

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**ARGINASE-1 E PERFIL TREG PARECEM MODULAR  
PROCESSO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM GASTRITE  
CRÔNICA E *IL-33* PODE SER A CITOCINA DE ALARME NOS  
PACIENTES *H. pylori* POSITIVO**

**EMERSON ABDULMASSIH WOOD DA SILVA**

**UBERABA**

**2018**

**EMERSON ABDULMASSIH WOOD DA SILVA**

**ARGINASE-1 E PERFIL TREG PARECEM MODULAR  
PROCESSO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM GASTRITE  
CRÔNICA E *IL-33* PODE SER A CITOCINA DE ALARME NOS  
PACIENTES *H. pylori* POSITIVO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, como requisito para obtenção do título de Doutor.

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

Coorientador: **Prof. Dr. Virmondés Rodrigues Júnior**

**UBERABA**

**2018**

*Atestado de Aprovação*

---

**ATESTADO DE APROVAÇÃO**

Uberaba, 11 de dezembro de 2018.

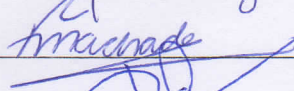
Defesa de tese e exame final de **EMERSON ABDULMASSIH WOOD DA SILVA**, candidato (a) ao grau de Doutor (a) em Ciências – Patologia Básica e Experimental.


A Comissão Examinadora comunica à Coordenadoria do PGCS/UFTM, para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Tese de Doutorado “**ARGINASE-1 E PERFIL TREG PARECEM MODULAR PROCESSO INFLAMATÓRIO EM PACIENTES COM GASTRITE CRÔNICA E IL-33 PODE SER A CITOCINA DE ALARME NOS PACIENTE H. PYLORI POSITIVO**” do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, bem como ao exame final.

O (a) candidato (a) foi considerado (a) APROVADO.

A COMISSÃO:

Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues 

Dra. Fernanda Machado Fonseca 

Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins 

Dra. Renata Margarida Etchebehere 

Dr. Guilherme Rocha Pardi 



*Dedicatória*

---

Dedico este trabalho para

Minha querida esposa Natalia, pelo amor vivido nestes longos anos de convivência, pela compreensão e pela constante cumplicidade a dois.

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

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

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

À minha querida neta Maria Isabel, que com poucos meses de mês de vida já nos encanta como se já tivesse anos de convivência familiar.

## *Agradecimientos*

---

## 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, carinho e competência me ajudou a concluir mais este estudo.

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior, meu coorientador, que com a sua experiência e competência colaborou grandemente com a conclusão deste trabalho.

Aos médicos do Serviço de Endoscopia Digestiva da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que mostraram entusiasmo e dedicação na realização dos exames e coleta de material dos pacientes

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.

Aos funcionários do Serviço de Endoscopia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que sem a participação deles, não teria conseguido concluir este trabalho.



Aos funcionários do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que muito me ajudaram na obtenção de resultados para conclusão deste estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo e que não foram citados aqui.

A todos 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. 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. Várias moléculas ativadoras do sistema imune têm sido descritas e estudadas na tentativa de conter a infecção pelo *H. pylori*. **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). Na resposta imune, analisar nos fragmentos do corpo gástrico por qPCR, a expressão *mRNA* das citocinas *IFN- $\gamma$* , *IL-17*, *IL-10*, *TGF- $\beta$* , *IL-6*, *IL-22*, *IL-23*, *IL-33*; dos fatores de transcrição *T-bet*, *ROR $\gamma$ t* e *FOXP3*; das enzimas *ARG1*, *ARG2* e *NOS2*; dos neuropeptídeos *VIP* e *TAC*, e seus respectivos receptores *VIP-R1* e *TAC-R1*. Comparar a expressão desses genes com a presença ou ausência da bactéria *H. pylori*. **MATERIAL E MÉTODOS:** foram avaliados 126 pacientes que apresentavam sintomas do trato digestivo superior e com indicação clínica de exame de Endoscopia Digestiva Alta (EDA). Antes da realização do exame de endoscopia digestiva alta foi feito um questionário clínico detalhado e durante o exame endoscópico realizaram-se biópsias múltiplas do esôfago, corpo e antro gástrico e teste rápido da urease. Fragmentos da mucosa do corpo e do antro gástrico foram coletados para o exame anatomopatológico e para análise da expressão das enzimas, citocinas e fatores de transcrição por meio de PCR em tempo real, qPCR. **RESULTADOS:** Não foi encontrado nenhum dado clínico que pudesse estar relacionado à presença da infecção do *H. pylori* no estômago. Os achados endoscópicos que tiveram relevância com a presença da bactéria foi a gastrite tanto no antro como no corpo gástrico ( $p < 0,05$ ). No exame anatomopatológico (EAP) os pacientes que usaram Inibidores de Bomba de Prótons (IBP) apresentaram uma diminuição da positividade da bactéria no antro e no corpo gástrico ( $p < 0,05$ ). A presença da gastrite no corpo gástrico ou antro gástrico teve significância com a positividade da bactéria ( $p < 0,05$ ). A expressão do gene *ARG1* foi

significativamente maior no grupo de pacientes com gastrite crônica sem atividade quando comparada ao grupo controle (Kruskal Wallis;  $p=0.02$ ). A expressão do gene do *TGF- $\beta$*  e seu fator de transcrição *FOXP3* foram significativamente maiores no grupo de pacientes com gastrite crônica sem atividade, quando comparada ao grupo controle. Ao comparar a expressão dos genes *IFN- $\gamma$* , *IL-17*, *IL-10* e *TGF- $\beta$*  e os fatores de transcrição *T-bet* e *ROR $\gamma$  $\tau$* , com a presença ou ausência do *H.pylori*, não houve diferença significativa. No entanto, a expressão do *FOXP3* foi significativamente menor nos pacientes *H. pylori* positivo quando comparado com os pacientes *H. pylori* negativos (Mann-Whitney;  $p=0.01$ ). **CONCLUSÕES:** Infecção por *H. pylori* não mostrou nenhum fator clínico preditivo da sua presença. Na EDA destacou-se a presença da gastrite no antro como dado de provável infecção da bactéria. O uso de IBPs deverá ser suspenso por pelo menos duas semanas antes da EDA para evitarmos falsos negativos da presença do *H. pylori* no estômago. O EAP mostrou-se necessário para classificar os diferentes tipos gastrites e/ou alterações histopatológicas provocadas pela bactéria. *ARG-1* e perfil *Treg* parecem estar modulando o processo inflamatório, protegendo esses pacientes de lesões teciduais com gastrite crônica sem atividade. Ainda, sugerimos que a *IL-33* pode ser um mediador crucial da resposta imune à infecção após dano na mucosa gástrica.

Palavras chaves: *Helicobacter pylori*, gastrites, *Arginase-1*, *TGF- $\beta$* , *FOXP3*, *Treg*, *IL-33*.

*Abstract*

---

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a highly prevalent bacterium in our midst and is directly involved in several diseases of the upper digestive tract such as gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. In this study, predictive data from the clinical, endoscopic, anatomopathological and immune response mechanisms were investigated against the presence of this bacterium. Immune activating molecules have been described and studied in an attempt to contain *H. pylori* infection. **OBJECTIVES:** to study the presence of *H. pylori* infection in the gastric mucosa with the clinical history, medical history, concomitant diseases, and data from the upper digestive endoscopy (UDE) examination of the anatomopathological examination (APE). At immune response, analyse fragments of the gastric body by qPCR, mRNA expression of *IFN $\gamma$*  cytokines, *IL-17*, *IL-10*, *TGF  $\beta$* , *IL-6*, *IL-22*, *IL-23*, *IL-33*; of the transcription factors *T-bet*, *ROR  $\gamma$ t* and *FOXP3*; of the enzymes *ARG1*, *ARG2* and *NOS2*; of the neuropeptides *VIP* and *TAC*, and their respective receptors *VIP-R1*, and *TAC-R1*. To compare the expression of these genes with the presence or absence of *H. pylori* bacteria. **MATERIAL AND METHODS:** were evaluated 126 patients with symptoms of the upper digestive tract and with a clinical indication of Digestive High Endoscopy (UDE). Before the endoscopy examination a detailed clinical questionnaire was performed and during the examination was performed multiple biopsies of the esophagus, gastric body and antrum and rapid urease test. Fragments of the mucosa of the body and the gastric antrum were collected for anatomopathological examination and for analysis of the expression of enzymes, cytokines and transcription factors by real-time PCR, qPCR. **RESULTS:** no clinical data were found that could be related to the presence of *H. pylori* infection in the stomach. Endoscopic findings that have relevance to the presence of bacteria was gastritis in both antrum and in the gastric corpus ( $p < 0.05$ ). Patients who used Proton Pump Inhibitors (PPIs) showed a decrease in the positivity of the bacteria in the antrum and in the gastric body ( $p < 0.05$ ) through the APE. The presence of gastritis in the gastric body or gastric antrum was significant with the positivity of the bacterium ( $p < 0,05$ ).

The expression of the *ARG1* gene was significantly higher in the group of patients with chronic gastritis with no activity when compared to the control group (Kruskal Wallis;  $p = 0.02$ ). The gene expression of *TGF  $\beta$*  gene and its transcription factor *FOXP3* were significantly higher in the group of chronic no-active gastritis patients when compared to the control group. When comparing the expression of *IFN  $\gamma$* , *IL-17*, *IL-10* and *TGF  $\beta$*  genes and the *T-bet* and *ROR  $\gamma \tau$*  transcription factors, with the presence or absence of *H. pylori*, there was no significant difference. However, *FOXP3* expression was significantly lower in *H. pylori* positive patients when compared to *H. pylori* negative patients (Mann-Whitney,  $p=0.01$ ). **CONCLUSIONS:** *H. pylori* infection showed no clinical factor predictive of their presence. In the UDE, the presence of gastritis in the antrum was highlighted as a probable infection of the bacterium. The use of PPIs should be discontinued for at least two weeks prior to UDE to avoid false negatives of the presence of *H. pylori* in the stomach. PAD was necessary to classify the different types of gastritis and/or histopathological changes caused by the bacteria. *ARG-1* and *Treg* profile appear to be modulating the inflammatory process, protecting these patients from tissue lesions with chronic gastritis without activity. Furthermore, we suggest that *IL-33* may be a crucial mediator of the immune response to infection after gastric mucosal damage.

Key words: *Helicobacter pylori*, gastritis, *Arginase-1*, *TGF- $\beta$* , *FOXP3*, *Treg*, *IL-33*.

## *Lista de Figuras*

---



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>H. pylori</i> .....	29
Figura 2 - Metodologia utilizada .....	48
Figura 3 – Esôfago normal .....	50
Figura 4 - Esofagite erosiva grau B .....	51
Figura 5 - Estômago normal .....	52
Figura 6 - Gastrite erosiva antral .....	53
Figura 7 - Gastrite enantematosa de fundo gástrico .....	53
Figura 8 - Gastrite nodular.....	54
Figura 9 - Escala analógica visual proposta pela reunião de Houston de 1994, para.....	56
Figura 10 - Gastrite crônica sem atividade inflamatória: infiltrado .....	56
Figura 11 - Gastrite crônica intensa; presença de folículo linfóide (HE - 40x).....	57
Figura 12 - Foco com atividade inflamatória: neutrófilos permeando o epitélio foveolar (HE – 400x).....	57
Figura 13 - Gastrite com atrofia glandular discreta (grau I ou focal).....	58
Figura 14 - Resultado do teste da urease .....	59
Figura 15 – Kit teste da urease – laboratório RNA .....	60
Figura 16 - Numerosos bacilos compatíveis com <i>Helicobacter pylori</i> no.....	61
Figura 17 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para ARG-1 presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis; $p = 0,02$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. * indica um valor $p$ significativo.....	84
Figura 18 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para o ARG-1 presente em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ) A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%..	84

Figura 19 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>ARG-2</i> presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.....	85
Figura 20 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para o <i>ARG-2</i> presente em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ) A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90% ..	85
Figura 21 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>iNOS</i> presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.....	86
Figura 22 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para a <i>iNOS</i> presente em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> positivo (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.....	86
Figura 23 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>VIP</i> e <i>VIP-R1</i> presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ) .....	87
Figura 24 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>VIP</i> e <i>VIP-R1</i> presentes em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,05$ );.....	87
Figura 25- Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>TAC</i> e <i>TAC-R1</i> presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ) .....	88
Figura 26 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>TAC</i> e <i>TAC-R1</i> presentes em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.....	88

Figura 27 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IFN-γ</i> e <i>T-bet</i> presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis; $p = 0,02$ ); A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.....	89
Figura 28 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IFN-γ</i> e <i>T-bet</i> presentes em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> positivo (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.....	89
Figura 29 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IL-17</i> e <i>RORγt</i> , presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.....	90
Figura 30 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IL-17</i> e <i>RORγt</i> , presente em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.....	90
Figura 31 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IL-10</i> presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.....	91
Figura 32 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para a <i>IL-10</i> presente em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> positivo (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.....	91
Figura 33 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>FOXP3</i> e <i>TGF-β</i> presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis; $p = 0,02$ ; $p = 0,03$ , respectivamente). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%. * indica um valor p significativo. ....	92

Figura 34 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>TGF-β</i> e <i>FOXP3</i> presentes em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,01$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%. * indica um valor p significativo.....	92
Figura 35 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IL-6</i> presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ).....	93
Figura 36 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IL-6</i> presente em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ).....	93
Figura 37 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IL-22</i> e <i>IL-23</i> presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ). .....	94
Figura 38 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para <i>IL-22</i> e <i>IL-23</i> presentes em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p > 0,05$ ).....	94
Figura 39 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para a <i>IL-33</i> presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis; $p > 0,05$ ) .....	95
Figura 40 - Número de cópias relativas de <i>mRNA</i> para a <i>IL-33</i> presente em biópsias de pacientes com ou sem <i>H. pylori</i> (Mann-Whitney; $p = 0,03$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. * indica um valor “p” significativo. ....	95

## *Lista de Tabelas*

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de dados clínicos com a presença do <i>H. pylori</i> pesquisado .....	70
Tabela 2 – Esofagite de refluxo (EDA) pela classificação de Los Angeles (LA) e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	74
Tabela 3 – Corpo gástrico normal e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	74
Tabela 4 – Gastrite de corpo gástrico e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	75
Tabela 5 – Antro gástrico normal e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	76
Tabela 6 – Classificação da gastrite de antro gástrico e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP.....	76
Tabela 7 - Comparação de positividade do teste da urease realizado no antro gástrico.....	77
Tabela 8 – Corpo gástrico normal (EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo.....	78
Tabela 9 - Gastrite ativa no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico pesquisado (EAP) .....	79
Tabela 10 - Gastrite crônica no corpo gástrico (Classificação no EAP) e a densidade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico pesquisado (EAP).....	80
Tabela 11 - Antro gástrico normal (EAP) e positividade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	81
Tabela 12 - Gastrite ativa no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	82
Tabela 13 - Gastrite crônica no antro gástrico (Classificação no EAP) e densidade do <i>H. pylori</i> no antro gástrico pesquisado através do EAP .....	83

## *Lista de Abreviaturas e Siglas*

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: graus Celsius

*cagA*: citotoxina associada ao gene *cagA* (*citotoxin antigen associated*)

CD: Cluster of Differentiation

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DRGE: Doença do Refluxo Gastroesofágico

