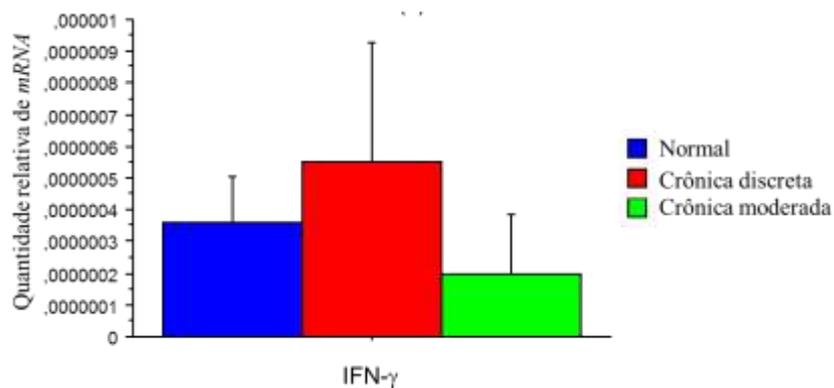


Gráfico 4 - Quantidade relativa de *mRNA* da IFN- γ agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni $p=0,57$; $p=0,75$; $p=0,50$, respectivamente)

Em relação à quantificação relativa de *mRNA* da IL-10 comparada nos pacientes normais com o anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite crônica discreta e moderada não houve diferença significativa entre os grupos analisados (ANOVA/Bonferroni: $p=0,16$; $p=0,39$; $p=0,91$, respectivamente).(Gráfico 5).

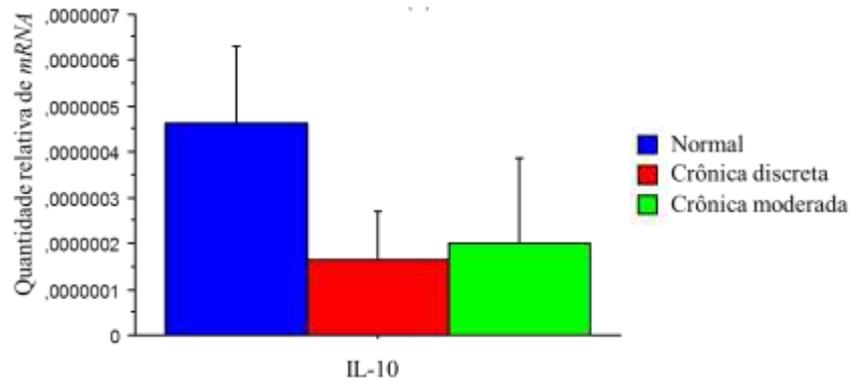


Gráfico 5 - Quantidade relativa de *mRNA* da IL-10 agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni $p=0,16$; $p=0,39$; $p=0,91$, respectivamente).

Dos resultados da quantificação relativa de *mRNA* observou-se que a expressão do IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 quando comparadas com a presença ou ausência do *H. pylori*. Observa-se um predomínio da IL-17 sobre as demais citocina embora não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Teste t não pareado: IFN: $p=0,27$; IL-4: $p=0,31$; IL-10: $p=0,55$, IL-17: $p=0,056$) (Gráfico 6).

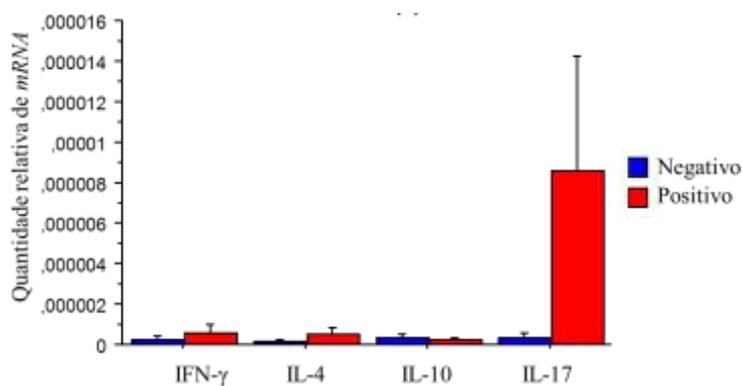


Gráfico 6 - Quantidade relativa de *mRNA* do IFN, IL4, IL-10 e IL-17 em biópsias da região do corpo do gástrico comparados presença ou ausência da infecção pelo *H.pylori* (Teste t não pareado: IFN: $p=0,27$; IL-4: $p=0,31$; IL-10: $p=0,55$, IL-17: $p=0,056$).

Em relação à quantificação relativa de *mRNA* da T-bet comparada nos pacientes normais com o anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite crônica discreta e moderada não houve diferença significativa entre os grupos analisados (ANOVA/Bonferroni: $p=0,54$; $p=0,64$; $p=0,39$, respectivamente) (Gráfico 7).

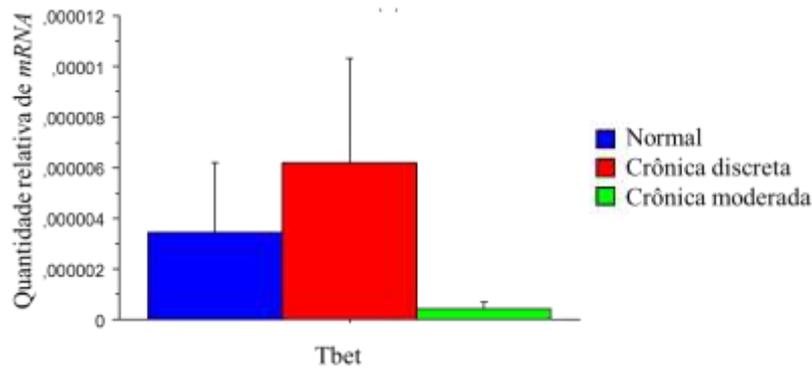


Gráfico 7 - Quantidade relativa de *mRNA* da T-bet agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni $p=0,54$; $p=0,64$; $p=0,39$, respectivamente).

