

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em

Gastroenterologia e Hepatologia

**Associação entre infecção por *Helicobacter pylori*,
Proteína C Reativa e virulência bacteriana na Dispepsia
Funcional**

Huander Felipe Andreolla

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rejane Giacomelli Tavares

Dissertação de Mestrado

2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

**Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia
e Hepatologia**

**Associação entre infecção por *Helicobacter pylori*,
Proteína C Reativa e virulência bacteriana na Dispepsia
Funcional**

Huander Felipe Andreolla

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rejane Giacomelli Tavares

Dissertação submetida à avaliação do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Andreolla, Huander Felipe

Associação entre infecção por *Helicobacter pylori*, Proteína C Reativa e virulência bacteriana na Dispepsia Funcional / Huander Felipe Andreolla. -- 2012.

112 f.

Orientador: João Carlos Prolla.

Coorientadora: Rejane Giacomelli Tavares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Dispepsia Funcional. 2. *Helicobacter pylori*. 3. CagA. 4. Proteína C reativa. 5. Inflamação. I. Prolla, João Carlos, orient. II. Tavares, Rejane Giacomelli, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“(...) Sentir primeiro, pensar depois

Perdoar primeiro, julgar depois

Amar primeiro, educar depois

Esquecer primeiro, aprender depois

Libertar primeiro, ensinar depois

Alimentar primeiro, cantar depois

Possuir primeiro, contemplar depois

Agir primeiro, julgar depois

Navegar primeiro, aportar depois

Viver primeiro, morrer depois”.

(Mário Quintana)

Aos meus pais,
aos que passam por nossa vida
e aos que ficam nela.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Hélio Andreolla e Teresinha de Fátima Gezak Andreolla, por serem exemplos de luta e superação. Agradeço ao amor e incondicional esforço para que na vida eu pudesse sonhar e conquistar aquilo almejado. Agradeço pela compreensão das minhas ausências, as quais não aconteceram por vontade própria, mas que se fizeram necessárias para a minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus irmãos, Igor César Andreolla e Murilo Gustavo Andreolla, pelo apoio, carinho e companheirismo.

Aos pacientes incluídos neste estudo, por se fazerem exemplos nítidos de que sem pessoas, não há constructo. Por serem exemplos de que não conquistamos nada ao pensarmos e agirmos singularmente.

Ao Professor Dr. João Carlos Prolla, meu orientador, por todos os ensinamentos e pela sempre disponibilidade. Obrigado pelo incentivo, pelo incondicional apoio. Muito obrigado por me acolher como orientando.

À Professora Dra. Rejane Giacomelli Tavares. Reservo aqui um espaço distinto para agradecer imensamente a este exemplo de pessoa, pesquisadora e mestre. Certamente faltariam palavras para agradecer pela paciência, disponibilidade e incentivo que foram decisivos para a execução deste trabalho.

Pelo apoio na obtenção de recursos que viabilizaram esta pesquisa e pelos ensinamentos de bancada. Muito obrigado por ensinar com maestria, agir como exemplo e aconselhar como amiga.

Ao Professor Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni. Sem palavras. Muito obrigado por abrir-me as portas. Muito obrigado por acreditar em mim e

possibilitar que eu integrasse este grande e bem-desenhado estudo que foi o HEROES. Muito obrigado pela oportunidade de aprendizado e pela disponibilidade.

Ao Professor Dr. Carlos Francesconi, pelo acolhimento e pelo exemplo de profissionalismo e ética.

Ao Dr. Guilherme Sander, meu agradecimento pelo auxílio, em especial, no que se refere a construção do banco de dados deste trabalho.

À Professora Dra. Carmem Pilla, pela possibilidade de aprendizado e por compartilhar seu laboratório para a execução dos experimentos deste estudo.

À Professora Dra. Janice Coelho, por sua disponibilidade e parceria que possibilitou o meu estágio em docência. Muito obrigado.

Aos Professores Dr. Sérgio Gabriel Barros e Dr. Renato Borges

Fagundes. Pelo incentivo e pela confiança em mim depositada.

Aos colegas e amigos do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Um agradecimento especial ao colega Tobias Milbradt e à Laura de Bona, pelo auxílio na logística do estudo, nas colheitas de material biológico e na construção do banco de dados.

Um especial agradecimento ao secretário do Serviço de Gastroenterologia, Fernando Soares, por seu dinamismo e boa vontade para auxiliar nas demandas existentes.