ER: Esofagite de Refluxo

*et al*: E colaboradores

*FOXP3*: forkhead box P3 gene

*H. pylori*: *Helicobacter pylori*

IBP: Inibidor de bomba de prótons

*IFN-γ*: Interferon Gama

IL: Interleucina

Ile: Isoleucina

*iNOS*: Óxido nítrico sintase endotelial (*inducible nitric oxide synthase*)

kDa: Quilodalton

MALT: Tecidos Linfoides Associados às Mucosas (*Mucosa-associated lymphoid tissue*)

MG: Minas Gerais

mg: Miligrama

NO: Óxido Nítrico



*NOS*: Óxido nítrico Sintase endotelial (*nitric oxide synthase*)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial de Hidrogênio iônico

RNA: Ácido Ribonucleico

*ROR $\gamma$ t*: Receptor Nuclear Gama t

SNP: Polimorfismo de um único nucleotídeo

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

TAC: Neuropeptídeo TAC (*tachykinin*)

*TAC-R1*: Receptor do TAC

*T-bet*: fator de transcrição T-bet

*TGF- $\beta$* : Fator de Transformação do Crescimento Beta

Treg: Células T Reguladoras

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

VIP: Peptídeo Vasoativo Intestinal

*VIP-R1*: Receptor R1 do VIP

## *Sumário*

---

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1 <i>H. pylori</i> (aspectos gerais) .....	28
1.2 <i>H. pylori</i> e afecções no trato gastrointestinal superior.....	30
1.3 Aspectos imunológicos do <i>H. pylori</i> em afecções no trato gastrointestinal superior. ....	32
2 HIPÓTESE .....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos .....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.2 Distribuição dos pacientes .....	47
4.3 Critérios de exclusão do estudo .....	49
4.4 Metodologia do Exame de Endoscopia Digestiva Alta .....	49
4.5 Metodologia do Exame Anatomopatológico .....	55
4.6 Diagnóstico da infecção pelo <i>H. pylori</i> .....	58
4.6.1 Teste rápido da urease .....	59
4.6.2 Pesquisa de <i>H. pylori</i> no exame anatomopatológico.....	61
4.6.3 Extração do DNA e Amplificação do gene 16S <i>Rrna</i> .....	62
4.6.3.1 Extração do DNA do <i>H. pylori</i> .....	62
4.6.3.2 Amplificação do gene 16S <i>rRNA</i> para pesquisa do <i>H. pylori</i> .....	63
4.7.1 Extração de RNA .....	63
4.7.2 Confecção de cDNA.....	64
4.7.3 Reações de PCR em tempo real .....	64
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
6 RESULTADOS .....	69
6.1 Dados clínicos da amostra (N=126).....	69
6.2 Dados clínicos da amostra em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126). ....	69

6.3 Resultados da EDA da amostra em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no antro e corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126). .....	73
6.4 Resultados no EAP em relação à positividade do <i>H. pylori</i> antro e/ou corpo gástrico (N=126).....	77
6.4.1 Esôfago (EAP).....	77
6.4.3 Antro gástrico (EAP).....	80
6.5 Resposta imune da amostra em relação à positividade do <i>H. pylori</i> no corpo gástrico (N=126).....	83
7 DISCUSSÃO .....	97
8 CONCLUSÕES .....	104
9 REFERÊNCIAS .....	106
10. ANEXOS .....	116
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	116
Autorização .....	118
Questionário Médico para Pesquisa Clínica .....	119
Exame Anatomopatológico.....	122
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....	124

## *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, B. J.; 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 ultraestruturais e de análise da sequência de ácidos nucleicos, a bactéria passou a receber a denominação de *Helicobacter* (forma helicoidal), diferenciando do gênero anteriormente enquadrado como *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).

Figura 1 – *H. pylori*



Fonte: World Health Organisation (WHO)

*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, B. J. et al., 1990).

*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) e gástrica-oral (NGUYEN, T. N.; 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, R. 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 encontrado em 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%) e 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 e nem manifestação clínica (MCCOLL, 2010; VINAGRE et al., 2018).

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 clorídrico pelo estômago, daí se o paciente tem baixa pressão do esfíncter inferior do esôfago ou falha dos mecanismos de *clearance* do esôfago, que predispõem a um maior risco de Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE), sem dúvida, também afetam os resultados. Desta forma, pode-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.**

*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.

Como *H. pylori* raramente invade a mucosa gástrica, a resposta do hospedeiro é desencadeada inicialmente pela adesão da bactéria às células epiteliais da mucosa gástrica, causando inflamação com recrutamento inicialmente de neutrófilos, seguidos por linfócitos T e B, plasmócitos e macrófagos (SUERBAUM; MICHETTI, 2002)

Durante respostas imunes específicas, surgem diferentes subgrupos de células T. Essas células participam da proteção da mucosa e ajudam a distinguir bactérias patogênicas de comensais. As células T helper imaturas (Th) 0 que expressam CD4 podem se diferenciar em dois subtipos funcionais: células Th1, secretoras de interleucina-2 e interferon-gama (IFN-gama) e células Th2, secretando interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10). Enquanto as células Th2 estimulam as células B em resposta aos patógenos extracelulares, as células Th1 são induzidas principalmente em resposta aos patógenos intracelulares. Como *H. pylori* não é invasivo e induz uma forte resposta humoral, inicia-se a resposta de células Th2 (SUERBAUM; MICHETTI, 2002). Paradoxalmente, as células T da mucosa gástrica específicas para *H. pylori* geralmente apresentam um fenótipo Th1 (SUERBAUM; MICHETTI, 2002; VINAGRE et al., 2018) e os anticorpos produzidos pela resposta Th2 não conferem proteção nem previnem nova infecção (VINAGRE et al., 2018).

Embora seja conhecido que a infecção por *H. pylori* desencadeia resposta predominantemente do tipo Th1 (SUERBAUM; MICHETTI, 2002; VINAGRE et al., 2018), o papel das células Th1 na infecção por *H. pylori* ainda não está completamente compreendido (BAGHERI; SALIMZADEH; SHIRZAD, 2018). Sabe-se que os subconjuntos de células T auxiliares (Th) e as suas citocinas, especialmente IFN- $\gamma$ , contribuem para a resposta antibacteriana, mas, ao mesmo tempo, sustentam respostas inflamatórias crônicas no local da infecção (BAGHERI et al., 2018) com produção de maiores níveis de IFN-  $\gamma$  (BHUIYAN et al., 2014; VINAGRE et al., 2018) e menores níveis de IL-10 em pacientes com úlcera gástrica e câncer (VINAGRE et al., 2018).

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).

*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 imunes 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 $\beta$  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- $\gamma$  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- $\beta$  (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<sup>high</sup> (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003). Células Tregs surgem no timo e são encontradas no sangue periférico e em órgãos linfóides secundários (TAAMS et al., 2002). Células T reguladoras naturais expressam CD25 constitutivamente. Entretanto, a maioria das T ativadas expressa CD25 com afinidade baixa ou moderada para cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, marcador de ativação das células T. Somente 3% delas expressam CD25 com alta intensidade (CD25<sup>high</sup>) (WING et al., 2002).

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- $\gamma$  e IL-12 (VELDHOEN; STOCKINGER, 2006). A expressão de T-bet pode ser estimulada nas células T CD4<sup>+</sup> por sinais de IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ , 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- $\gamma$  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- $\beta$ , o TNF e o INF- $\gamma$  (BODGER et al., 2001).

O TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  regulada em parte ao nível da transcrição, e muitos estudos têm implicado os polimorfismos do TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> 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 $\gamma$ t. Tem sido demonstrado que a expressão ROR $\gamma$ t é ativada pela indução de células Th17 combinando com IL-6 e TGF- $\beta$ . ROR $\gamma$ t também provou ser necessária e suficiente para especificação da indução de Th17 (SANTORI et al., 2015).

Estudos vinculando o TGF- $\beta$ , IL-23 e IL-17 em patogêneses imunes previamente atribuídas a linhagem Th1 têm levado ao delineamento de uma nova célula T CD4<sup>+</sup> 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 esofagiana e gástrica, concluiu-se que pacientes com IL-1 $\beta$  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 et al., 2010).

A IL-1 $\beta$  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 $\beta$ -31 e IL-1 $\beta$ -511 estão associados com um aumento na produção de IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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).

A família de citocinas IL-17 realiza numerosas funções de regulação imunológica relacionadas à resposta pró-inflamatória (KABIR, 2011). Já foi demonstrado que as células T podem produzir altos níveis tanto de IL-17 em resposta a *H. pylori* desde tenra idade e que a IL-1 $\beta$  tem papel crucial na promoção de respostas Th17 (BHUIYAN et al., 2014). A IL-17 induz a produção de peptídeos antimicrobianos (beta-defensina 2 e proteínas S100), citocinas (IL-6, estimulação de colônias de granulócitos), fator (G-CSF), fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL-5, CXCL-8 (IL-8), CXCL-10, CCL-2, CCL-20) e metaloproteinases de matriz (MMP1, MMP3 e MMP13). O aumento da produção de quimiocinas pode causar inflamação associada à infiltração de neutrófilos.

Sabe-se que após infecção bacteriana, o eixo IL-23 /IL17 aumenta o recrutamento de neutrófilos no local da infecção (KABIR, 2011).

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 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e aos agonistas de receptores Toll-like, como os LPS (HARRINGTON et al., 2005). Especificamente, a IL-17, induz expressão de muitos 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- $\alpha$ , 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, fazem com que a IL-17 atue 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).

Embora seja conhecido que a infecção por *H. pylori* desencadeia resposta predominantemente do tipo Th1 (SUERBAUM; MICHETTI, 2002; VINAGRE et al., 2018), o papel das células Th1 na infecção por *H. pylori* ainda não está completamente compreendido (BAGHERI et al., 2018). Sabe-se que os subconjuntos de células T auxiliares (Th) e as suas citocinas, especialmente IFN- $\gamma$ , contribuem para a resposta antibacteriana, mas, ao mesmo tempo, sustentam respostas inflamatórias crônicas no local da infecção (BAGHERI et al., 2018) com produção de maiores níveis de IFN- $\gamma$  (BHUIYAN et al., 2014) (VINAGRE et al., 2018) e menores níveis de IL-10 em pacientes com úlcera gástrica e câncer (SONG et al., 2018; VINAGRE et al., 2018).

A infecção por *H. pylori* foi recentemente reconhecida como o fator de risco mais importante para o câncer gástrico. Como uma citocina pleiotrópica, o fator de crescimento transformador (TGF)- $\beta$ , pertencente ao perfil Treg, regula vários processos biológicos, incluindo ciclo celular, proliferação, apoptose e metástase. Estudos recentes demonstraram o envolvimento da sinalização de TGF- $\beta$  na patogênese da infecção pelo *H. pylori* (LI; XIE; LU, 2015).

Entretanto, tem sido sugerido que a carcinogênese na inflamação crônica induzida pelo *H. pylori* é limitada pela produção de interleucina 33 (IL-33) em células epiteliais gástricas. O mecanismo molecular subjacente à produção de IL-33 em resposta à infecção por *H. pylori*, no entanto, permanece desconhecido (TRAN et al., 2018).

Além do perfil Th1 e Treg, o perfil Th 17 também é necessário para o controle da colonização pelo *H. pylori* no estômago. A IL-23 desempenha papel importante na expressão de citocinas de células Th17. A expressão de IL-23, que é induzida em células dendríticas e macrófagos após com cultura com *H. pylori*, também foi relatada como aumentada durante a infecção por *H. pylori* em humanos e modelos animais.

Outro mecanismo antimicrobiano importante é a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) que pode resultar em alta produção de NO, que é uma molécula efetora importante na

resposta imune inata ao patógenos devido à sua capacidade antimicrobiana. Sabe-se que o *H. pylori* induz a produção de iNOS e NO pelos macrófagos. Embora o NO possa matar a bactéria *in vitro*, o *H. pylori* sobrevive no estômago humano, provavelmente porque a quantidade de NO produzido na mucosa gástrica não seja suficiente para matar as bactérias, já que os níveis de L-Arg que ocorrem *in vivo* não permitem geração suficiente de NO pelo hospedeiro (CHATURVEDI et al., 2007).

Já foi demonstrado aumento dos níveis de IL-6 associado ao grau de inflamação desencadeada pelo *H. pylori* (SUGIMOTO et al., 2011), sendo que os macrófagos podem ser uma fonte importante de IL-6 na mucosa gástrica durante a infecção por essa bactéria. A indução na síntese de IL-6 pelo *H. pylori* é um processo multifatorial que requer a absorção e presumivelmente a degradação bacteriana (ODENBREIT et al., 2006).

A IL-22 é um membro da família de citocinas IL-10 podendo agir isoladamente ou sinergicamente com algumas citocinas incluindo o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . A IL-22 apresenta ação tanto anti como pró-inflamatória e age principalmente em células epiteliais e hepatócitos, exercendo função na ação antimicrobiana e na regeneração celular. Já foi demonstrado que pacientes com linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) e infecção pelo *H. pylori* tinham maior expressão de IL-22, sendo também mais propensos à resposta terapêutica (ROMERO-ADRIAN et al., 2010).

A mucosa gástrica conta também com efeitos gastroprotetores como a Substância P (SP) e o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) que são resultantes da hidrólise da neprilisina. A SP é um dos principais neuromediadores envolvidos na vasodilatação, angiogênese, inflamação e no processo de cura (ERIN et al., 2012). O peptídeo vasoativo intestinal (VIP) apresenta efeitos anti-inflamatórios, pois inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimula a geração de células Treg (PRASSE et al., 2010). Esses dois gastroprotetores geralmente estão aumentados nas inflamações gastrointestinais. No entanto, a infecção pelo *H. pylori* provoca redução no níveis de SP e VIP, predispondo a lesões celulares nas infecções por essa bactéria (ERIN et al., 2012).

Sendo assim, acreditamos que o eixo neuroimune também possa estar envolvido na patogênese das lesões provocadas pelo *H. pylori*.

*Hipótese*

---

## **2 HIPÓTESE**

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

## *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
- Identificar 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, nos fragmentos de estômago na região do corpo gástrico de pacientes com queixa digestiva alta, por qPCR, a expressão *mRNA* das citocinas *IFN- $\gamma$* , *IL-17*, *IL-10*, *TGF- $\beta$* , *IL-6*, *IL-22*, *IL-23*, *IL-33*; dos fatores de transcrição *T-bet*, *ROR $\gamma$  $\tau$*  e *FOXP3*; das enzimas *ARG1*, *ARG2* e *NOS2*; dos neuropeptídeos *VIP* e *TAC*, e seus respectivos receptores *VPAC1* ou *VIP-R1*, e *TAC-R1*. Comparar a expressão desses genes com a presença ou ausência da bactéria *H. pylori*.

## *Material e Métodos*

---

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

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 H<sub>2</sub>), antibióticos, e corticosteroides, foram orientados a suspender a medicação com pelo menos duas semanas de antecedência à realização do exame de EDA. Não foi levado em consideração o sexo, a idade, a cor, a profissão, a raça e o peso.

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).