A quantificação relativa de *mRNA* do GATA-3 apesar se estar elevada comparada nos pacientes normais com o anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite crônica discreta e moderada não houve diferença significativa entre os grupos analisados (ANOVA/Bonferroni: $p=0,60$; $p=0,91$; $p=0,65$, respectivamente) (Gráfico 8).

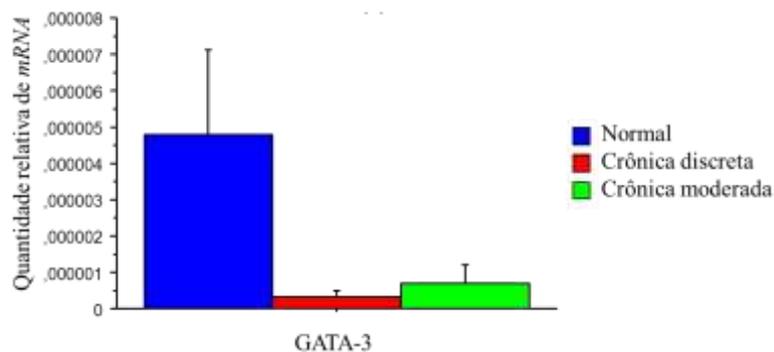


Gráfico 8 - Quantidade relativa de *mRNA* da GATA-3 agrupados com presença de inflamação nas biópsias do corpo gástrico. A barra representa a média e a linha vertical representa o desvio padrão da média (ANOVA/Bonferroni: $p=0,08$; $p=0,27$; $p=0,91$, respectivamente).

A quantificação relativa de *mRNA* do FoxP3 apesar se estar elevada nos pacientes normais e nos anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite crônica discreta comparadas com gastrite moderada não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Bonferroni: $p=0,60$; $p=0,91$; $p=0,65$, respectivamente).(Gráfico 9).

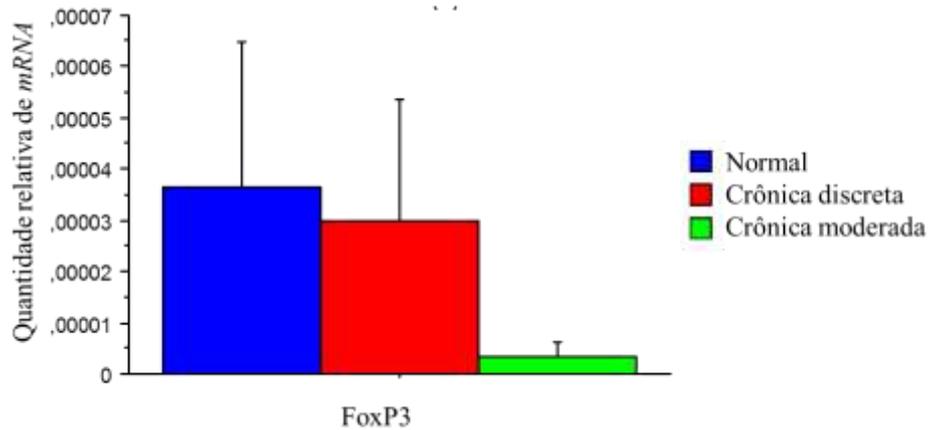


Gráfico 9 - Número relativo de cópias de *mRNA* do FoxP3 em biópsias da região do corpo do estômago comparados com o anatomopatológico das biópsias dos pacientes com gastrite (Bonferroni: $p=0,08$; $p=0,27$; $p=0,91$, respectivamente).

Dos resultados da quantificação relativa de *mRNA* observou-se que houve a expressão do T-bet, GATA-3, FoxP3 quando comparadas com a presença ou ausência do *H. pylori* porém não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Gráfico 10).

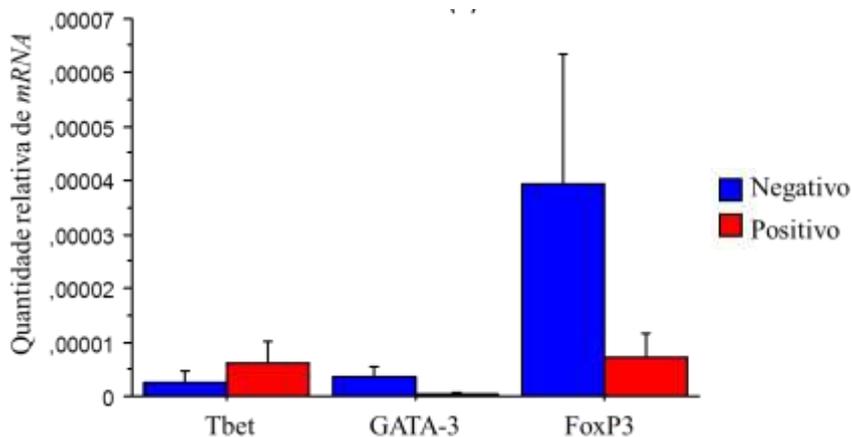


Gráfico 10 - Quantidade relativa de *mRNA* do T-bet, GATA-3, FoxP3 em biópsias da região do corpo do gástrico comparadas presença ou ausência da infecção pelo *H.pylori* (Teste t não pareado: T-bet: $p=0,41$, GATA-3: $p=0,17$; FoxP3: $p=0,34$).

Houve uma correlação positiva e significativa expressão da IL-10 com a expressão do FoxP3 (Correlação de Spearman; $p < 0,05$) (Gráfico 11).