A todos os integrantes da equipe do estudo HEROES, aonde este trabalho teve sua origem. Muito obrigado pelo auxílio na execução das endoscopias e procedimentos necessários à realização deste trabalho. Obrigado, time!

Aos funcionários do Centro Cirúrgico Ambulatorial do HCPA, pela boa vontade e alegria com que realizaram suas tarefas, muito obrigado.

À Equipe de Docentes, Discentes e funcionários do Programa de PósGraduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia desta Universidade. Em especial, agradeço à Moema Goulart Viana, secretária do programa, sempre solícita e disponível para auxiliar no que se fizesse necessário.

Ao Departamento de Importação da UFRGS, agradeço na pessoa do Sr. Sérgio Ribeiro, o qual me auxiliou na importação de kits, agradeço pela atenção e auxílio que foi fundamental para a execução deste projeto.

A todos que estiveram comigo e colaboraram para realização deste trabalho, muito obrigado.

ESTRUTURA

Após os itens exigidos na estrutura desta Dissertação pelo Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, apresenta-se um manuscrito redigido nos moldes ao qual será submetido: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. A estrutura do artigo respeita os itens e estrutura exigida para publicação no referido periódico.

O item ANEXOS contém documentos de relevância para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Dispepsia Funcional	03
2.1.1 Generalidades	03
2.1.2 O uso de medicamentos como fator de risco na DF	05
2.1.3 Critérios para o diagnóstico da DF	06
2.1.4 Fisiopatologia da DF	07
2.1.5 Achados endoscópicos e histológicos na DF	08
2.2 <i>Helicobacter pylori</i>	09
2.2.1 Aspectos históricos e microbiológicos	09
2.2.2 Epidemiologia	10
<i>Prevalência</i>	11
<i>Vias de transmissão</i>	12
2.2.3 Diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i>	14
<i>Métodos diagnósticos invasivos</i>	14
<i>Métodos diagnósticos não-invasivos</i>	15
2.2.4 Fatores de virulência e colonização	16
<i>Flagelos</i>	17
<i>Urease</i>	17
<i>Catalase e superóxido dismutase</i>	18
<i>Proteínas de choque térmico</i>	18
<i>VacA</i>	20
	X

<i>CagA</i>	25
2.3 Proteína C Reativa	27
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
3.1 Justificativa	32
3.2 Objetivos	32
3.2.1 Objetivo Principal	32
3.2.2 Objetivos Específicos	33
4. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	33
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	38
7. RESULTADOS	39
8. DISCUSSÃO	42
9. CONCLUSÕES	47
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	69
11.1 Manuscrito	70
12. ANEXOS	91
12.1 TCLE 05-422	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido Acetil salicílico
AINEs	Antiinflamatórios Não Esteróides
CagA	<i>Cytotoxin Associated Gene A</i>
DF	Dispepsia Funcional
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HEROES	<i>Helicobacter Eradication Relief of Dyspeptic Symptoms</i>
IL-8	Interleucina 8
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>
PADYQ	<i>Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire</i>
PCR	Proteína C Reativa
PCRus	Proteína C Reativa Ultra Sensível
RU/mL	Unidades relativas por mililitro
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T4SS	<i>Type-IV secretion system</i>
VacA	<i>Vacuole-associated Cytotoxin A</i>

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Caracterização dos sintomas de Dispepsia de acordo com o Consenso Roma III
- Tabela 2** Proteínas de *H. pylori* envolvidas na colonização e patogênese do epitélio gástrico humano
- Tabela 3** Características sociodemográficas e estilo de vida de pacientes dispépticos funcionais de acordo com a positividade para *H. pylori* e com fator de virulência CagA
- Tabela 4** Status inflamatório local e sistêmico de acordo com a presença da infecção *H. pylori* e fator de virulência CagA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Prevalência global de dispepsia funcional e dispepsia não investigada
- Figura 2** Interação entre *H. pylori* e células do epitélio gástrico sinalizando o papel das adesinas e do sistema de secreção do tipo IV, codificado pelo cagPAI