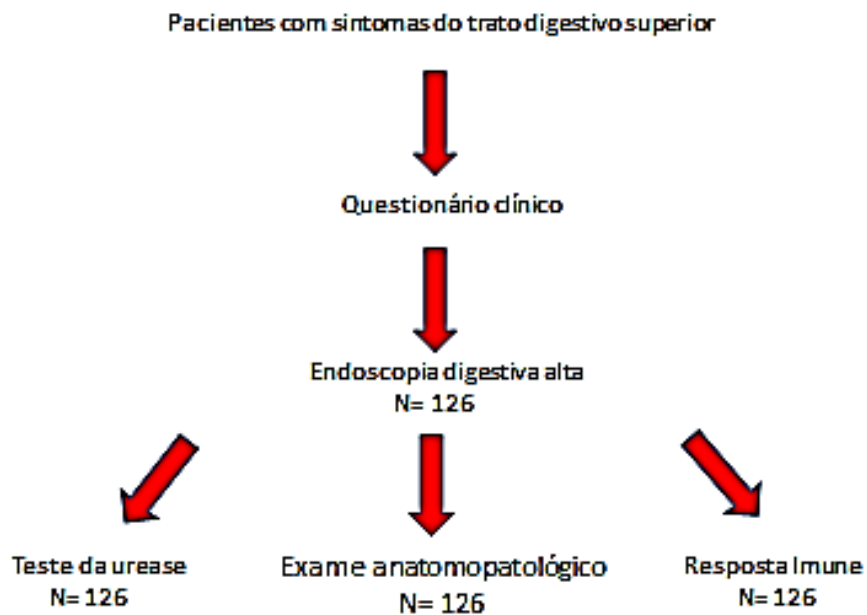
Fragmentos procedentes das biópsias do terço distal do esôfago, corpo e antro gástrico foram colocados separadamente em frascos com formol tamponado a 4% para a realização do exame anatomopatológico comum de rotina.

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.

Todos os 126 pacientes também foram submetidos a estudo imunológico do corpo gástrico. Para este estudo, no momento do exame de EDA, um fragmento do estômago foi colocado a fresco em um frasco contendo RNAlater® (Life Technologies Corporation®, USA) para conservação e resfriamento.

Figura 2- 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 do Exame de 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 3).

Figura 3 – Esôfago normal



Fonte: arquivo pessoal

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 4).

Figura 4 - Esofagite erosiva grau B



Fonte: arquivo pessoal

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 5).

Figura 5 - Estômago normal



Fonte: arquivo pessoal

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 6).

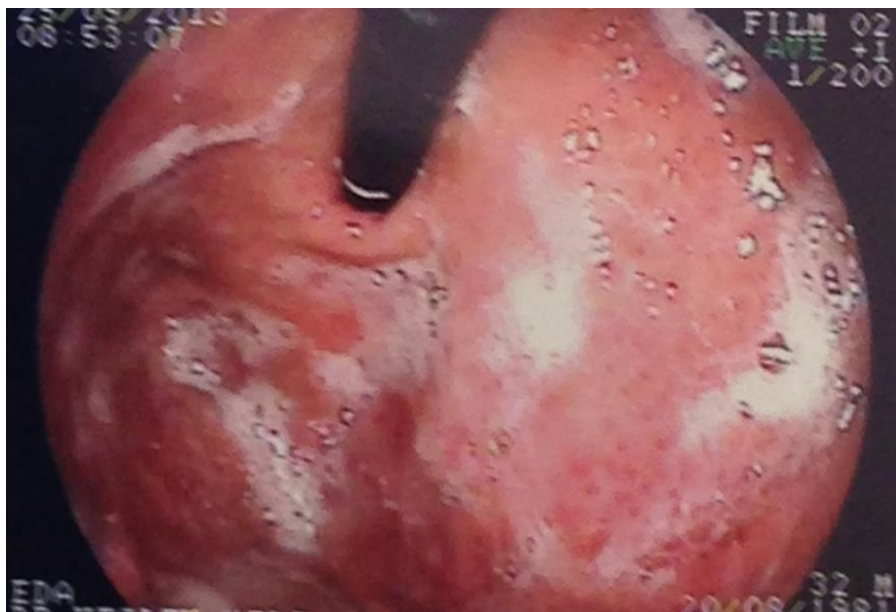
Figura 6 - Gastrite erosiva antral



Fonte: arquivo pessoal

Gastrite enantematosa foi caracterizada por vermelhidão da mucosa sem erosão, podendo ser focal ou comprometer áreas extensas da mucosa gástrica (Figura 7).

Figura 7 - Gastrite enantematosa de fundo gástrico

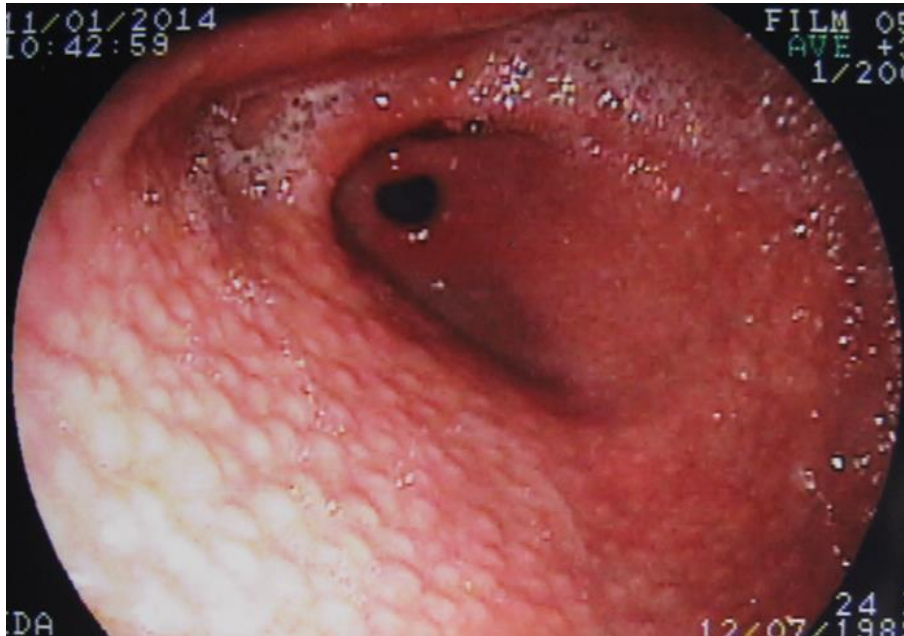


Fonte: arquivo pessoal



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 8).

Figura 8 - Gastrite nodular



Fonte: arquivo pessoal

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 ou para outros laboratórios participantes do trabalho para serem processados. Os médicos patologistas participantes sempre foram os mesmos.

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.

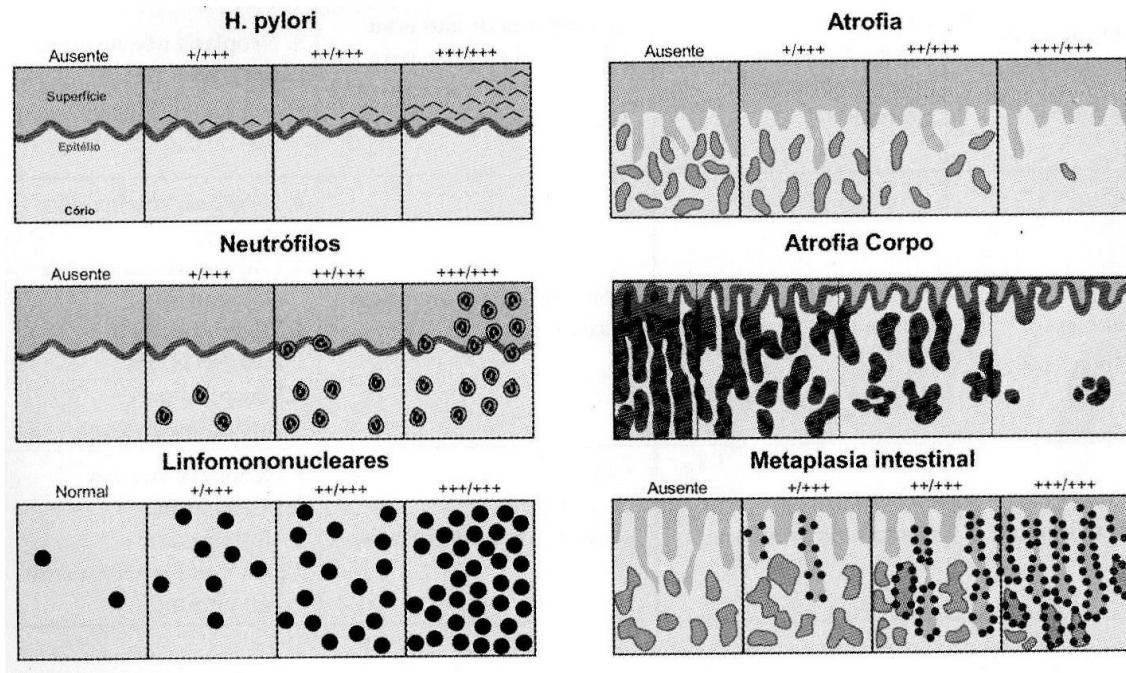
Os achados histopatológicos na mucosa gástrica foram analisados de acordo com os seguintes parâmetros já padronizados:

- 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 9 e descritos a seguir:

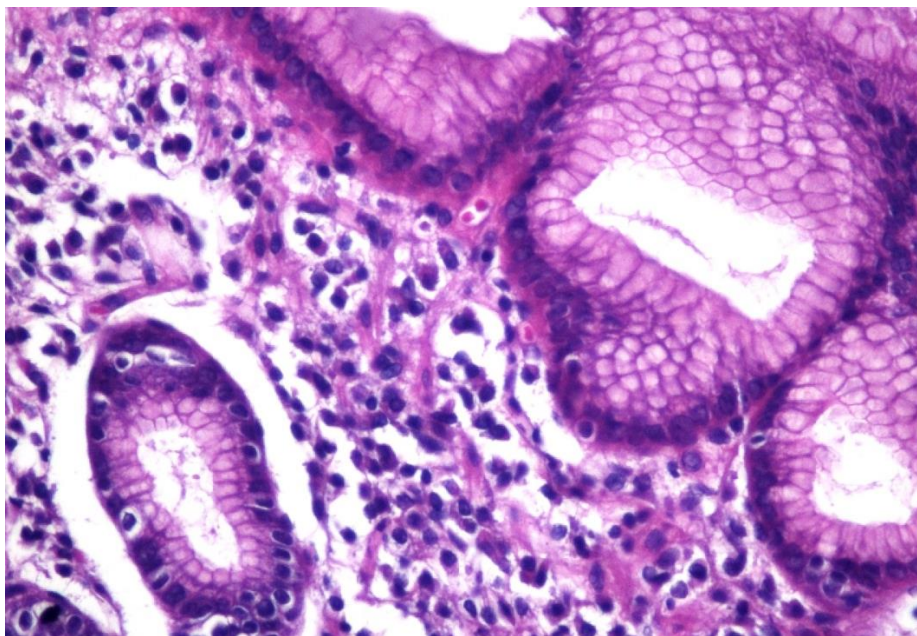
Figura 9 - Escala analógica visual proposta pela reunião de Houston de 1994, para classificação/graduação de gastrites (BACCHI et al., 2005)



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 10)

Figura 10 - Gastrite crônica sem atividade inflamatória: infiltrado linfoplasmocitário, sem polimorfonucleares (HE – 400x).

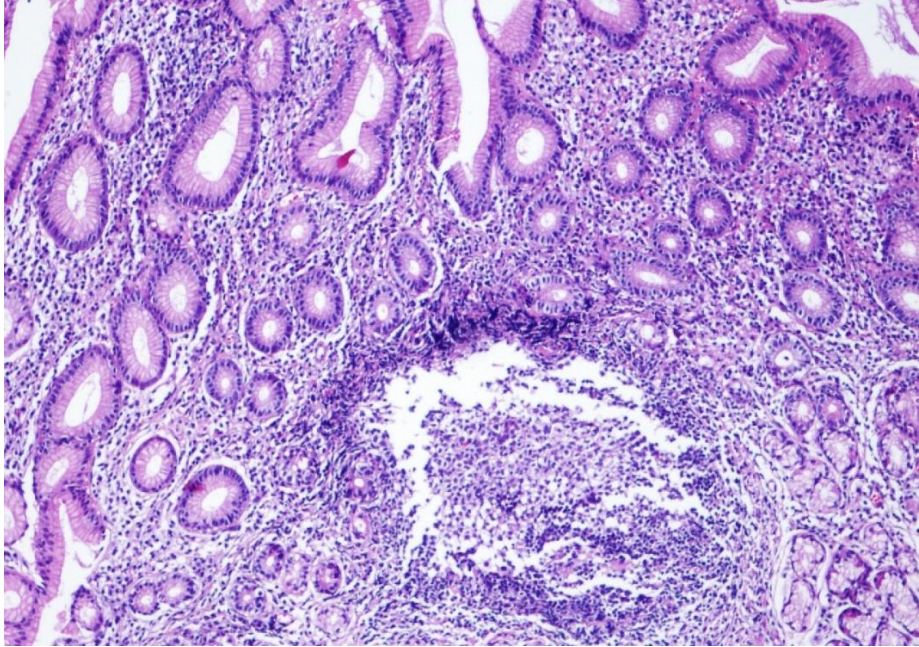


Fonte: Laboratório de Patologia UFTM



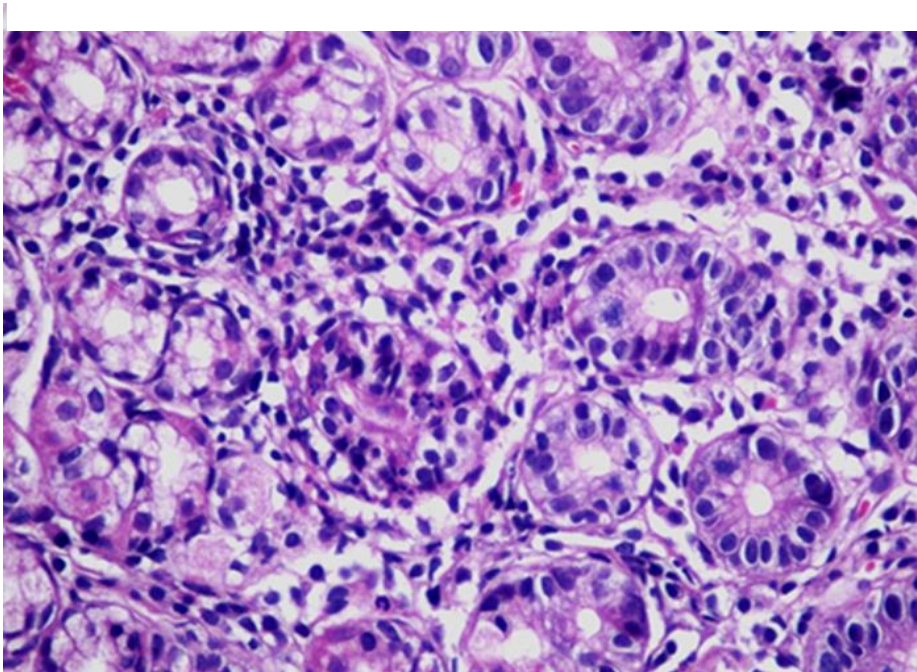
c) Intensidade da atividade inflamatória com base na presença de polimorfonucleares na lâmina própria e/ou no epitélio superficial ou glandular, graduada em leve (grau I), moderada (grau II) ou intensa (grau III) (Figura 11 e 12):

Figura 11 - Gastrite crônica intensa; presença de folículo linfóide (HE - 40x)



Fonte: Laboratório de Patologia UFTM

Figura 12 - Foco com atividade inflamatória: neutrófilos permeando o epitélio foveolar (HE - 400x)

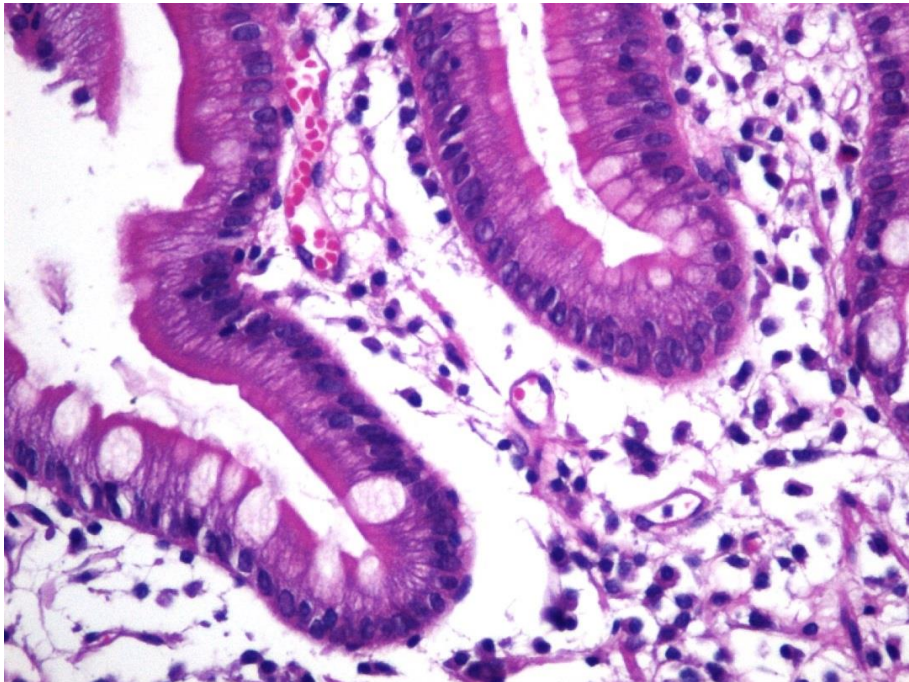


Fonte: Laboratório de Patologia - UFTM

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 13).