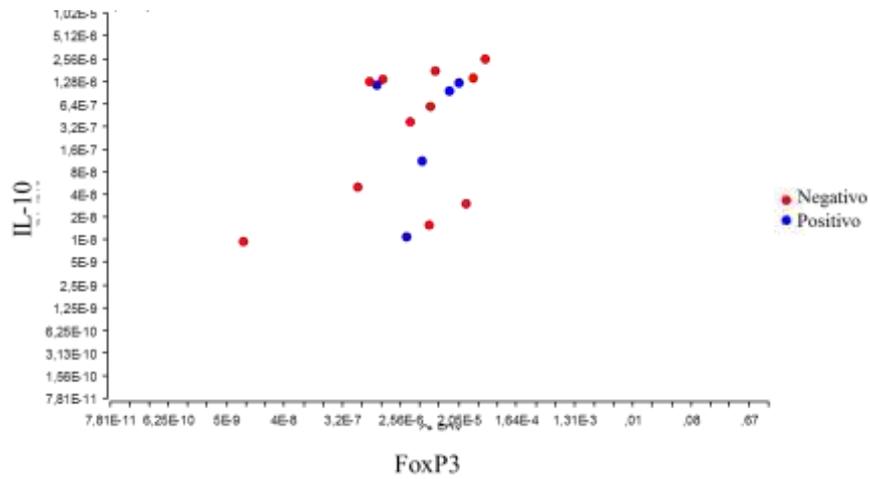


Gráfico 11 – Correlação da IL-10 com a expressão do FoxP3 ($p < 0,05$)

Houve uma correlação positiva e significativa expressão da IL-4 com a expressão do GATA-3 (Correlação de Spearman; $p < 0,05$) (Gráfico 12).

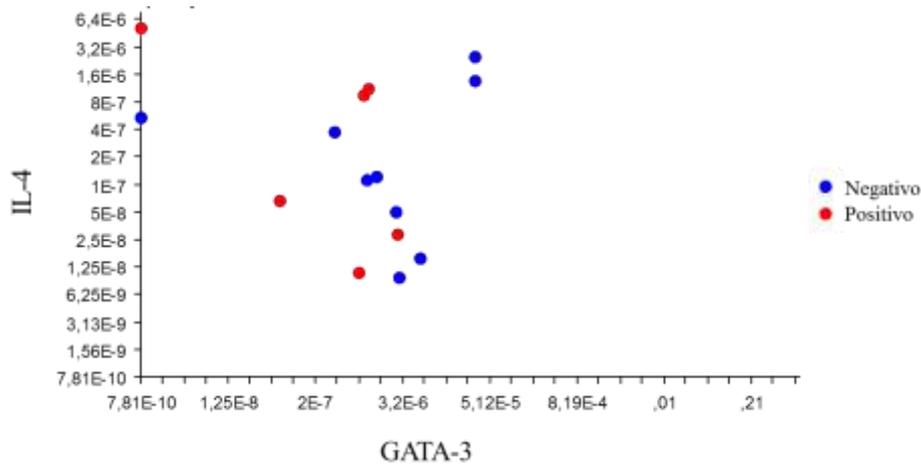


Gráfico 12 – Correlação da IL-4 com a expressão do GATA-3 ($p < 0,05$)

7

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

H. pylori infecta atualmente aproximadamente metade da população mundial e esta bactéria é considerada como a principal causa de gastrite. A gastrite surge como uma resposta imune local contra a bactéria, porém a maioria dos pacientes se mostra assintomática, e isto foi bem evidenciado neste estudo, onde não conseguimos estabelecer nenhuma correspondência clínica como um dado preditivo para o diagnóstico do *H. pylori*, apesar de um minucioso questionário ter sido feito pelo médico entrevistador.

Para a detecção do *H. pylori* no presente estudo, foram utilizados três métodos diferentes: teste rápido da urease no antro gástrico realizado no momento do exame de endoscopia digestiva alta e exame anatomopatológico no corpo e antro gástrico para a pesquisa da bactéria em 126 pacientes e em 49 pacientes, também realizou-se biologia molecular para pesquisa do gene 16S *rRNA*. Estas técnicas foram realizadas no intuito de evitar os chamados falsos-negativos, visto que não existe um único exame que é considerado “ideal” para o diagnóstico de infecção pelo *H. pylori*. Desta forma, pode-se sugerir que neste estudo houve uma minimização nos pacientes *H. pylori* falsos negativos, o que o deixou bastante confiável.

Sabe-se que uma porcentagem de pacientes infectados pode evoluir para patologias mais graves no trato digestivo superior como a úlcera péptica, gastrite atrófica (precursora muitas vezes do câncer gástrico) e o linfoma tipo MALT, justificando assim a importância do diagnóstico correto, tipos de cepas bacterianas e o tratamento desta bactéria nos pacientes infectados.

No Brasil a prevalência da infecção pelo *H. pylori* é bastante variada e depende muito da região pesquisada, sendo que, taxas mais elevadas são encontradas em regiões de nível socioeconômico mais baixo. Neste estudo foi evidenciada uma porcentagem para a presença da bactéria, através do EAP no antro gástrico, em 33,3 % dos pacientes examinados, isto é, 42 dos 126 estudados. Valor baixo para o Brasil, fato que pode ser explicado pela melhor condição socioeconômica dos pacientes que foram procedentes da UFTM e de Clínica Particular.

Baseando-se somente na anamnese, e em situações clínicas frequentes como dor epigástrica, pirose, tabagismo, etilismo, obesidade, e diabetes dentre outras, não foi obtido, neste estudo, uma prévia para o diagnóstico da bactéria. A dor epigástrica foi o sintoma mais frequente acometendo 105 (83,3%) pacientes, seguida pelo sintoma pirose que se manifestou em 86 (68,3%) pacientes, porém sem significância estatística. Não conseguimos estabelecer uma relação entre o sexo masculino e feminino e a presença da bactéria no estômago.