RESUMO

Introdução: Recentemente, vários estudos têm investigado e até mesmo sugerindo a bactéria *Helicobacter pylori* como um importante componente no desenvolvimento de eventos restritos ou não ao trato gastrointestinal. A relação já bastante elucidada acerca da relação entre os fatores bacterianos de virulência e o risco aumentado para úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico parece não estar muito definida em se tratando de alterações em marcadores de inflamação aguda, como a proteína C reativa (PCR), em indivíduos infectados pelas cepas mais virulentas do microrganismo. Neste trabalho, nós avaliamos a presença de *H. pylori*, virulência bacteriana e níveis séricos de PCR em pacientes dispépticos funcionais. **Materiais e métodos:** Estudo transversal que incluiu 489 indivíduos saudáveis com diagnóstico de dispepsia funcional firmado através de critérios do Consenso de Roma III. Após avaliação clínica e endoscópica, os pacientes foram incluídos por não apresentarem qualquer causa orgânica que pudesse estar relacionada aos sintomas de dispepsia. A presença da bactéria foi diagnosticada através de análise histológica e teste rápido da urease dos fragmentos biopsiados. Os níveis séricos de PCR foram obtidos por imunonefelometria e o status para o fator de virulência CagA foi determinado através de ensaio comercial imunoenzimático. **Resultados:** A prevalência de *H. pylori* foi de 66,3% e a presença de anticorpos anti-CagA foi detectada em aproximadamente 43% das amostras positivas. Houve uma associação estatisticamente significativa entre o consumo de chimarrão e a presença da bactéria. Observou-se um efeito

importante da infecção por *H. pylori* na inflamação local, estimada através da atividade inflamatória e grau de inflamação do epitélio gástrico. Não foi constatada resposta inflamatória sistêmica ao patógeno através da dosagem de PCR, independente do status de virulência bacteriana. **Conclusão:** Na população de indivíduos disépticos funcionais avaliada, a bactéria parece não desencadear qualquer resposta inflamatória sistêmica, estando a virulência bacteriana associada a um maior grau e atividade inflamatória do epitélio gástrico.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, dispepsia, proteína C-reativa, proteína cagA, inflamação

ABSTRACT

Background: Recently, a great variety of studies aimed to investigate and even suggest *Helicobacter pylori* as an important key factor in gastrointestinal and non-gastrointestinal events development. The well-established relationship between bacterial virulence and increased risk for peptic ulcer or gastric carcinoma is not so clear when comparing inflammation markers alterations, such C reactive protein (CRP), with the pathogen. We evaluated the presence of *H. pylori*, bacterial virulence and CRP serum levels in individuals diagnosed with functional dyspepsia. **Materials and Methods:** Transversal study that evaluated 489 healthy individuals well characterized according to Rome III Consensus for the diagnosis of functional dyspepsia. The study population underwent to an endoscopic investigation and did not present any organic explanation for their symptoms. The bacterial infection was established by histology and urease rapid test. The levels of serum CRP were obtained by immunonefelometry and CagA status of *H. pylori* positive individuals was determined trough a commercial immunoenzimatic assay. **Results:** Prevalence rate of *H. pylori* was 66.3% and virulence factor CagA was detected in nearly 43% of positive samples. We found a statistically significant relationship between yerba mate tea consumption and positive *H. pylori* status. An important effect of bacterial infection on inflammation was only observed in gastric epithelium. No systemic response to the pathogen, measured through CRP levels, was observed, regardless of CagA status. **Conclusion:** In our study

population, the presence of *H. pylori* seems not to be related with any important systemic inflammatory response. Bacterial virulence was related to a higher inflammation and inflammatory activity in gastric epithelium.

Key words: *Helicobacter pylori*, dyspepsia, C-reactive protein, cagA protein, inflammation.

1. INTRODUÇÃO

Dispepsia é um termo derivado da língua grega e significa “digestão difícil” (dys = “difícil”; peptein = “digestão”). Atualmente, esse termo é usado para definir sintomas digestivos do abdômen superior, não obrigatoriamente restritos ao período pós-prandial. Quando os sintomas característicos deste agravo estão presentes, na ausência de qualquer achado orgânico que possa justificá-los, então, a dispepsia é dita “funcional” (1).

Alguns estudos indicam que a incidência da dispepsia funcional atinge cerca de 20-25% na população ocidental, sendo responsável por um vultoso custo econômico traduzido através de consultas, do uso de medicamentos, da reduzida produtividade de trabalho e do absenteísmo (1, 2).