Figura 13 - Gastrite com atrofia glandular discreta (grau I ou focal) substituída por metaplasia intestinal completa (células caliciformes e enterócitos absorventes), sem displasia (HE – 400x).



Laboratório de Patologia UFTM

#### 4.6 Diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*

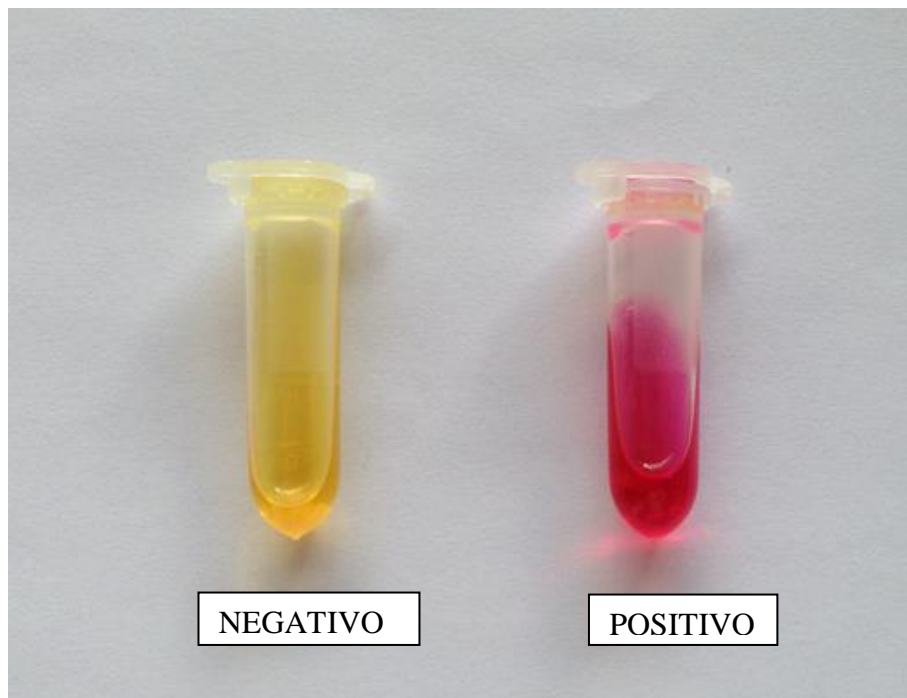
Foram utilizados diferentes métodos de diagnóstico e comprovação da presença do *H. pylori* pelo fato da existência de possíveis casos de falsos negativos devido a vários fatores como a escassez de bactérias e/ou uso prévio de bloqueadores H<sup>+</sup>.

#### 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 14).

Figura 14 - Resultado do teste da urease

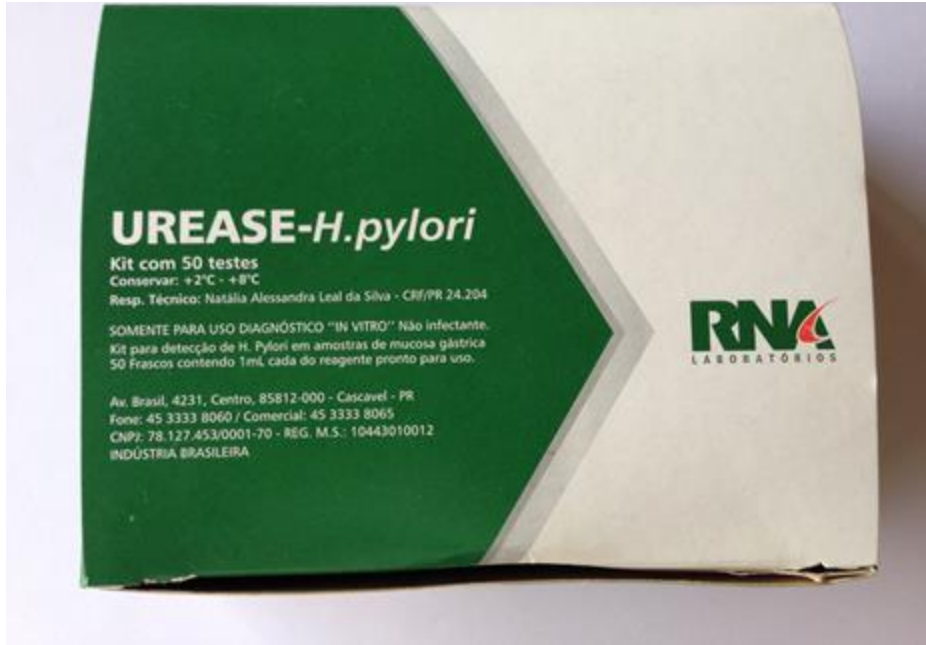


Fonte: arquivo pessoal



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 15).

Figura 15 – Kit teste da urease – laboratório RNA



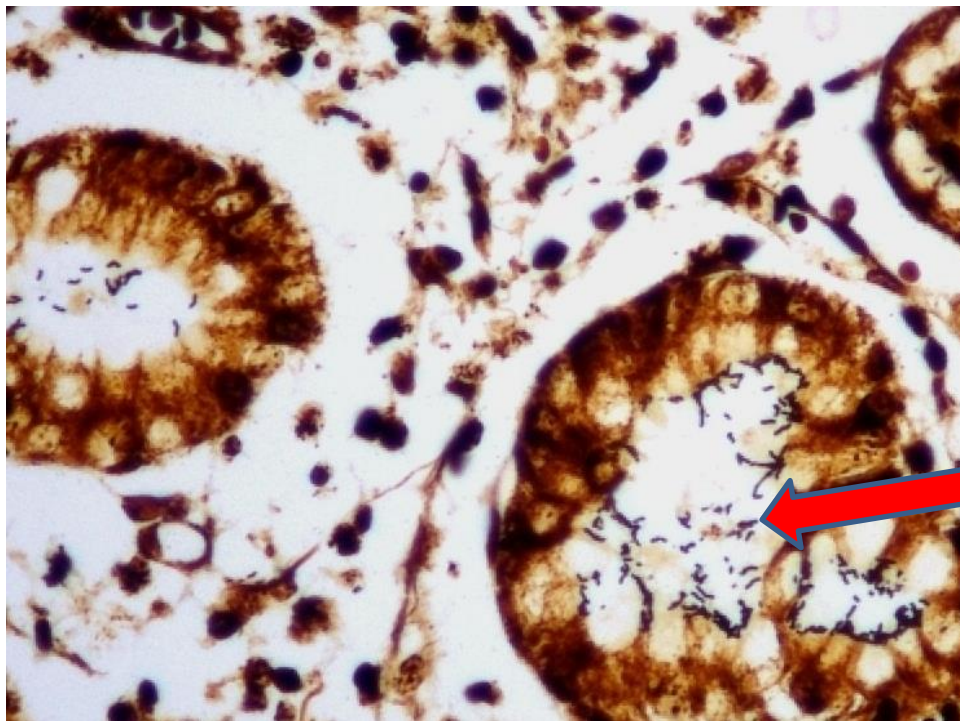
Fonte: arquivo pessoal

#### 4.6.2 Pesquisa de *H. pylori* no exame anatomopatológico

Os fragmentos fixados em formol a 4% 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 16).

Figura 16 - Numerosos bacilos compatíveis com *H. pylori* no interior de foveolas (Warthin-Sarry – 1000x). Seta na cor vermelha



Fonte: Laboratório de Patologia UFTM

### **4.6.3 Extração do DNA e Amplificação do gene 16S *Rrna***

#### **4.6.3.1 Extração do DNA do *H. pylori***

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de tecido colhida por biópsia da região do antro gástrico utilizando-se o kit “QIAamp DNA miniKit” (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 20µl de solução de proteinase K (20 mg/ml) em tubos contendo o fragmento de mucosa gástrica e homogeneizado em vórtex. A essa solução, foram acrescentados 200µl do tampão de lise (Buffer AL) fornecido pelo fabricante, homogeneizado em vórtex, centrifugado e incubado a 56°C por 10min. A seguir, 200µl de etanol foram adicionados e essa mistura colocada na coluna fornecida pelo kit QIAamp e centrifugada a 6000 giros por 1min. A coluna foi colocada em outro microtubo coletor de 2ml, e o filtrado do tubo anterior descartado. O material da coluna foi lavado duas vezes (250µl cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas com o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) fornecida pelo kit. Finalmente, o DNA foi eluído com 100µl de tampão AE fornecido pelo kit.



#### **4.6.3.2 Amplificação do gene 16S *rRNA* para pesquisa do *H. pylori***

Realizada por meio da extração do DNA com amplificação do gene 16S rRNA, por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos (RILEY et al., 1996). As amostras que apresentaram 364pb foram consideradas *H. pylori* positivas.

### **4.7 Metodologia da Expressão dos Genes *ARG1*, *ARG2*, *NOS2*, *VIP*, *VIP-R1*, *TAC*, *TAC-R1*, *IFN- $\gamma$* , *IL-17*, *IL-10*, *TGF- $\beta$* , *IL-6*, *IL-22*, *IL-23*, *IL-33*, *T-bet*, *ROR $\gamma$ r* e *FOXP3***

#### **4.7.1 Extração de RNA**

Um fragmento de mucosa do corpo gástrico que foi obtido durante o exame de endoscopia digestiva alta 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 350 $\mu$ l 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 200 $\mu$ l 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 600 $\mu$ l 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 200 $\mu$ l 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 30 $\mu$ l 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).

#### 4.7.2 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.

#### 4.7.3 Reações de PCR em tempo real

A expressão quantitativa de *mRNA* dos genes *ARG1*, *ARG2*, *NOS2*, *VIP*, *VIP-R1*, *TAC*, *TAC-R1*, *IFN-γ*, *IL-17*, *IL-10*, *TGF-β*, *IL-6*, *IL-22*, *IL-23*, *IL-33*, *T-bet*, *RORγt* e *FOXP3* foram analisadas por reações de PCR em tempo real, nas amostras de cDNA de fragmento do corpo gástrico. 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 6,5µl do mix SYBR Green, 0,5µl do primer sense e anti-sense, 2,5µl do cDNA e 5µl 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 Nº 2: Quantificação Relativa de Expressão Gênica - PN 4303859 - EUA).

*Análise Estatística*

---

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando os softwares Statview® (Abacus concept, EUA) e IBM SPSS Statistics® (IBM Corporation®) (Versão 23).

As variáveis contínuas foram submetidas a testes de Normalidade e variância (Kolmogorov-Smirnov).

A associação de cada variável com a presença da infecção do *H. pylori* e seus fatores de virulência foi verificada pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ )

Foram aplicados testes paramétricos para os níveis relativos de *mRNA*.

Para a análise da expressão Genes *ARG1*, *ARG2*, *NOS2*, *VIP*, *VIP-R1*, *TAC*, *TAC-R1*, *IFN- $\gamma$* , *IL-17*, *IL-10*, *TGF- $\beta$* , *IL-6*, *IL-22*, *IL-23*, *IL-33*, *T-bet*, *ROR $\gamma\tau$*  e *FOXP3* e os fatores de virulência foram utilizados os testes Mann-Whitney (T) e Kruskal-Wallis (H) seguidos pelo pós-teste de Dunn para comparação entre 3 ou mais grupos.

Os dados foram expressos em mediana com valores mínimo e máximo e percentis.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a rejeição da hipótese foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## *Resultados*

---

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados clínicos 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/m<sup>2</sup>. 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 Dados clínicos da amostra em relação à positividade do *H. pylori* no antro e corpo gástrico pesquisado através do EAP (N=126).

*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 1), não foi encontrada diferença significativa pelo teste do Qui-quadrado de Pearson, 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. ( $p > 0,05$ ) (teste do Qui-quadrado de Pearson) (Tabela 1).

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 1).

Não houve diferença estatística significativa (teste do Qui-quadrado de Pearson) 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 1 - 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



Todos os pacientes que estavam em uso de IBP foram orientados a suspender a medicação por pelo menos duas semanas antes da realização do exame de EDA e estes mesmos pacientes quando comparados em relação à presença do *H. pylori* no corpo gástrico, mostraram uma diminuição significativa na positividade para o *H. pylori* nesta região do estômago (teste do Qui-quadrado de Pearson). Dos 51 (40,5%) pacientes que haviam usado 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 4).

Tabela 4 –Usaram IBP e positividade do *H. pylori* no corpo gástrico

		<i>H. pylori</i> presente no corpo gástrico		Total
		Ausente	Presente	
Usaram 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

Como já citado, todos os pacientes que usavam IBP foram orientados a suspender a medicação por pelo menos duas semanas antes da realização do exame de EDA e estes mesmos pacientes quando comparados em relação à presença do *H. pylori* no antro gástrico, o fato de terem usado IBP mostrou uma diminuição significativa na positividade para o *H. pylori* nesta região do estômago (teste do Qui-quadrado de Pearson). Dos 51 (40,5%) pacientes que haviam usado 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 5).

Tabela 5 – Usaram IBP e positividade do *H. pylori* no antro gástrico

		<i>H. pylori</i> (antro gástrico)		Total
		Ausente	Presente	
Usaram 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 Resultados da EDA da amostra em relação à positividade do *H. pylori* no antro e 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 (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p > 0,05$ ) 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, isto é, em 50 (39,7%) pacientes.