Neste estudo concluímos que os pacientes que estavam fazendo uso de inibidores de bomba de prótons apresentaram uma negatividade maior para a presença da bactéria com importância estatística significativa, isto é, o uso de inibidores de bomba de prótons diminuiu a positividade da bactéria no estômago diagnosticado pelo EAP das biópsias do antro gástrico.

O exame de endoscopia digestiva alta foi realizado em todos os 126 pacientes estudados e a conclusão do exame teve significância estatística diante da presença da bactéria no estômago. Dentre elas podemos citar o corpo e antro gástrico normal e ausência de *H. pylori* e a gastrite de corpo e antro gástrico e a presença da bactéria em cada região respectivamente.

Já se questionou no passado a associação da piora da esofagite de refluxo em alguns pacientes quando tratados da infecção pelo *H. pylori*. A explicação de tal fato se dá pela volta do aumento da secreção de ácido pelo estômago, e assim tornar o refluxo ácido gástrico para o esôfago mais agressivo, porém, no presente estudo esta associação não foi comprovada. A esofagite de refluxo esteve presente no exame de EDA em 29 (23%) pacientes e destes, um total de 25 (19,8%) não tiveram a presença da bactéria no antro gástrico. Já a normalidade do esôfago esteve em 97 (77,0%) pacientes e destes, 59 (46,8%) pacientes não tiveram a presença da bactéria diagnosticada.

No presente estudo, foram encontrados pacientes com gastrite crônica e sem evidência de infecção pelo *H. pylori*. De acordo com a literatura existem algumas explicações para este índice de negatividade, apesar de diferentes exames de detecção ser utilizados. Assim, o achado de gastrite crônica ativa sem a presença detectável de *H. pylori* parece estar em ascensão no ocidente e para isto são citados fatos que incluem antibioticoterapia para tratamento de outras infecções, uso generalizado de inibidores de bomba de prótons,

amostragem inadequada da bactéria ou técnicas de colorações abaixo do ideal (GENTA; LASH, 2010; NORDENSTEDT et al., 2013).

Quando no exame anatomopatológico dos pacientes estudados foi constatada a ausência de alterações no corpo do estômago, esta falta de alterações mostrou uma relação direta com a ausência da bactéria. Isto é, observamos que dos 59 (46,8%) pacientes que apresentaram o corpo do estômago normal ao exame anatomopatológico somente 1 (0,08%) paciente teve a positividade para o *H. pylori*. Quando a bactéria se mostrou presente no corpo gástrico, observou-se que a densidade de infecção mais encontrada do *H. pylori* em relação às alterações histopatológicas foi de forma “moderada”, atingindo 24 (19,0%) pacientes dos 67 (53,2%) pacientes com alterações histopatológicas no corpo gástrico.

Já no antro gástrico, todos os 27 (21,4%) pacientes com antro gástrico normal tiveram a ausência da bactéria no mesmo. Dos 99 (79,6%) pacientes com alterações histopatológicas, 57 (45,2%) pacientes tiveram a presença da bactéria no mesmo.

A secreção gástrica é bastante influenciada pela infecção crônica do *H. pylori* e vai depender do grau e localização da gastrite e conseqüentemente relacionados com o tipo de doença no estômago. Sabe-se que em indivíduos com gastrite predominantemente antral pelo *H. pylori*, tem um aumento da secreção de ácido clorídrico e daí predispondo a formação de úlcera duodenal, enquanto que nos outros com gastrite predominantemente no corpo ou pangastrite, a secreção de ácido é diminuída, resultando em atrofia gástrica e assim estes indivíduos têm um risco aumentando de câncer gástrico (MCCOLL; EL-OMAR; GILLEN, 1998).

Neste estudo podemos observar que dos 126 pacientes estudados, 62 (49,2%) pacientes não apresentaram gastrite crônica no corpo gástrico e dentre eles nenhum apresentou a infecção pelo *H. pylori*, enquanto que os pacientes que tiveram gastrite crônica presente foram 64 (50,7%) e o tipo de atividade mais encontrada foi a discreta com 48 (38,09%) pacientes, e a densidade de infecção pelo *H. pylori* predominante foi a moderada com 24 (19,0%) pacientes infectados. Mostrando assim uma íntima relação da bactéria com a gastrite crônica do corpo gástrico.

No presente estudo a transcrição de *mRNA* da IL-17 encontrada no corpo gástrico e comparada com a intensidade do processo inflamatório no mesmo local, verificou-se um

aumento significativo da IL-17 nos paciente com infiltrado inflamatório de intensidade moderada. Estudos demonstram que a IL-17 juntamente com a IL-8 aumentam a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos, sugerindo que a IL-17 possa ter um possível papel importante na manutenção e expansão do processo inflamatório agudo durante a infecção *H. pylori* (LUZZA et al., 2000) No exame anatomopatológico do presente estudo, observou-se que, o infiltrado com intensidade discreta, moderada e acentuada, era constituído predominantemente de neutrófilos acompanhado células mononucleares. A literatura aponta uma forte associação da IL-17 com o tipo de infiltrado de células mononucleares e neutrófilos presentes em biópsias de pacientes com úlcera gástrica. E que níveis de IL-17 e IL-8 também estavam elevados em pacientes *H. pylori* positivos e não ulcerosos (MIZUNO et al., 2005). Estudos também indicam que a produção de IL-17 está aumentada durante infecção pelo *H. pylori*, e os autores sugerem que esta citocina possa estar desempenhando um papel importante na resposta inflamatória à colonização *H. pylori* (LUZZA et al., 2000). Por outro lado, dados na literatura apontam que a IL-17 em crianças infectadas pelo *H. pylori* apresentam uma redução significativa do processo inflamatório na mucosa gástrica e conseqüentemente diminuição do infiltrado de neutrófilos. Ainda comparando o número de células Th17 destas crianças com adultos também infectados pela *H. pylori*. Os autores observaram que tanto as células Th17 como a quantidade de *mRNA* da IL-17 estavam significativamente menor nas crianças comparadas com os adultos infectados. Os autores sugerem que respostas Th17/IL-17 gástricas diminuídas nas crianças pode ter como consequência o aumento da atividade das células T reguladoras da mucosa nesta faixa etária (SERRANO et al., 2013). Assim o aumento da IL-17 no presente estudo, parece ter um papel importante na manutenção do processo inflamatório crônico nestes pacientes infectados pelo *H. pylori*.