Apesar de fisiopatologicamente não estar totalmente compreendida, dentre os fatores que possivelmente contribuam para a dispepsia estão a vulnerabilidade psicológica, o consumo de café e analgésicos (acetaminofen) e a infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), cuja erradicação, através de esquemas terapêuticos, parece resultar em significativa melhora dos sintomas dispépticos e da qualidade de vida (3-6).

A infecção pela bactéria *H. pylori*, descrita inicialmente por Warren e Marshal (1982), é classificada como carcinógeno tipo I, ou seja, um organismo cancerígeno definitivo, e possui uma relação mais do que comprovada com a incidência de úlcera gastroduodenal, com o linfoma MALT e com o carcinoma gástrico (7). Contudo, a alteração que este microrganismo causa na inflamação sistêmica ainda é alvo de discussão e controvérsias em razão dos achados diversos descritos na literatura médica da última década (8, 9).

Cabe ressaltar que a infecção e a colonização deste microrganismo no epitélio gástrico se dão pela atuação de alguns fatores de virulência do mesmo como estratégias para garantir sua permanência frente ao ambiente ácido do epitélio gástrico e ao sistema imunológico do hospedeiro.

Algumas cepas desta bactéria possuem, dentre outros fatores de virulência, a produção da citotoxina A. A produção desta citotoxina está especialmente relacionada a um potencial carcinogênico maior, o qual associa-se de modo direto com a ocorrência de úlceras pépticas e do carcinoma gástrico.

Além da produção de citotoxinas e de fatores intrínsecos que favorecem sua colonização e permanência em meio ao pH ácido do estômago, a bactéria é capaz de desencadear uma resposta inflamatória que se inicia através do recrutamento de células inflamatórias e que culmina na apoptose celular, através da ligação entre o microrganismo e moléculas expressas na superfície das células do epitélio gástrico (10).

Contudo, a relação deste fator de virulência com o estado inflamatório sistêmico dos pacientes bem como a participação do patógeno na alteração do mesmo persistem objetos não elucidados em sua plenitude. Tal fato configura-se fator de estímulo para o desenvolvimento de estudos adicionais, especialmente, no que tange a relação causal possivelmente existente entre o *H. pylori* e a dispepsia funcional bem como do papel imunogênico desencadeado pela bactéria sistemicamente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dispepsia Funcional

2.1.1 Generalidades

A dispepsia funcional (DF) é uma desordem gastrintestinal caracterizada por sintomas originados na região gastroduodenal na ausência de uma doença orgânica de base à qual possa ser atribuída a sua causa (11). Tal desordem é a mais prevalente entre um grupo de doenças gastrintestinais classificadas como funcionais e, embora não esteja associada com aumento de mortalidade, ela é crônica e responsável por piora na qualidade de vida dos pacientes acometidos, além de gerar gastos econômicos substanciais (2, 11, 12).

Uma metanálise aponta que o maior impacto na qualidade de vida dos indivíduos portadores é especialmente evidenciado no grupo de pacientes que apresenta as formas moderada e severa de dispepsia funcional (12). Em outro estudo mais recente, Sander e colaboradores mostraram uma importante influência dos sintomas dispépticos na produtividade de trabalho. Neste estudo foram avaliados 850 indivíduos, 45,5% destes, economicamente ativos. Um dos achados relevantes deste estudo deve-se à constatação da perda de produtividade no trabalho tanto no grupo de pacientes dispépticos funcionais quanto nos pacientes que, após avaliação endoscópica, apresentaram alguma causa orgânica que pudesse justificar o quadro de dispepsia (5).

A etiologia desta doença, assim como o manejo dos pacientes, são objetos de controvérsia entre os especialistas e, muitas vezes, a aplicação de questionários validados tem sido uma ferramenta útil para o seu diagnóstico. Com a utilização deste recurso, foram encontradas prevalências entre 14 a 26% em estudos de populações adultas, predominantemente da raça branca,

dos Estados Unidos e da Europa (2, 13). Na Ásia, um inquérito populacional com questionários validados apontou uma prevalência estimada em 14,6% dos adultos moradores de área rural (14).

Uma revisão sistemática aponta que estudos de prevalência deste agravo são limitados pelas dificuldades logísticas de execução, em especial, no que tange a necessidade de recursos para excluírem-se causas orgânicas dos sintomas relatados pelos pacientes (15). De acordo com a Figura 1, globalmente, a prevalência de dispepsia não investigada varia entre 7% - 45%, de acordo com a definição utilizada e com a região geográfica, enquanto que a DF tem mostrado frequências oscilando entre 11% - 29.2% (15).