A ausência da esofagite de refluxo diagnosticada durante o exame de EDA apresentou diferença significativa (teste do Qui-quadrado de Pearson) 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 4).

Tabela 2 – 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 5 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 pelo teste do Qui-quadrado de Pearson ( $p<0.05$ ).

Tabela 3 – 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%) 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 pelo teste do Qui-quadrado de Pearson. ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6).

Tabela 4 – 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 7 mostra que os pacientes que apresentaram antro gástrico normal na EDA foram 50 (39,7%) e dentre eles, 40 (31,7%) pacientes não tiveram a positividade da bactéria no antro gástrico pelo EAP. Resultados estatisticamente significativos pelo teste do Qui-quadrado de Pearson ( $p < 0.05$ ).

Tabela 5 – 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 pelo teste do Qui-quadrado de Pearson (p<0,05) (Tabela 8).

Tabela 6 – 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

A Tabela 9 mostra que houve diferença estatística significativa (teste do Qui-quadrado de Pearson) entre os dados obtidos com o teste da urease no antro gástrico e 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 (teste do Qui-quadrado de Pearson) ( $p < 0,05$ ).

Tabela 7 - 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 Resultados no EAP em relação à positividade do *H. pylori* antro e/ou corpo gástrico (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 ( $p < 0,05$ ) (teste do Qui-quadrado de Pearson).

##### 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

pelo teste do Qui-quadrado de Pearson ( $p>0,05$ ), 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 pelo teste do Qui-quadrado de Pearson ( $p>0,05$ ).

#### 6.4.2 Corpo gástrico (EAP)

Na tabela 10 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 10, 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 pelo teste do Qui-quadrado de Pearson ( $p<0,05$ ).

Tabela 8 – 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 11, podemos observar que 29 (59,2%) 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 ( $p < 0,05$ ) (teste do Qui-quadrado de Pearson).

Tabela 9 - 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 12, 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 ( $p < 0,05$ ) (teste do Qui-quadrado de Pearson).

Tabela 10 - 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 pelo teste do Qui-quadrado de Pearson, 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) (teste do Qui-quadrado de Pearson) (Tabela 13).

Tabela 11 - 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 14).

Quarenta e seis (36,5%) pacientes tiveram gastrite ativa no antro gástrico e o tipo de atividade mais encontrada foi a com atividade discreta em 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) (teste do Qui-quadrado de Pearson).

Tabela 12 - 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 15).

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) (teste do Qui-quadrado de Pearson).

Tabela 13 - 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 Resposta imune da amostra em relação à positividade do *H. pylori* no corpo gástrico (N=126).

Foram avaliados fragmentos de biópsia do corpo gástrico e antro gástrico dos 126 pacientes incluídos inicialmente no presente estudo assim distribuídos:

- ✓ 44 pacientes com gastrite crônica em atividade no corpo gástrico,
- ✓ 20 pacientes com gastrite crônica sem atividade corpo gástrico,
- ✓ 32 pacientes sem gastrite no corpo gástrico, mas apresentavam algum processo inflamatório no antro
- ✓ 30 pacientes como grupo controle que não apresentavam nenhum tipo de processo inflamatório em nenhuma das regiões analisadas do estômago: antro e corpo.

**6.5.1 Análise da expressão gênica da *ARG1*, *ARG2*, *NOS2* realizada nos grupos de pacientes com gastrite crônica ativa, gastrite crônica sem atividade, sem gastrite e comparadas ao grupo controle e a pacientes com ou sem *H. pylori*. Figuras 17, 18, 19, 20, 21 e 22.**

Figura 17- Número de cópias relativas de *mRNA* para ARG-1 presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis;  $p = 0,02$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. \* indica um valor  $p$  significativo.

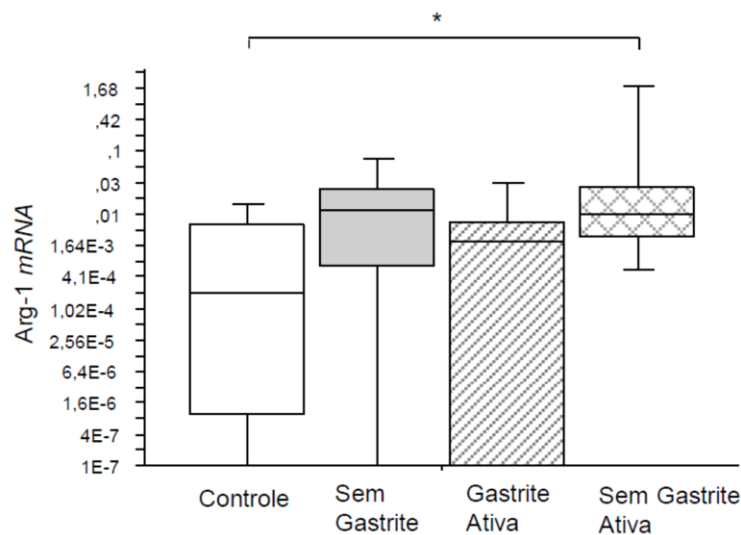


Figura 18 - Número de cópias relativas de *mRNA* para o ARG-1 presente em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ) A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.

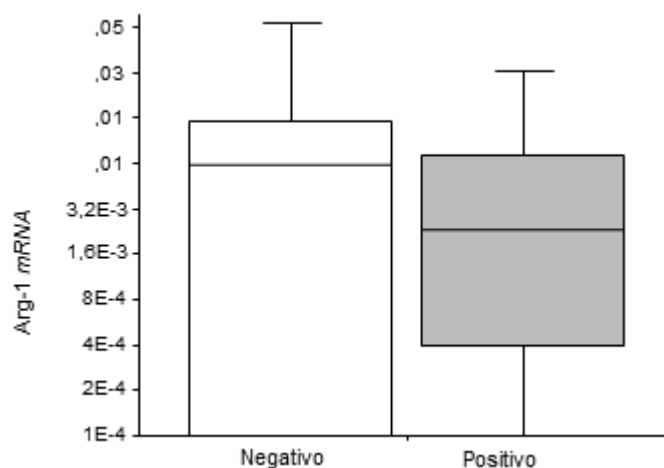


Figura 19 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *ARG-2* presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.

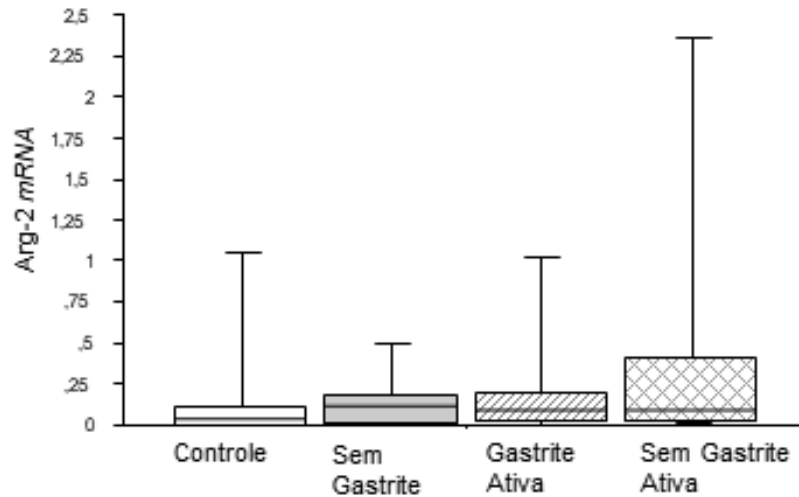


Figura 20 - Número de cópias relativas de *mRNA* para o *ARG-2* presente em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.

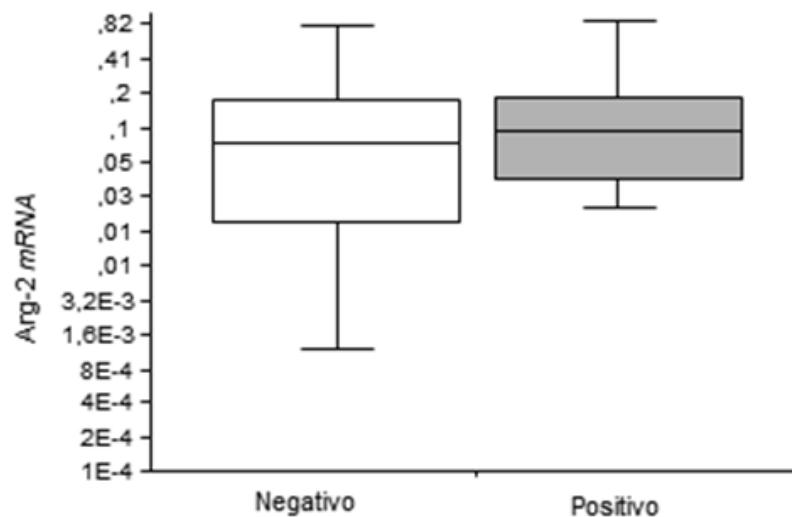


Figura 21 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *iNOS* presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.

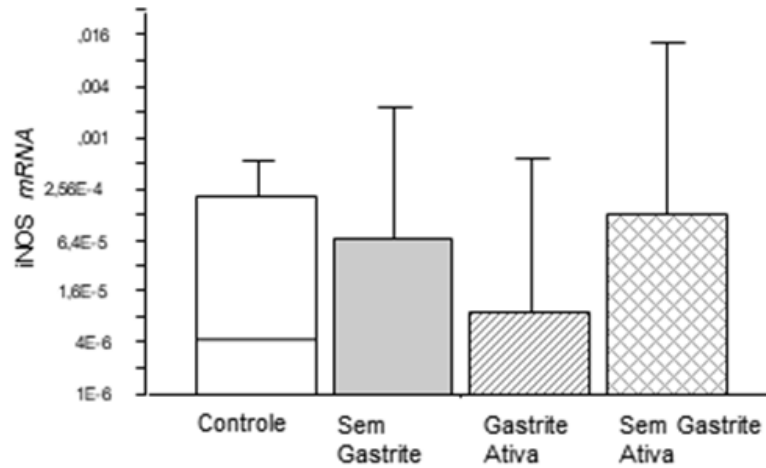
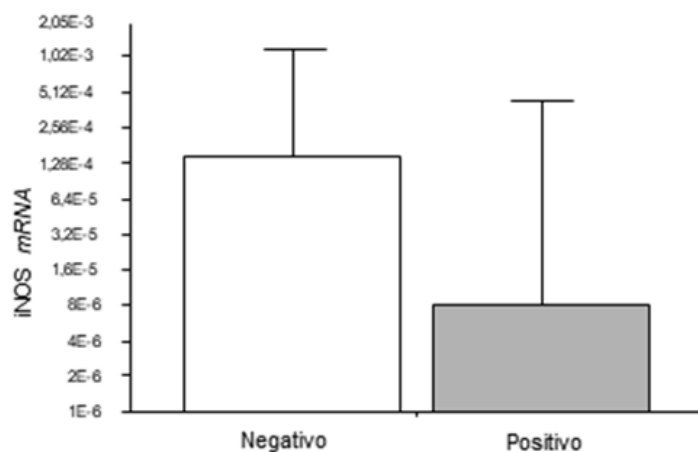


Figura 22 - Número de cópias relativas de *mRNA* para a *iNOS* presente em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%.





**6.5.2 Análise da expressão gênica do *VIP*, *VIP-R1*, *TAC*, *TAC-R1* realizada nos grupos de pacientes com gastrite crônica ativa, gastrite crônica sem atividade, sem gastrite e comparadas ao grupo controle e a pacientes com ou sem *H. pylori*. Figuras 23, 24, 25 e 26.**

Figura 23 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *VIP* e *VIP-R1* presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ )

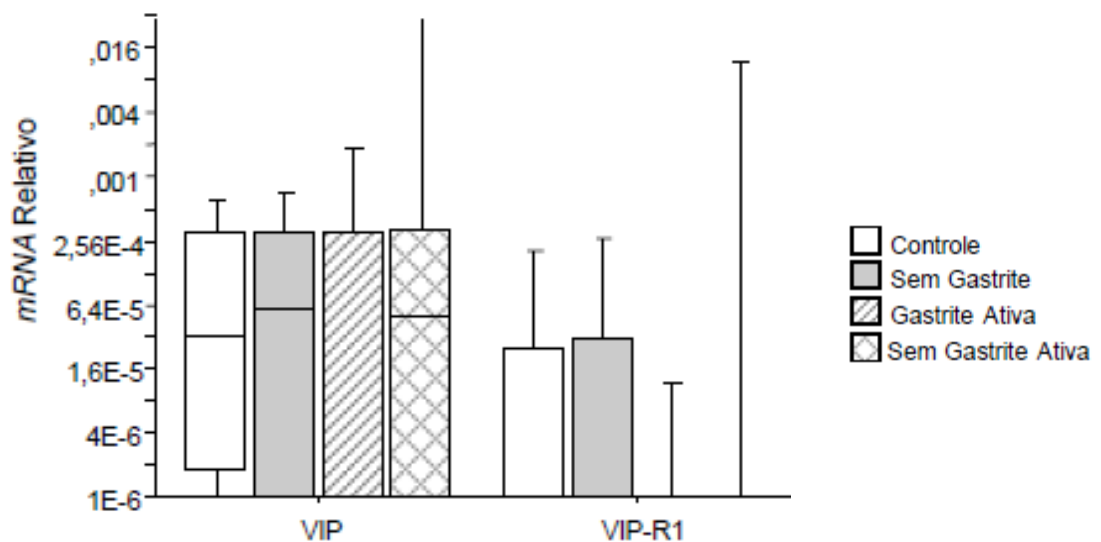


Figura 24 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *VIP* e *VIP-R1* presentes em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ );

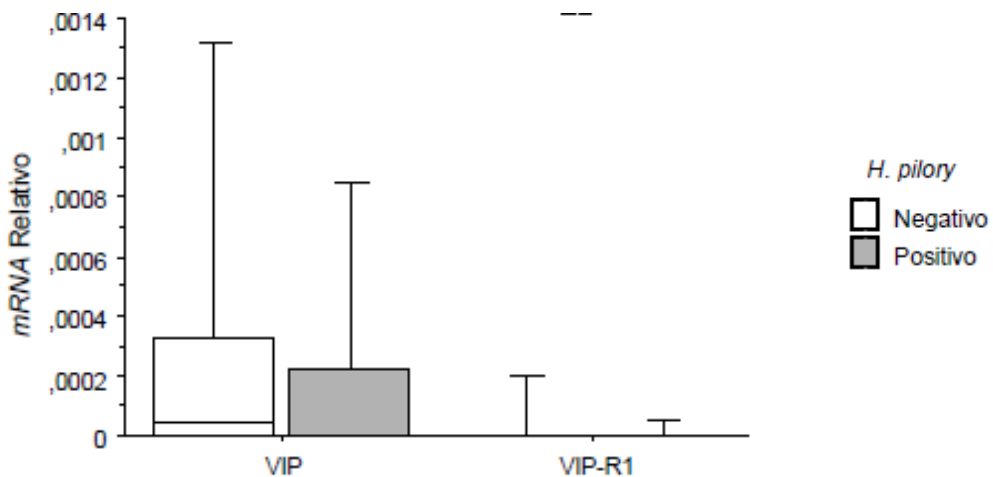


Figura 25- Número de cópias relativas de *mRNA* para *TAC* e *TAC-R1* presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ )

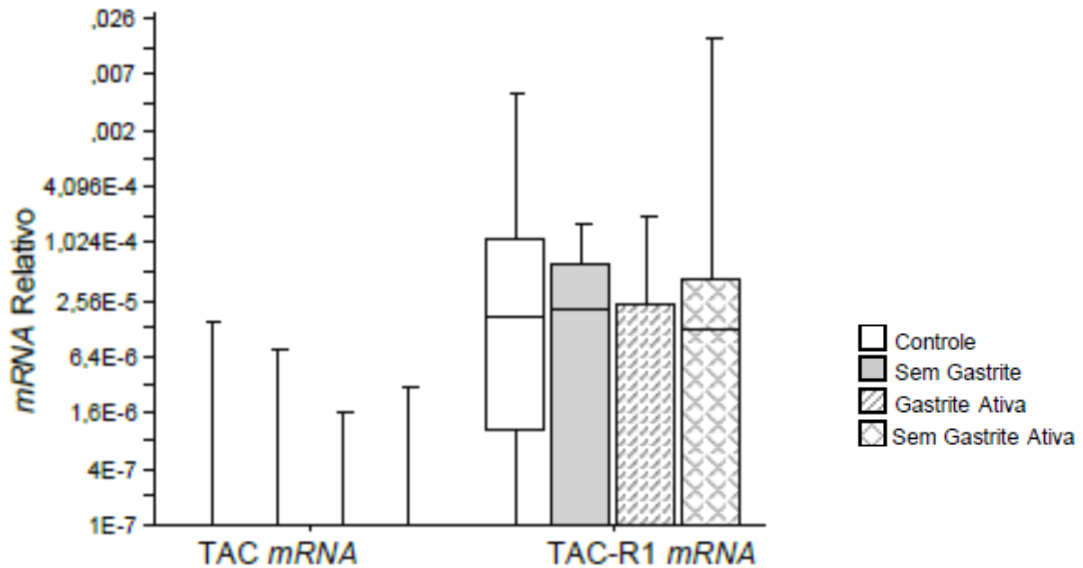
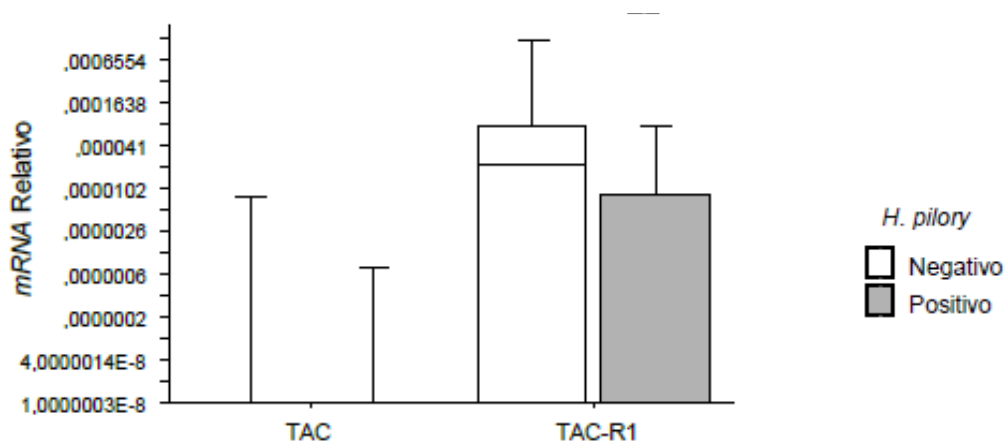


Figura 26 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *TAC* e *TAC-R1* presentes em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%



**6.5.3 Análise da expressão gênica do *IFN- $\gamma$* , *IL-17* e *IL-10* e os fatores de transcrição *T-bet* e *ROR $\gamma$ t* realizada nos grupos de pacientes com gastrite crônica ativa, gastrite crônica sem atividade, sem gastrite e comparadas ao grupo controle e a pacientes com ou sem *H. pylori*. Figuras 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 e 34.**

Figura 27 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IFN- $\gamma$*  e *T-bet* presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis;  $p = 0,02$ ); A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.

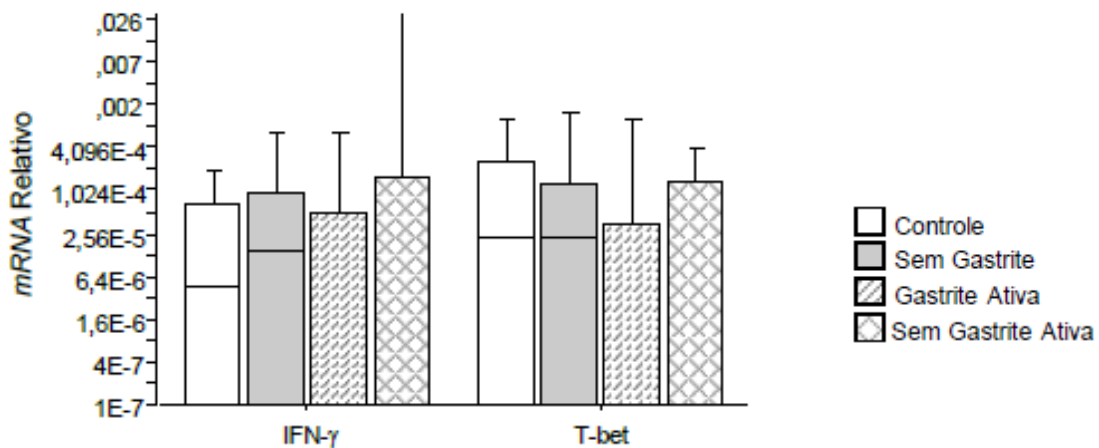


Figura 28 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IFN- $\gamma$*  e *T-bet* presentes em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.

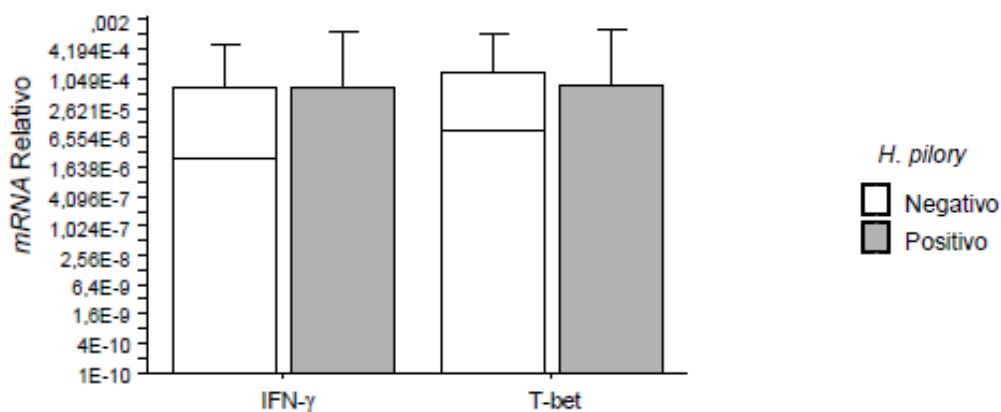


Figura 29 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IL-17* e *ROR-γt*, presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.

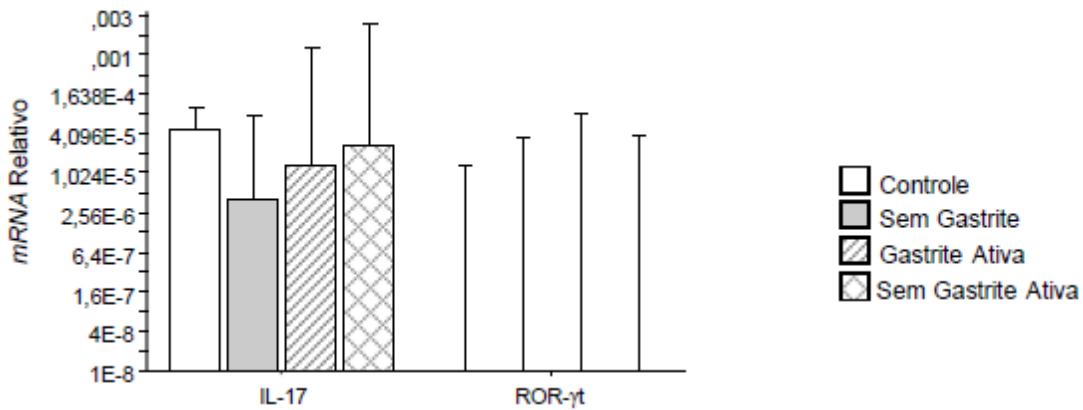


Figura 30 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IL-17* e *ROR-γt*, presente em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.

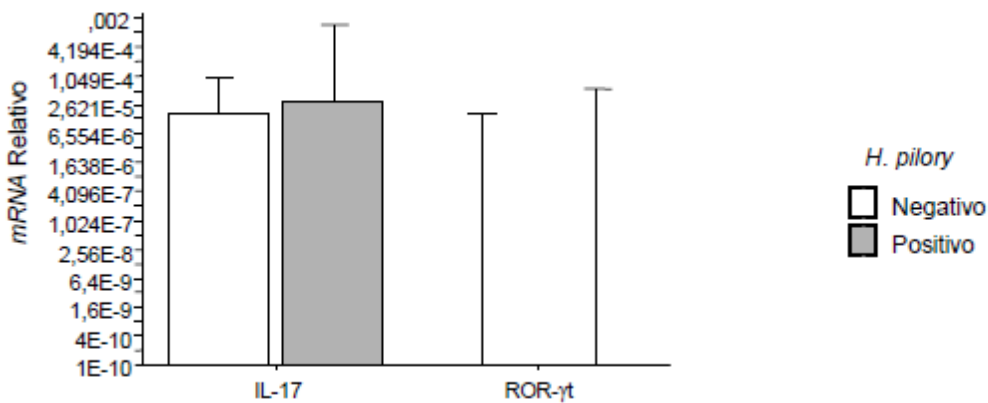


Figura 31 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IL-10* presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.

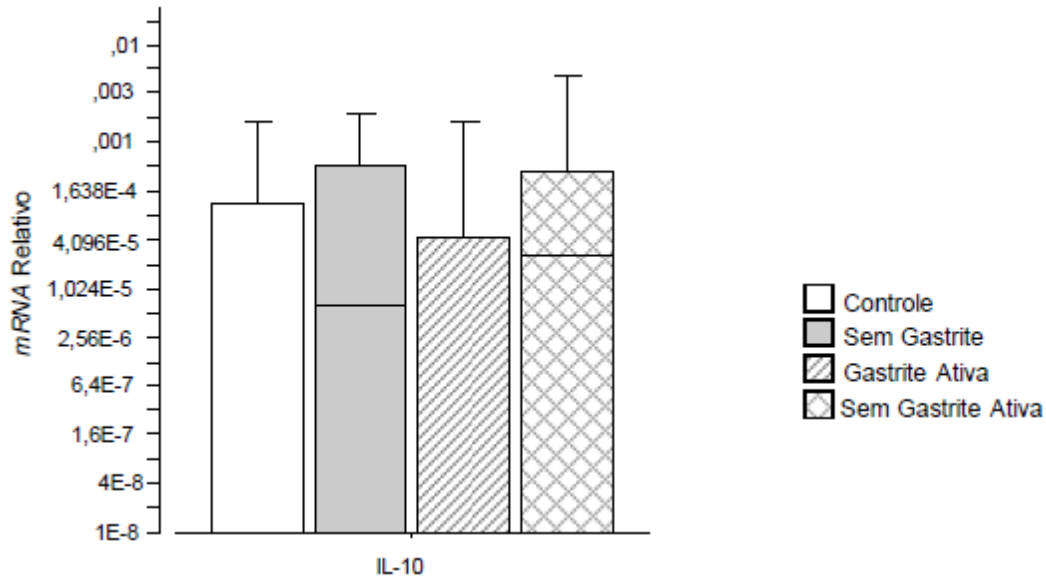


Figura 32 - Número de cópias relativas de *mRNA* para a *IL-10* presente em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%.

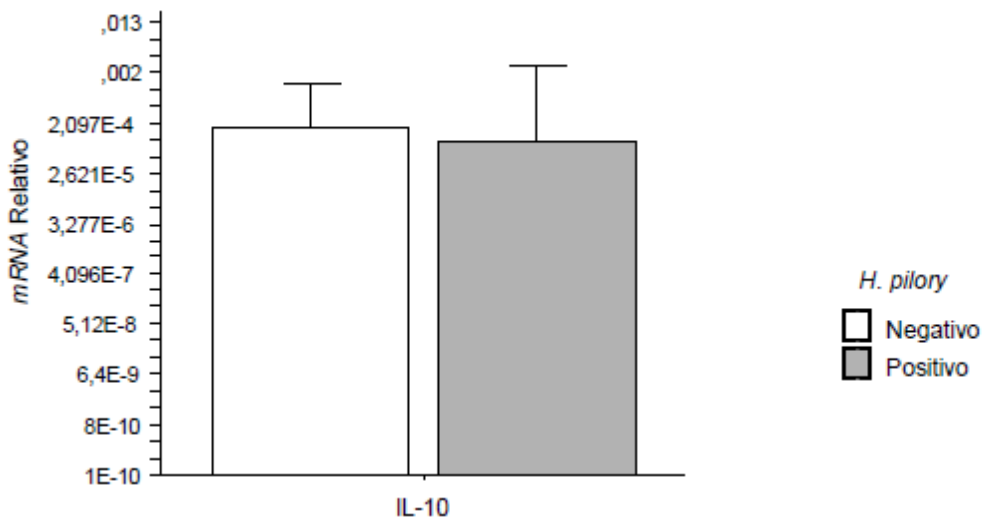


Figura 33 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *FOXP3* e *TGF-β* presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis;  $p = 0,02$ ;  $p = 0,03$ , respectivamente). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%. \* indica um valor  $p$  significativo.