No presente estudo as citocinas que representam o perfil Th1, Th2, Treg não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o processo inflamatório gástrico. Foram quantificadas a transcrição do *mRNA* porém sem diferença estatística. Já quando o padrão de resposta dos Linfócitos T auxiliares (LTh) foram analisados com os respectivos fatores de transcrição (T-bet, GATA-3 e FoxP3) que o padrão de citocinas expressos pode ser confirmado pela correlação positiva e significativa com seu respectivo fator de transcrição.

Foi demonstrado em vários modelos experimentais que é necessário IFN- γ (classicamente uma citocina Th1) para a indução de gastrite devido a *H. pylori* em ratinhos (SAWAI et al., 1999) e que a interleucina 10 (IL-10) e IL-4, em geral, relacionado com respostas de Th2 e Treg, estão associadas a proteção (EATON; MEFFORD; THEVENOT, 2001). Assim, existia evidência forte de que a gastrite devido a *H. pylori* estava associada ao perfil Th1. Entretanto, estudos experimentais confirmam em parte o papel do LTh1 no desenvolvimento de gastrite devido a *H. pylori*. A gastrite pode ser desenvolvida em animais C57BL/6J infectados com *H. pylori*, mas não em animais sem o fator de transcrição T-bet, um fator importante na diferenciação do perfil LTh1 (EATON et al., 2006). Entretanto, a expressão do FoxP3 foi encontrado descrito apenas em crianças com gastrite e com a presença da *H. pylori*. E nestes estudos as células Treg FoxP3 + parecem desempenhar um papel na infecção persistente pelo *H. pylori* (CHO; CHO; SEO, 2012), com diminuição do processo inflamatório gástrico e conseqüentemente diminuição dos níveis de IL-17. Os autores sugerem que as crianças podem ter como conseqüência o aumento da atividade das células T reguladoras da mucosa nesta faixa etária (SERRANO et al., 2013). Assim, no presente estudo apesar de não ser encontrada diferença significativa na expressão do IFN- γ , IL-4, IL-10, essas citocinas foram detectadas nos pacientes com gastrite e com infecção pelo *H. pylori* juntamente com a expressão dos seus fatores de transcrição (T-bet, GATA-3 e FoxP3).

Assim sendo, existe uma correlação positiva entre as citocinas do padrão Th1, Th2, Treg com seus respectivos fatores de transcrição. No entanto, a IL-17 foi significativamente maior nas biópsias dos pacientes com maior processo inflamatório local.

8

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- O *H. pylori* não mostrou nenhum fator clínico preditivo de infecção,
- No exame de endoscopia digestiva alta destacaram-se dados do laudo do exame como sugestivos de provável infecção da bactéria
- O exame anatomopatológico mostrou-se necessário para classificar as diferentes gastrites e/ou alterações citológicas provocadas pelo germe.
- A IL-17 pareceu ser a principal interleucina responsável pela manutenção do processo inflamatório crônico gástrico em pacientes infectados pelo *H. pylori*.

9

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ALLAKER, R. P. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 312-7, Apr 2002.

AMIEVA, M. R.; EL-OMAR, E. M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 134, n. 1, p. 306-23, Jan 2008.

BACCHI, et al. **Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos - Sociedade Brasileira de Patologia** - 3ª. ed. , capítulo 39, pag. 407-411, 2005.

BEALES, I. L. Effects of pro-inflammatory cytokines on acid secretion. **Dig Dis Sci**, v. 45, n. 2, p. 289-90, Feb 2000.

BITTENCOURT, P. F. et al. Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 5, p. 325-34, Sep-Oct 2006.

BODGER, K. et al. Interleukin 10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 4, p. 285-92, Apr 2001.

CASTELLINO, F.; GERMAIN, R. N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 519-40, 2006.

CHEY, W. D.; WONG, B. C.; PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF, G. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Gastroenterol**, v. 102, n. 8, p. 1808-25, Aug 2007.

CHO, K. Y.; CHO, M. S.; SEO, J. W. FoxP3+ regulatory T cells in children with *Helicobacter pylori* infection. **Pediatr Dev Pathol**, v. 15, n. 2, p. 118-26, Mar-Apr 2012.

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

CRABTREE, J. E. et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. **Lancet**, v. 338, n. 8763, p. 332-5, Aug 10 1991.

DIXON, M. F. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol**, v. 20, n. 10, p. 1161-81, Oct 1996.

DOWSETT, S. A.; KOWOLIK, M. J. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 3, p. 226-33, 2003.

EATON, K. A. et al. Role of transcription factor T-bet expression by CD4+ cells in gastritis due to *Helicobacter pylori* in mice. **Infect Immun**, v. 74, n. 8, p. 4673-84, Aug 2006.

EATON, K. A.; MEFFORD, M.; THEVENOT, T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. **J Immunol**, v. 166, n. 12, p. 7456-61, Jun 15 2001.

EL-OMAR, E. M. et al. The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 99, Jul 5 2001.

EVERHART, J. E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 29, n. 3, p. 559-78, Sep 2000.

GENTA, R. M.; LASH, R. H. *Helicobacter pylori*-negative gastritis: seek, yet ye shall not always find. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 8, p. e25-34, Aug 2010.

GOODWIN, C. S. *Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v. 2, n. 8670, p. 1019-20, Oct 28 1989.

GOODWIN, C. S. et al. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. **J Med Microbiol**, v. 19, n. 2, p. 257-67, Apr 1985.