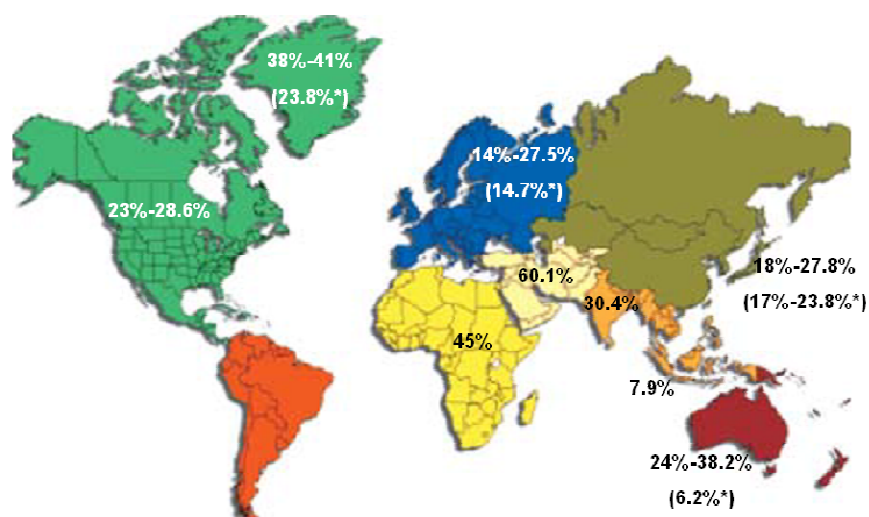


Figura 1. Prevalência global de dispepsia funcional e dispepsia não-investigada. Adaptado de Mahadeva S, Khean-Lee Goh, Epidemiology of functional dyspepsia: A global perspective. 2006.

A utilização da endoscopia digestiva alta tem evidenciado que alterações anatômicas em pacientes com dispepsia são encontradas na minoria dos casos (16). Este achado também foi relatado em alguns estudos relevantes, os quais evidenciaram que grande parte dos sintomas dispépticos é de origem funcional. Tem sido reportada uma frequência de anormalidades em cerca de 30% de

pacientes dispépticos, demonstrando que as anormalidades orgânicas existentes capazes de justificar a sintomatologia são encontradas na minoria dos casos (2, 17).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de sintomas dispépticos são mal conhecidos. Na Dinamarca, Kay e Jorgensen (1994) estudaram a influência de vários fatores e encontraram, com análise multivariada, que somente vulnerabilidade psicológica aumentava significativamente o risco de dispepsia, enquanto tabagismo e alto índice de massa corporal diminuía o risco (4). Em relação ao consumo de café, não há consenso entre os autores. Segundo Elta e colegas, o uso de café é considerado como fator de risco (18). Por outro lado, Talley e cols. não observaram essa associação, assim também como não houve associação para outros fatores ambientais como consumo de álcool, chá e tabagismo (3).

2.1.2 O uso de medicamentos como fator de risco na DF

Dentre outros fatores de risco para DF estão o uso de analgésicos, em especial do acetaminofen, o qual parece ter uma relação de causalidade com os sintomas de dispepsia (3). Por sua vez, o uso de ácido acetilsalicílico (AAS) e de anti inflamatórios não-esteroides (AINES) tem sido associado à ocorrência de lesões erosivas na mucosa gástrica e duodenal (19), mas é controverso se os mesmos estariam relacionados com sintomas dispépticos crônicos (20).

Também, não está comprovado se a erradicação do *H. pylori* previne dispepsia potencialmente associada ao AAS e AINES (21). Embora os critérios de Roma II e Roma III excluam dispepsia medicamentosa do diagnóstico de DF, esses medicamentos foram permitidos em importantes estudos que

avaliaram os efeitos da erradicação do *H. pylori* nos sintomas dispépticos (22, 23).

2.1.3 Critérios para o diagnóstico da DF

Segundo a classificação adotada no Consenso Roma III, os critérios para o diagnóstico da dispepsia funcional devem incluir um ou mais dos seguintes sintomas, a saber, i. plenitude pós-prandial desconfortável; ii. saciedade precoce; iii. dor epigástrica; iv. queimação epigástrica. A Tabela 1 resume a caracterização dos sintomas relacionados a DF. (11).