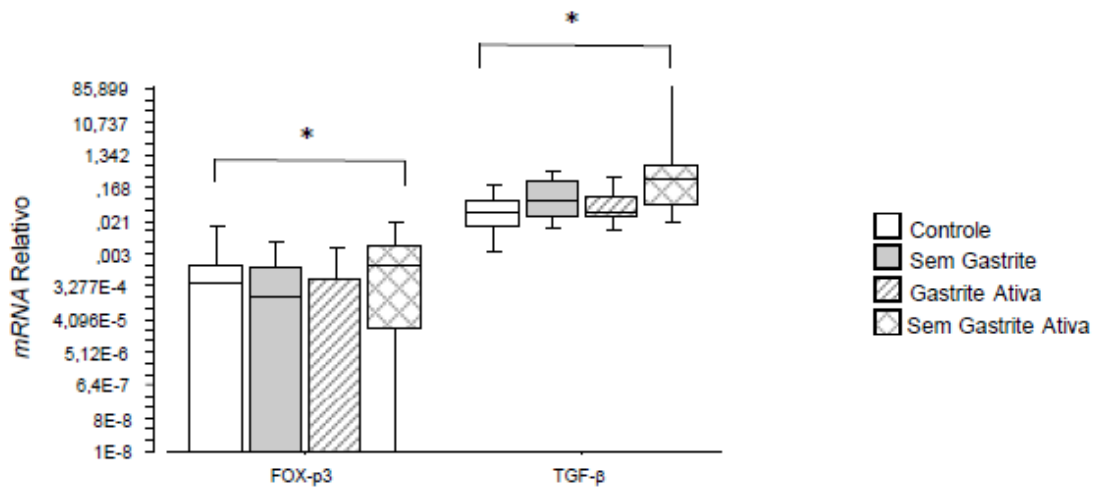
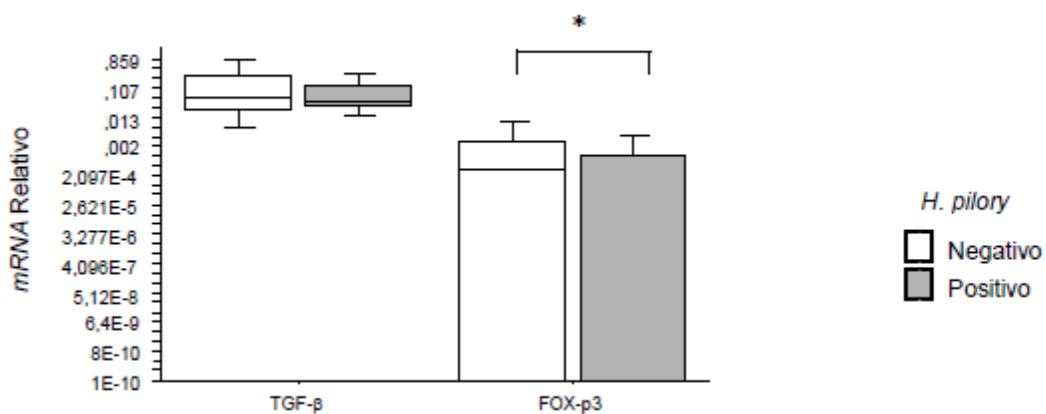


Figura 34 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *TGF-β* e *FOXP3* presentes em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,01$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barras de 25% a 75% e a linha vertical, o percentil de 10 a 90%. \* indica um valor  $p$  significativo.



**6.5.4 Análise da expressão gênica da *IL-6*, *IL-22*, *IL-23* e *IL-33-bet* realizada nos grupos de pacientes com gastrite crônica ativa, gastrite crônica sem atividade, sem gastrite e comparadas ao grupo controle e a pacientes com ou sem *H. pylori*. Figuras 35, 36, 37, 38, 39 e 40.**

Figura 35 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IL-6* presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro em comparação com a de pacientes no grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ )

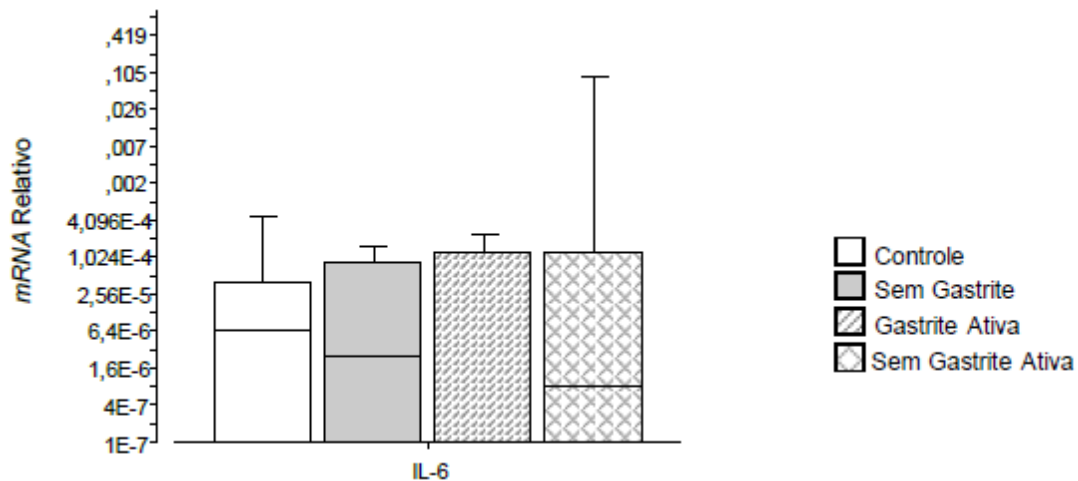


Figura 36 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IL-6* presente em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$ )

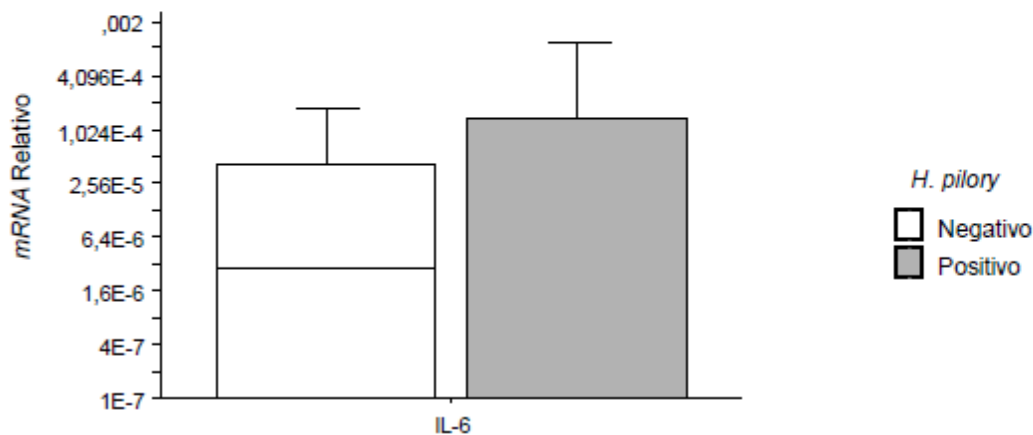


Figura 37 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IL-22* e *IL-23* presentes em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$  ).

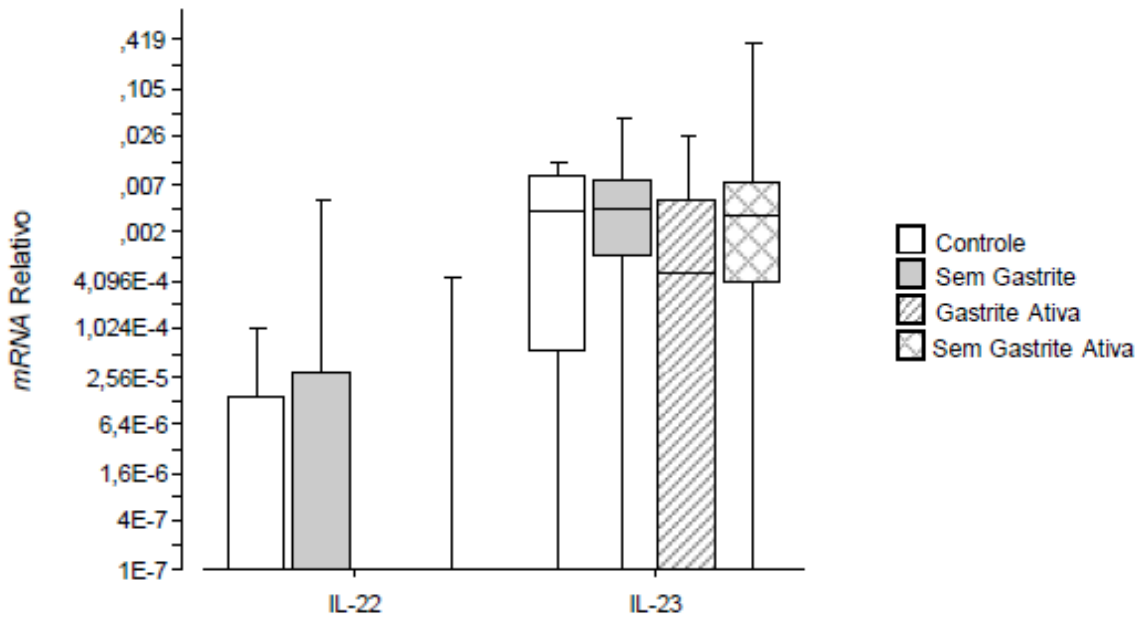


Figura 38 - Número de cópias relativas de *mRNA* para *IL-22* e *IL-23* presentes em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p > 0,05$  )

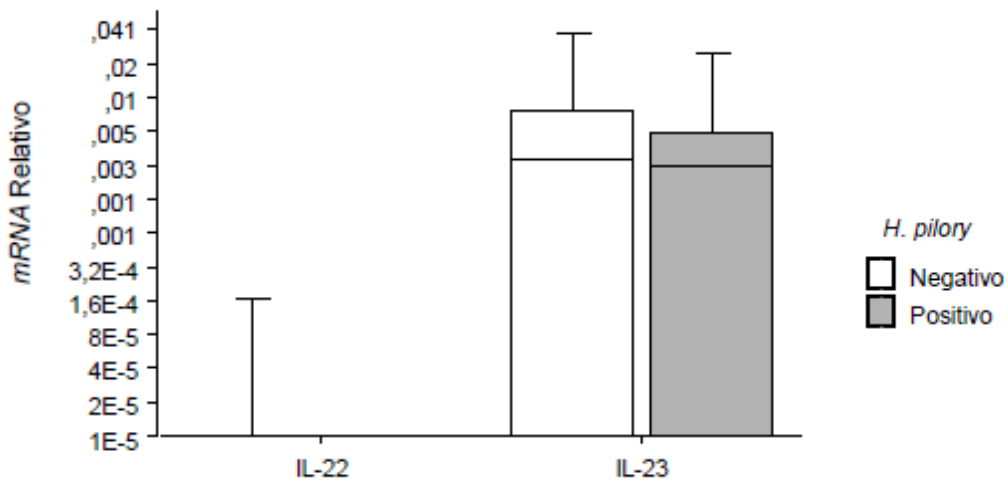




Figura 39 - Número de cópias relativas de *mRNA* para a *IL-33* presente em biópsias de pacientes com gastrite crônica ativa, crônica sem atividade, sem gastrite no antro comparada com a de pacientes do grupo controle (Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ )

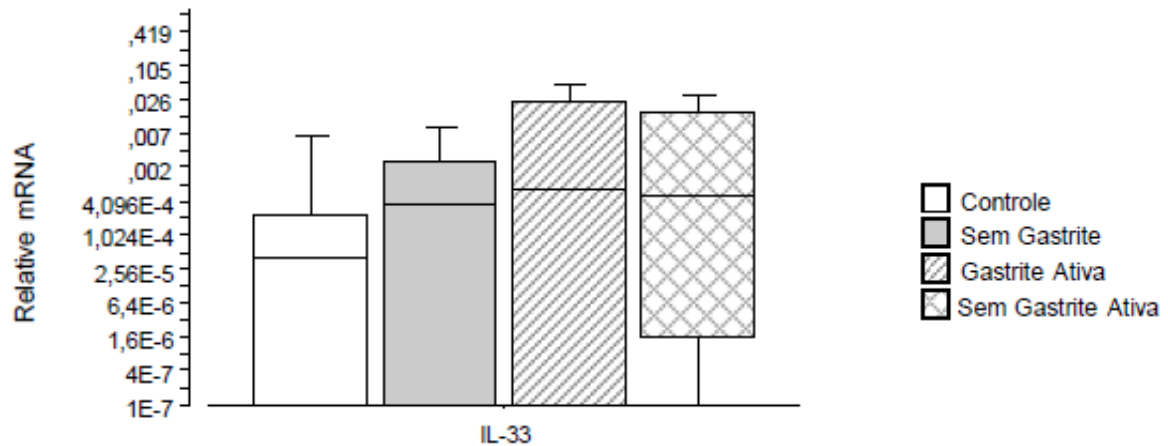
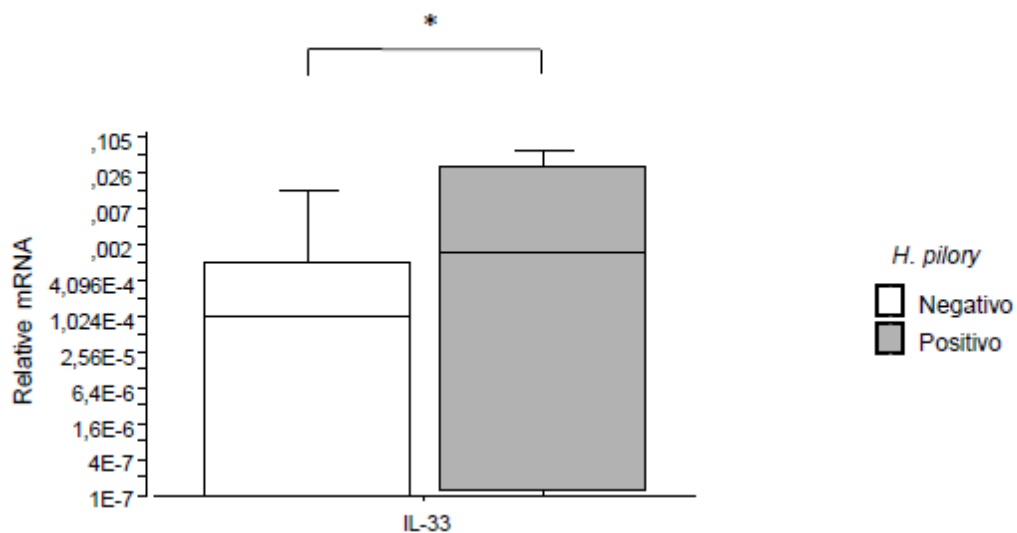


Figura 40 - Número de cópias relativas de *mRNA* para a *IL-33* presente em biópsias de pacientes com ou sem *H. pylori* (Mann-Whitney;  $p = 0,03$ ). A linha horizontal representa a mediana, o percentil de barra de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. \* indica um valor “p” significativo.



## *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 assintomáticos, 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 (HOOI et al., 2017).

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, exame anatomopatológico no corpo e antro gástrico para a pesquisa da bactéria e realizou-se biologia molecular com ampliação do gene 16S *rRNA*. Estas técnicas foram realizadas no intuito de evitar os chamados falso-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 dos pacientes *H. pylori* falsos negativos, o que o deixou bastante confiável (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014)

Ainda com relação ao teste da urease, amplamente utilizados durante os exames de EDA é importante ressaltar que falsos negativos podem ser obtidos com este teste em razão da distribuição irregular da bactéria na mucosa gástrica, escassez da bactéria, 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)..

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 (PEREIRA; MEDEIROS, 2014).

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 relativamente baixo para o Brasil, fato que pode ser explicado pela melhor condição socioeconômica dos pacientes que foram procedentes da UFTM e de Clínica Particular (FRUGIS et al., 2016).

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 e corpo gástrico (MARSHALL, B.; TACHIBANA; LEVY, 1983).

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 (RIBEIRO et al., 2016).

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 serem 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).

A secreção gástrica é bastante influenciada pela infecção crônica do *H. pylori* e vai depender do grau e localização da gastrite e conseqüentemente 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).

A gastrite acometeu maior percentual de indivíduos com a forma ativa da doença. Seja no corpo ou antro gástrico, as lesões mostram-se associadas à presença da bactéria em mais de 70% dos casos. Análises de biópsias da mucosa gástrica relatam positividade para *H. pylori* em cerca de 60% dos indivíduos com gastrite crônica, sendo a frequência de colonização independente da região gástrica (AGBOR et al., 2018; CARRILHO et al., 2009).

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 (ÁLVARES et al., 2006).

Ainda nos exames anatomopatológicos realizados 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 (ÁLVARES et al., 2006).