GRUBEL, P. et al. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 6, p. 1300-3, Jun 1997.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005.

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 3, p. 349-56, Jun 2006.

KITANI, A. et al. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. **J Immunol**, v. 165, n. 2, p. 691-702, Jul 15 2000.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 566-73, Jul 1 2006.

KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 449-90, Jul 2006.

LUZZA, F. et al. Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p. 5332-7, Nov 1 2000.

MAGGI, E. et al. Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones. **Eur J Immunol**, v. 18, n. 7, p. 1045-50, Jul 1988.

MARSHALL, B. J. et al. Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. **Gastroenterology**, v. 99, n. 3, p. 697-702, Sep 1990.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v. 1, n. 8390, p. 1311-5, Jun 16 1984.

MATHUR, A. N. et al. T-bet is a critical determinant in the instability of the IL-17-secreting T-helper phenotype. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1595-601, Sep 1 2006.

MCALLISTER, F. et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 404-12, Jul 1 2005.

MCCOLL, K. E. Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**, v. 362, n. 17, p. 1597-604, Apr 29 2010.

MCCOLL, K. E.; EL-OMAR, E.; GILLEN, D. Interactions between *H. pylori* infection, gastric acid secretion and anti-secretory therapy. **Br Med Bull**, v. 54, n. 1, p. 121-38, 1998.

MIZUNO, T. et al. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 40, p. 6305-11, Oct 28 2005.

MOSELEY, T. A. et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 2, p. 155-74, Apr 2003.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, n. 7, p. 2348-57, Apr 1 1986.

NGUYEN, T. N.; BARKUN, A. N.; FALLONE, C. A. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. **Helicobacter**, v. 4, n. 3, p. 185-97, Sep 1999.

NORDENSTEDT, H. et al. *Helicobacter pylori*-negative gastritis: prevalence and risk factors. **Am J Gastroenterol**, v. 108, n. 1, p. 65-71, Jan 2013.

O'TOOLE, P. W.; LANE, M. C.; PORWOLLIK, S. *Helicobacter pylori* motility. **Microbes Infect**, v. 2, n. 10, p. 1207-14, Aug 2000.

PANDOLFINO, J. E.; HOWDEN, C. W.; KAHRILAS, P. J. *H. pylori* and GERD: is less more? **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 7, p. 1222-5, Jul 2004.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1133-41, Nov 2005.

ROMAGNANI, S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. **Immunol Today**, v. 12, n. 8, p. 256-7, Aug 1991.

SAWAI, N. et al. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. **Infect Immun**, v. 67, n. 1, p. 279-85, Jan 1999.

SCHNYDER, B. et al. IL-17 reduces TNF-induced Rantes and VCAM-1 expression. **Cytokine**, v. 31, n. 3, p. 191-202, Aug 7 2005.

SERRANO, C. et al. Downregulated Th17 responses are associated with reduced gastritis in *Helicobacter pylori*-infected children. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 5, p. 950-9, Sep 2013.

SHI, R. et al. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. **Helicobacter**, v. 13, n. 2, p. 157-65, Apr 2008.

UEMURA, N. et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med**, v. 345, n. 11, p. 784-9, Sep 13 2001.

UMETSU, D. T. et al. Functional heterogeneity among human inducer T cell clones. **J Immunol**, v. 140, n. 12, p. 4211-6, Jun 15 1988.

VAKIL, N. et al. Patterns of gastritis and the effect of eradicating *Helicobacter pylori* on gastro-oesophageal reflux disease in Western patients with non-ulcer dyspepsia. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, n. 1, p. 55-63, Jul 1 2006.

VELDHOEN, M.; STOCKINGER, B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. **Trends Immunol**, v. 27, n. 8, p. 358-61, Aug 2006.

WEN, S.; MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 282, n. 1, p. 1-8, Sep 8 2009.

WOODWARD, M.; MORRISON, C.; MCCOLL, K. An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. **J Clin Epidemiol**, v. 53, n. 2, p. 175-81, Feb 2000.

YEA, S. S. et al. Association between TNF-alpha promoter polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA subtype infection. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 9, p. 703-6, Sep 2001.

ZATERKA, S. et al. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter**, v. 12, n. 1, p. 82-8, Feb 2007.

10

ANEXOS

10. ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Data: ____/____/____

Número de registro: _____

Nome do Paciente:

Você está sendo convidado para participar da pesquisa clínica: “ESTUDO DO *Helicobacter pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA: HISTÓRIA CLÍNICA, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA, EXAME ANATOMOPATOLÓGICO E RESPOSTA IMUNE” de responsabilidade da Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e Dr. Emerson Abdulmassih Wood da Silva e que será desenvolvida na Universidade de Uberaba (UNIUBE) e Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Esta pesquisa pretende estudar as alterações da parte interna do seu esôfago e do seu estômago, já que você apresenta sintomas do trato gastrointestinal superior, bem como pesquisar a presença de uma bactéria chamada de *Helicobacter pylori* no seu estômago.

Acreditamos que ela seja importante porque irá ajudar você e outros pacientes a terem um melhor esclarecimento da doença do refluxo, da presença da bactéria no estômago, bem como melhorar os seus possíveis tratamentos.

Para a realização deste estudo, precisamos da sua colaboração em autorizar a utilização destes fragmentos da parte interna do seu esôfago e do seu estômago.

Deixamos bem claro que o exame de endoscopia digestiva alta que agora você irá fazer, já realiza normalmente a retirada de fragmentos da parte interna do esôfago e do estômago.

Portanto ao autorizar a utilização dos fragmentos da parte interna do seu esôfago e do seu estômago para o presente estudo, você estará tendo uma possível melhora no seu diagnóstico e no seu tratamento e isto será feito sem nenhum custo a mais tanto físico bem como financeiro.