Outrossim, para o diagnóstico de DF os critérios diagnósticos acima descritos deverão estar presentes nos últimos 3 meses com os sintomas tendo iniciado pelo menos 6 meses antes do diagnóstico, além da ausência de qualquer evidência de doenças estruturais (incluindo endoscopia digestiva alta) que possa explicar os sintomas (24).

Tabela 1. Caracterização dos sintomas de Dispepsia de acordo com o Consenso Roma III

Dor epigástrica	Epigástrico refere-se à região entre o umbigo e a porção terminal mais inferior do esterno, marcado pelas linhas hemiclaviculares. Dor refere-se a uma sensação subjetiva de desconforto; alguns pacientes podem sentir que dano tecidual está ocorrendo. Dor epigástrica pode ou não se apresentar com caráter de queimação.
Plenitude pós-prandial desconfortável	Uma sensação de desconforto remetida à persistência prolongada de alimentos dentro do estômago.
Saciedade precoce	Uma sensação de que o estômago está cheio logo após iniciar-se uma refeição, desproporcional ao tamanho do alimento ingerido, dificultando, desta forma, a ingestão de todo o alimento.
Queimação epigástrica	Epigástrico refere-se à região entre o umbigo e a porção terminal mais inferior do esterno, marcado pelas linhas hemiclaviculares. Queimação refere-se a uma sensação de calor subjetiva e desconfortável.

Adaptado de Geeraerts, B e Tack, J *in* Functional dyspepsia: past, present and future. *J Gastroenterol*, 2008. **43**(4): p.252.

2.1.4 Fisiopatologia da DF

A fisiopatologia da DF permanece desconhecida, embora vários distúrbios estejam envolvidos. A doença parece fazer parte de alterações que envolvem outros segmentos do tubo digestivo, além do trato gastrointestinal superior. Alterações na sensibilidade visceral, motilidade gastrointestinal, funções neurológicas e psicológicas podem participar na DF (25), e, na última década, estudos vem sugerindo uma possível participação do microrganismo *H. pylori* nessa doença (2, 13).

Avanços nas pesquisas clínica e básica revelaram que a infecção por *H. pylori* desempenha um importante papel no desenvolvimento da dismotilidade e hipersensibilidade gastroduodenal, no aumento de secreção ácida ocasionado pela infecção bacteriana, bem como nos sintomas de dispepsia(26). Porém, apesar de a bactéria configurar-se o principal microrganismo capaz de provocar resposta inflamatória gastroduodenal, deve-se considerar a multifatorialidade etiológica da patofisiologia dos sintomas dispépticos (27, 28).

De fato, estudos populacionais têm demonstrado que a bactéria é encontrada com maior frequência em pacientes com DF do que em seus controles (29), mas, embora vários estudos clínicos tenham tentado elucidar a influência bacteriana sobre a disfunção de motilidade gástrica e hipersensibilidade, os resultados têm se apresentado conflitantes (26).

Contudo, outras características etiológicas têm sido reportadas para o desenvolvimento de dispepsia associada à infecção por *H. pylori*, a saber: 1. as secreções anormais dos hormônios grelina e leptina (30, 31); 2. a expressão alterada de micro-RNAs músculo-específicos, ocasionando o espessamento da

membrana muscular gástrica (32) e; 3.a infiltração celular inflamatória duodenal (33).

2.1.5 Achados endoscópicos e histológicos na DF

Gastrite crônica histológica é comum em indivíduos assintomáticos (34) e não está comprovada a associação entre gastrite crônica e queixas abdominais altas. O enantema, identificado endoscopicamente (gastrite endoscópica enantematosa/exsudativa, segundo a Classificação Endoscópica de Sydney), correlaciona-se fracamente com sintomas e com anormalidades histológicas (35). Dessa maneira, gastrites endoscópicas e histológicas são aceitas no diagnóstico de DF (36).

Por sua vez, erosões antrais também podem ser observadas em indivíduos normais e podem representar alterações secundárias a fatores agressores da mucosa gástrica, como os antiinflamatórios não esteróides (AINES), ou, ainda, representar uma entidade distinta. Em relação a esses achados, alguns autores consideram que tais alterações deveriam excluir o diagnóstico de DF, embora alguns estudos tenham incluído erosões gástricas em pacientes dispépticos sem causalidade orgânica (37, 38).