O presente estudo analisou também a expressão, de *mRNA*, de um conjunto de mediadores envolvidos na modulação da resposta inflamatória. Nesta análise, foi verificada a expressão de genes de citocinas, quimiocinas, neuropeptídeos e enzimas relacionadas a mecanismos efetores e reguladores da inflamação. O estudo avaliou biopsias do corpo gástrico, obtidos durante exame de endoscopia digestiva realizados em pacientes com queixa de dispepsia.

Observamos um aumento significativo da expressão de *ARG-1* no grupo de pacientes com gastrite crônica sem atividade quando comparada ao grupo controle. A *ARG-1* catalisa a hidrólise da arginina em ornitina e ureia, foi demonstrada ser produzida no fígado sob estímulo de *IL-4*, *IL-10* e *TGF-β* como também por células da resposta imune, como neutrófilos ativados em locais de infecção. Pode modular a resposta imune e atuar no processo de regeneração tecidual (JACOBSEN et al., 2007). Em nosso estudo, sua associação com a forma de gastrite crônica sem atividade sugere que possa estar relacionada ao controle da inflamação e aos processos de reparo, que sucedem as lesões inflamatórias agudas. Em nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa na expressão do gene da *ARG2*, *NOS2*, duas outras enzimas que também têm a L-arginina como substrato, a primeira hidrolisando a L-arginina da mesma forma que a *ARG-1* e a segunda *NOS2*, dando origem ao óxido nítrico, um potente agente microbicida associado ao controle do crescimento de micro-organismos, mas por outro lado causando dano tecidual. Assim a associação de *ARG-1* com a inflamação crônica pode indicar um processo de reparo em andamento. Por outro lado, alguns autores associam a presença de arginases, especialmente a *ARG-2* a mecanismos de escape do *H. pylori*, por causar uma baixa disponibilidade de L-arginina, dificultando a atividade microbicida dependente da *NOS2*. Da mesma forma a expressão de arginase pelo próprio *H.pylori* foi

associada a sua atividade carcinogênica (SHI, Y. Y. et al., 2014). Acreditamos que, os pacientes com gastrite crônica sem atividade estabeleceram um mecanismo de proteção frente a infecção e com o aumento da *ARG-1* estabeleceram um processo de modulação para regeneração.

No presente estudo, a expressão do gene do *TGF- $\beta$*  e do fator de transcrição *FOXP3* foi significativamente maior no grupo de pacientes com gastrite crônica sem atividade, quando comparada ao grupo controle. Na infecção pelo *H. pylori* quando predomina a resposta do perfil Th1 há o estabelecimento de mecanismos efetores que reduzem o número de bactérias, porém, pode ocorrer um maior dano epitelial com subseqüentemente progressão da gastrite para atrofia gástrica. O *H. pylori* tem uma importante interface com o *TGF- $\beta$* , ele pode induzir sua produção, de modo dependente de *vacA* (RAHIMIAN et al., 2014) como também tem potencial efeito modulador de sua sinalização, pela interação entre CagA e Smad3. (NGUYEN, T. T. et al., 2015). Os resultados aqui apresentados, em que alta expressão de *mRNA* pra *TGF- $\beta$*  está associado a gastrite crônica sem atividade, novamente sugere que a citocina esta associada a mecanismos de controle da inflamação e nos processos de regeneração.

Corroborando com esta hipótese, encontramos em nosso estudo, uma baixa expressão de *mRNA* para *FOXP3* em amostras positivas para o *H. pylori*. O *FOXP3* é uma molécula de sinalização associado a células Treg e ao processo de regulação da resposta imune de maneira geral, sua expressão em menor quantidade na presença da bactéria sugere que a mesma é capaz de reprimir sua produção, diminuindo a pressão de imunoregulação e o estabelecimento de mecanismos efetores com potencial capacidade de controlar o crescimento bacteriano. É importante considerar que estes mesmos mecanismos têm potencial efeito de lesar a mucosa.

Não encontramos diferença significativa na expressão dos genes do *IFN- $\gamma$* , *IL-17* e *IL-10* e os fatores de transcrição *T-bet* e *ROR $\gamma$  $\tau$*  nos grupos de pacientes com gastrite crônica ativa, gastrite crônica sem atividade, sem gastrite e comparadas ao grupo controle e quando comparados com o grupo de pacientes *H. pylori* positivo ou negativos. Assim, acreditamos que o perfil Treg parece estar modulando o processo inflamatório dos pacientes com gastrite crônica sem atividade, protegendo esses pacientes de lesões teciduais e agravamento dessa gastrite. Outros estudos realizados já mostraram uma maior expressão da *IL-17* nos pacientes *H. pylori* positivos (RODRIGUES et al., 2016).

Ainda no presente trabalho, a expressão do gene da *IL-33* foi significativamente mais expresso nos pacientes *H. pylori* positivos quando comparado com os pacientes *H. pylori* negativos.

Ainda neste estudo analisamos também a expressão gênica da *IL-6*, *IL-22*, *IL-23* e *IL-33*, nos grupos de pacientes com gastrite crônica ativa, gastrite crônica sem atividade, sem gastrite e comparadas ao grupo controle não houve diferença significativa. Entretanto, a expressão do gene da *IL-33* foi significativamente elevada nos pacientes *H. pylori* positivos quando comparado com os pacientes *H. pylori* negativos. A *IL-33* tem sido descrita como uma molécula sinalizadora de dano tecidual. É altamente expressa na mucosa gástrica e parece ativar potentemente a imunidade Th2 e células reguladoras do sistema imunológico (SCHMITZ et al., 2005). Estudos sugerem que ela pode desempenhar um papel fundamental durante a infecção por *H. pylori*. Outros estudos também observaram um aumento da expressão de *IL33* em biopsias de pacientes infectados pelo *H. pylori*, assim como nos casos de gastrite ativa (SHAHI et al., 2015). Sua produção durante a infecção pode modular a inflamação TH1 e TH17 exacerbada e contribuindo para o menor dano tecidual. Sua capacidade de ativar resposta TH2 e de regulação induz ainda a diferenciação de macrófagos M2. Esses macrófagos, também participam dos processos de reparo tecidual e expressam, entre outros produtos a arginase, que também foi associada, neste estudo à gastrite crônica sem atividade. Os dados sugerem que, a *IL-33* além de atuar como citocina alarmante frente a infecção pelo *H. pylori*, está associada aos mecanismos de reparo, com ativação da produção de mediadores anti-inflamatórios, possível diferenciação de macrófagos M2, modulando o processo inflamatório e estimulando o reparo no tecido lesado. Assim a *IL33* pode ser um mediador crucial da resposta imune à infecção após dano em tecidos epiteliais nas mucosas.

Portanto, *ARG-1* e perfil Treg parecem estar modulando o processo inflamatório, protegendo esses pacientes de lesões teciduais com gastrite crônica sem atividade. Ainda, sugerimos que a *IL33* pode ser um mediador crucial da resposta imune à infecção após dano na mucosa gástrica.



*Conclusões*

---

## 8 CONCLUSÕES

- ✓ Infecção por *H. pylori* não mostrou nenhum fator clínico preditivo de infecção
- ✓ O exame de endoscopia digestiva alta evidenciou resultados como sugestivos de provável infecção da bactéria
- ✓ O uso de IBPs deverá ser suspenso por pelo menos duas semanas antes da EDA para evitarmos falsos negativos da presença do *H. pylori* no estômago.
- ✓ O exame anatomopatológico mostrou-se necessário para classificar as diferentes gastrites e/ou alterações histopatológicas provocadas pela bactéria.
- ✓ *ARG-1* e perfil Treg parecem estar modulando o processo inflamatório, protegendo esses pacientes de lesões teciduais com gastrite crônica sem atividade. Ainda, nos pareceu que a *IL-33* pode ser um mediador crucial da resposta imune à infecção após dano na mucosa gástrica.

## *Referências*

---

## 9 REFERÊNCIAS

AGBOR, N. E. et al. Helicobacter pylori in patients with gastritis in West Cameroon: prevalence and risk factors for infection. **BMC Res Notes**, v. 11, n. 1, p. 559, Aug 3 2018.

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.

ÁLVARES, M. M. D. et al. Características da gastrite crônica associada a Helicobacter pylori: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o status cagA. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 51-59, 2006.

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

BAGHERI, N.; SALIMZADEH, L.; SHIRZAD, H. The role of T helper 1-cell response in Helicobacter pylori-infection. **Microb Pathog**, v. 123, p. 1-8, Jun 21 2018.

BAMFORD, K. B. et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during Helicobacter pylori have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterology**, v. 114, n. 3, p. 482-92, Mar 1998.

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

BHUIYAN, T. R. et al. Th1 and Th17 Responses to Helicobacter pylori in Bangladeshi Infants, Children and Adults. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93943, 2014.

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.

BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. **J Clin Invest**, v. 113, n. 3, p. 321-33, Feb 2004.

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.

CAMARGO, M. C. et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 9, p. 1674-87, Sep 2006.

CARRILHO, C. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection, chronic gastritis, and intestinal metaplasia in Mozambican dyspeptic patients. **Virchows Arch**, v. 454, n. 2, p. 153-60, Feb 2009.

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.

CHATURVEDI, R. et al. L-arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**, v. 75, n. 9, p. 4305-15, Sep 2007.

CHENG, H. H. et al. Interleukin-1beta and -10 polymorphisms influence erosive reflux esophagitis and gastritis in Taiwanese patients. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, n. 8, p. 1443-51, Aug 2010.

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.

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.

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.

EL-OMAR, E. M. et al. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of H. pylori. **Gastroenterology**, v. 118, n. 1, p. 22-30, Jan 2000.

ERIN, N. et al. Differential changes in Substance P, VIP as well as neprilysin levels in patients with gastritis or ulcer. **Peptides**, v. 35, n. 2, p. 218-24, Jun 2012.

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

FIGUEIREDO, C. et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 22, p. 1680-7, Nov 20 2002.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 4, p. 330-6, Apr 2003.

FONTENOT, J. D. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 329-41, Mar 2005.

FRUGIS, S. et al. PREVALENCE OF HELICOBACTER PYLORI TEN YEARS AGO COMPARED TO THE CURRENT PREVALENCE IN PATIENTS UNDERGOING UPPER ENDOSCOPY. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 29, p. 151-154, 2016.

GARCIA-GONZALEZ, M. A. et al. The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. **Clin Exp Immunol**, v. 125, n. 3, p. 368-75, Sep 2001.

GARZA-GONZÁLEZ, E. et al. A review of Helicobacter pylori diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 6, p. 1438-49, Feb 14 2014.

GEBERT, B. et al. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science**, v. 301, n. 5636, p. 1099-102, Aug 22 2003.

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<sup>+</sup> 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.

HOOI, J. K. Y. et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 420-429, Aug 2017.

JACOBSEN, L. C. et al. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 3084-7, Apr 1 2007.

KABIR, S. The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity. **Helicobacter**, v. 16, n. 1, p. 1-8, Feb 2011.

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.

LI, N.; XIE, C.; LU, N. H. Transforming growth factor-beta: an important mediator in *Helicobacter pylori*-associated pathogenesis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 5, p. 77, 2015.

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.; TACHIBANA, C.; LEVY, S. B. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 24, n. 6, p. 835-40, Dec 1983.

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.

MOLINARI, M. et al. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. **J Exp Med**, v. 187, n. 1, p. 135-40, Jan 5 1998.

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.



NGUYEN, T. T. et al. Repressed TGF- $\beta$  signaling through CagA-Smad3 interaction as. **J Clin Biochem Nutr**, v. 57, n. 2, p. 113-20, Sep 2015.

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.

ODENBREIT, S. et al. Interleukin-6 induction by Helicobacter pylori in human macrophages is dependent on phagocytosis. **Helicobacter**, v. 11, n. 3, p. 196-207, 2006.

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.

PEREIRA, M. I.; MEDEIROS, J. A. Role of Helicobacter pylori in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 3, p. 684-98, Jan 21 2014.

PRASSE, A. et al. Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 182, n. 4, p. 540-548, 2010.

RAHIMIAN, G. et al. Virulence factors of Helicobacter pylori vacA increase markedly gastric mucosal TGF-beta1 mRNA expression in gastritis patients. **Microb Pathog**, v. 67-68, p. 1-7, Feb-Mar 2014.

RIBEIRO, P. F. S. et al. RELATIONSHIP BETWEEN ESOPHAGITIS GRADES AND HELICOBACTER PYLORI. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 29, p. 135-137, 2016.

RILEY, L. K. et al. Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 4, p. 942-6, Apr 1996.

RODRIGUES, D. B. et al. Interleukin-17 are the major cytokine in chronic gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 1 Supplement, p. 66.23-66.23, 2016.

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

ROMERO-ADRIAN, T. B. et al. Helicobacter pylori: bacterial factors and the role of cytokines in the immune response. **Curr Microbiol**, v. 60, n. 2, p. 143-55, Feb 2010.

SANTORI, F. R. et al. Identification of natural ROR $\gamma$  ligands that regulate the development of lymphoid cells. **Cell Metab**, v. 21, n. 2, p. 286-298, Feb 3 2015.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479-90, Nov 2005.

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.

SHAHI, H. et al. Association Between Helicobacter pylori cagA, babA2 Virulence Factors and Gastric Mucosal Interleukin-33 mRNA Expression and Clinical Outcomes in Dyspeptic Patients. **Int J Mol Cell Med**, v. 4, n. 4, p. 227-34, Fall 2015.

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.

SHI, Y. Y. et al. Expression of three essential antioxidants of Helicobacter pylori in clinical isolates. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 15, n. 5, p. 500-6, May 2014.

SMITH, M. F., JR. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 35, p. 32552-60, Aug 29 2003.

SONG, Z. et al. Tr1 responses are elevated in asymptomatic H. pylori-infected individuals and are functionally impaired in H. pylori-gastric cancer patients. **Exp Cell Res**, v. 367, n. 2, p. 251-256, Jun 15 2018.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. Helicobacter pylori infection. **N Engl J Med**, v. 347, n. 15, p. 1175-86, Oct 10 2002.

SUGIMOTO, M. et al. Helicobacter pylori outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 11, p. 1677-84, Nov 2011.

TAAMS, L. S. et al. Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 6, p. 1621-30, Jun 2002.

TRAN, L. S. et al. NOD1 is required for Helicobacter pylori induction of IL-33 responses in gastric epithelial cells. **Cell Microbiol**, v. 20, n. 5, p. e12826, May 2018.

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.

VINAGRE, R. et al. HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND IMMUNE PROFILE OF PATIENTS WITH DIFFERENT GASTRODUODENAL DISEASES. **Arq Gastroenterol**, v. 55, n. 2, p. 122-127, Apr-Jun 2018.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 1, n. 8336, p. 1273-5, Jun 4 1983.

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

WING, K. et al. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. **Immunology**, v. 106, n. 2, p. 190-9, Jun 2002.

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.

WU, M. S. et al. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. **Int J Cancer**, v. 104, n. 5, p. 617-23, May 1 2003.

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.

*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](mailto:denise.rodrigues@uniube.br) 9158-9234

Dr. Emerson Abdulmassih Wood da Silva

e-mail: [wood@mednet.com.br](mailto: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](mailto:denise.rodrigues@uniube.br) 9158-9234

Mestrando Dr. Emerson Abdulmassih Wood da Silva

e-mail: [wood@mednet.com.br](mailto: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: \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_

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 ( ) atrófica ( )

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](mailto: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

I. 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:

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- $\gamma$  E IFN- $\gamma$ ), Th2(IL-4), Th17 (IL-17, IL-23) e Treg (TGF- $\beta$  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

**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