Os possíveis desconfortos ou riscos que poderão acontecer são os mesmos de um exame de endoscopia digestiva alta realizada de rotina, isto é, o exame é geralmente seguro e

as complicações são raras. Pode ocorrer sangramento, normalmente mínimo, após a retirada dos fragmentos citados. Outros riscos incluem irritação no local onde foi aplicada a medicação endovenosa, reações alérgicas aos medicamentos sedativos empregados. Complicações maiores como perfuração, são muito raras.

Pela sua participação no estudo, você não receberá nenhum pagamento, e também não terá nenhum custo. Você poderá parar de participar a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo para você ou para seu tratamento/atendimento.

Sinta-se à vontade para solicitar, a qualquer momento, os esclarecimentos que você julgar necessários.

Se você aceitar participar deste estudo, as informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação de você e de outros pacientes, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Será também utilizada imagens a nível de microscopia e imunologia do material coletado, porém sem identificar o nome de nenhum paciente, conforme já citado.

Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Uma cópia desse termo, assinado por um membro responsável pela equipe, onde consta a identificação e os telefones da equipe de pesquisadores, está sendo entregue a você, caso queira entrar em contato com eles.

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Dados dos pesquisadores:

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rodrigues

e-mail: denise.rodrigues@uniube.br 9158-9234

Dr. Emerson Abdulmassih Wood da Silva

e-mail: wood@mednet.com.br 9972-2000

Autorização

Eu, _____, após a leitura (ou escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com um dos pesquisadores responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Assinatura de uma testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário (ou seu representante legal) para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Dados dos pesquisadores:

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rodrigues

e-mail: denise.rodrigues@uniube.br 9158-9234

Mestrando Dr. Emerson Abdulmassih Wood da Silva

e-mail: wood@mednet.com.br 9972-2000

Questionário Médico para Pesquisa Clínica

Data: ____/____/____ Número de registro: _____ Grupo: _____

Título da Pesquisa:

“ESTUDO DO *Helicobacter pylori* NA MUCOSA GÁSTRICA: HISTÓRIA CLÍNICA, ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA, EXAME ANATOMOPATOLÓGICO E RESPOSTA IMUNE”

Pesquisadores responsáveis:

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e

Dr. Emerson Abdulmassih Wood da Silva

Identificação do Paciente:

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Cor: _____ Estado Civil: _____

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____ Profissão: _____

Endereço: _____ N° _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Telefones: Celular (____) _____ Fixo: (____) _____

e-mail de contato: _____

História Clínica:

Dor: não () sim () Tipo: pirose () cólica () outras: _____

Náuseas: não () sim () Vômitos: não () sim () Disfagia: não () sim ()

Laringite de repetição: não () sim () Rouquidão: não () sim () Pigarro: não () sim ()

Tosse seca “tipo alérgica”: não () sim () Tosse noturna: não () sim ()

Asma ou bronquite: não () sim () Recente: não () sim ()

Regurgitação: não () sim () De: líquidos () alimentos () outros ()

Tabagismo: não () sim () carga tabágica: _____

Etilismo: não () sim () quantidade diária: _____

Gravidez: não () sim () G ___ P ___ C ___ A ___

Outros sintomas e/ou doenças:

Antecedentes de câncer na família: não () sim ()

Qual e quando:

Tratamento clínico anterior para doenças do aparelho digestivo: não () sim ()

Qual doença:

Cirurgias realizadas:

Medicamentos atualmente em uso:

Tratamento anterior para *Helicobacter pylori*: não () sim ()

omeprazol 20 + claritromicina 500 + amoxicilina 500 - bid ()

lansoprazol 30 + claritromicina 500 + amoxicilina 500 - bid ()

lansoprazol 30 + levofloxacino 500 + amoxiciliana 500 - bid ()

Outros medicamentos utilizados no tratamento:

Responsável pelo preenchimento: _____

Exame de Endoscopia Digestiva Alta

Data: ____/____/____

Número de registro: _____

Nome do Paciente:

Dados do Exame de Endoscopia Digestiva Alta:

Nome do médico examinador: _____

Local de realização do exame: _____

Equipamento utilizado: _____

Medicação utilizada no exame: _____

Local de biópsias realizadas:

esôfago distal () antro gástrico () corpo gástrico () fundo ()

outros: _____

Esofagoscopia:

Normal: sim () não ()

Esofagite: não () sim () Tipo: _____

Esofagite erosiva: não () sim () grau I () grau II () grau III () grau IV ()

Esôfago de Barrett: não () sim () curto () longo ()

Hérnia de Hiato: não () sim () Tamanho: ____cm Tipo: desli () rolam ()

Estenose péptica: não () sim () úlcera: não () sim () erosões: não () sim ()

Câncer: não () sim ()

Outros: _____

Gastroscopia:

Normal: sim () não ()

Gastrite: não () sim () elevada () plana () erosiva () enantematosa ()

Antro () corpo () fundo () atrofica ()

Úlcera gástrica: não () sim () ativa () cicatriz () antro () corpo () fundo ()

Incisura angularis () pré-pilórica ()

Câncer: não () sim () antro () corpo () cárdia () pré-pilórico ()

Outros: _____

Duodenoscopia:

Normal: sim () não ()

Duodenite: não () sim ()

Úlcera duodenal: não () sim () ativa () cicatriz ()

Outros: _____

Teste da urease: positivo () negativo ()

Diagnóstico clínico do exame de endoscopia digestiva: _____

Exame Anatomopatológico

Data: ____/____/____ Lâmina nº : _____ Número de registro: _____

Nome do Paciente:

Esôfago:

Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Exsudato neutrofílico: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Eosinófilos: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Hiperplasia do epitélio escamoso: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Metaplasia intestinal especializada: presente () ausente ()
 () incompleta; () completa
 () focal () multifocal () difusa

Corpo Gástrico:

Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Exsudato neutrofílico: () ausente; () presente: () mínimo; () moderado; intenso ()
 Reação do epitélio foveolar: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Metaplasia intestinal: () ausente; presente ()
 () incompleta; () completa
 () focal () multifocal () difusa
 Helicobacterpylori() ausente () presente ; Escasso() ; moderado () ; muito ()

Antro Gástrico:

Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Exsudato neutrofílico: () ausente; () presente: () mínimo; () moderado; intenso ()
 Reação do epitélio foveolar: () ausente; () mínimo; () moderado; intenso ()
 Metaplasia intestinal: () ausente; presente ()
 () incompleta; () completa
 () focal () multifocal () difusa
 Helicobacterpylori: () ausente () presente ; escasso() ; moderado () ; muito ()

Diagnóstico:



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

HOSPITAL DE CLÍNICAS

Diretoria de Pesquisa

Av Getúlio Guarita, 130 - Cep: 38.025-440 - Uberaba MG

Fone: (34) 3318 5211 - E-mail - diretoria.pesquisa@hc.uftm.edu.br

Mem. 24/2013/Dir.Pesq./HC/UFTM.

Uberaba, 21 de junho de 2013.

À: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Assunto: parecer de projeto

1. Em relação à solicitamos de V.Sa. de autorização para realização da Pesquisa "*Avaliação da resposta imune na mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de Helicobacter pylori e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de Helicobacter pylori*", ressaltamos que o nosso parecer para realização da mesma é favorável.

Atenciosamente,


Dr. Helio Moraes de Souza
Diretor de Pesquisa/HC/UFTM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da resposta imune na mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de *H. pylori* e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de *H. pylori*

Pesquisador: DENISE BERTULUCCI ROCHA RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 19666013.0.0000.5145

Instituição Proponente: Universidade de Uberaba - UNIUBE

Patrocinador Principal: Universidade de Uberaba - UNIUBE
Sociedade Educacional Uberabense

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 350.874

Data da Relatoria: 06/08/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto - Avaliação da resposta imune na mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de *Helicobacter pylori* e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de *Helicobacter pylori*. - coordenado pela profa Denise Bertulucci Rocha Rodrigues, vinculada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba.

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e laboratorial.

Serão analisados resultados de biópsias provenientes de exames de endoscopia alta, cujos pacientes foram indicados para esse tipo de exame por determinação médica.

Nas palavras dos proponentes - O estudo será embasado em exames de endoscopia digestiva alta (EDA), não mudando em nada a rotina dos cuidados de atenção à saúde dispensados aos paciente portadores de patologias do trato digestivo superior, ou seja, a realização de biópsias tanto do esôfago como do estômago já faz parte do esclarecimento diagnóstico do exame de EDA realizado no dia a dia. -

Objetivo da Pesquisa:

Apresenta-se como objetivos:

Geral:

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8959

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 350.874

Avaliar os mecanismos da resposta imune nas lesões da mucosa esofagiana e gástrica de pacientes com esofagite de refluxo portadores de *Helicobacter pylori* e pacientes com esofagite de refluxo não portadores de *Helicobacter pylori*.

Específicos:

- 1 Avaliar o processo inflamatório e condições da mucosa em biópsia de esôfago de pacientes portadores de esofagite de refluxo comparadas com grupo controle
- 2 Avaliar a presença da infecção por *H. pylori* em pacientes com esofagite de refluxo
- 3 Detectar e quantificar a presença de mastócitos.
- 4 Avaliar e quantificar a presença de fibrose.
- 5 Avaliar MMP-3 e MMP-9
- 6 Analisar in situ a expressão de citocinas do perfil th1(TNF- γ E IFN- γ), Th2(IL-4), Th17 (IL-17, IL-23) e Treg (TGF- β e IL-10).
- 7 Avaliar in situ a expressão de galectinas (1, 3 e 9).
- 8 Avaliar TLR-2 E TLR-4

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os inerentes a qualquer pesquisa com seres humanos, incluindo a perda da confidencialidade, adequadamente minimizado pelos proponentes. Não há risco adicional ao sujeito, pois ele tem a indicação da endoscopia pelo seu quadro de saúde. Se o paciente for positivo ou negativo para a bactéria *H. pilory* ele será incluído em um ou outro grupo da pesquisa.

O grupo envolve médicos, com experiência na realização e interpretação do exame endoscópico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é pertinente e aborda um tema importante na área médica, representado pela doença do refluxo gastro esofágico. O protocolo de pesquisa está bem apresentado e embasado na literatura científica atualizada.

Os objetivos são amplos e devem compor um número considerável de trabalhos científicos.

Serão incluídos como participantes indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, com indicação médica para realização de endoscopia digestiva alta.

Apresenta-se como critérios de exclusão:

- 1) Não concordância em participar

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG**Município:** UBERABA**Telefone:** (34)3319-8959**Fax:** (34)3314-8910**E-mail:** cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 350.874

- 2) Cirurgia prévia do trato digestivo superior
- 3) Grávidas
- 4) Pacientes com presença de comorbidades graves como neoplasias, doenças do colágeno e distúrbios de coagulação.
- 5) Pacientes que no momento do exame de endoscopia, a critério dos médicos pesquisadores, não apresentavam condições físicas ou mentais de participação no estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta-se a folha de rosto, o TCLE, um modelo de exame anatomopatológico (onde se anota as observações ao exame endoscópico).

Apresenta-se pareceres diversos, incluindo da diretoria clínica, do serviço de endoscopia, dos ambulatórios e da diretoria de pesquisa do Hospital de Clínicas da UFTM.

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está bem apresentado, inclui todos os documentos necessários, o TCLE está bem redigido e adequado. Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em 06 de agosto de 2013 a plenária votou de acordo com o relator.

UBERABA, 06 de Agosto de 2013

Assinador por:
Geraldo Thedei Junior
(Coordenador)

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3319-8959 **Fax:** (34)3314-8910 **E-mail:** cep@uniube.br