Em se tratando do potencial dano causado ao epitélio gástrico quando da ingestão de alguns medicamentos, Soylu e colaboradores (2008) demonstraram que o dano histopatológico é mais severo entre pacientes usuários de AINES quando comparados a usuários de altas doses de acetaminofen, contudo, endoscopicamente, não foi relatada nenhuma diferença entre os grupos (39).

2.2 *Helicobacter pylori*

2.2.1 Aspectos históricos e microbiológicos

Isolada em 1982 pelos pesquisadores australianos Robin Warren e Barry Marshall, a bactéria *Helicobacter pylori* inaugurou um novo período na microbiologia gástrica (40, 41).

O patógeno foi originalmente denominado GCLO (*Gastric Campylobacter like organism*), posteriormente, recebeu as nomenclaturas de *Campylobacter pyloiridis*, *Campylobacter pyloricus*, *Campylobacter pylori* e, finalmente, em 1989, com o estudo do seqüenciamento de seu rRNA, o organismo passou a ser conhecido como *Helicobacter pylori* (42, 43).

O *H. pylori* ocorre em duas formas morfológicas. A forma replicativa é um organismo Gram negativo, de crescimento lento, microaerófilo, com mobilidade conferida por 4-6 flagelos, espiralado e com a característica de abundante produção de urease. A segunda morfologia apresenta-se cocóide, podendo ou não ser flagelada, e parece conter os componentes necessários para se replicar (40, 43). Embora a forma cocóide seja um “esporo” em potencial, não existem evidências que essa seja a forma transmissível da bactéria e tampouco pode ser cultivada *in vitro* (44). A bactéria apresenta especial tropismo pelo epitélio gástrico, tanto do estômago quanto de áreas de metaplasia gástrica fora do estômago, e provoca reações inflamatórias e imunológicas que perduram por toda a vida, a menos que a infecção seja erradicada (45, 46).

Em relação ao seu metabolismo, esta bactéria não parece fermentar ou oxidar carboidratos, ao mesmo tempo em que exibe atividade do ciclo da ureia como um mecanismo eficaz para eliminar o excesso de nitrogênio (43). As

células de *H. pylori* possuem grânulos de fosfato que apresentam função de reserva energética para situações inóspitas, nas quais, a bactéria possa se encontrar em um meio com ausência de fonte energética exógena (47).

Após o crescimento em meios de cultura, são visualizadas colônias pequenas, medindo cerca de 1 a 3 mm de diâmetro com um aspecto cinza, translúcente e fracamente β -hemolítico. O microrganismo também se diferencia por não formar esporos e, em culturas velhas, transforma-se em corpos esféricos ou cocóides (48).

2.2.2 Epidemiologia

Apesar da alta prevalência do *H. pylori*, muitos aspectos epidemiológicos dessa infecção permanecem obscuros.

Globalmente, a infecção por este microrganismo atinge cerca de 60% da população, ocasionando anualmente cerca de um milhão de óbitos (49, 50). Vários aspectos parecem estar relacionados à prevalência e à incidência do *H. pylori* na população, a saber, o nível socioeconômico, a institucionalização e a escolaridade (51).

É mais do que evidente que os índices de infecção são crescentes durante a infância, em especial nos primeiros cinco anos de idade. Após os 15 anos de idade, a taxa de prevalência da infecção parece ter um aumento sutil e constante até atingir uma estabilização ou ainda um leve declínio em indivíduos sexagenários (51).

Prevalência

A prevalência do *H. pylori* depende da idade da população e do país de origem, variando de 30% a 90%. Em países da América do Sul, alguns grupos populacionais têm apresentado taxas de prevalência que variam entre 70 e 90% da população (52-54). Em países desenvolvidos, existe uma clara elevação da prevalência nas faixas etárias acima de 45 anos, o que parece ser secundário a um “efeito de coorte”, e não uma aquisição contínua. Isso é explicado pela alta taxa de contaminação das crianças nascidas antes de 1950, quando esses países não apresentavam o atual desenvolvimento (55).

No Brasil, em Minas Gerais, foi constatada prevalência de 34% da infecção em crianças de baixo nível socioeconômico, e de 40 a 80% em adultos, também com influência direta do nível socioeconômico (56). Contudo, estima-se que 60 a 70% dos indivíduos estejam infectados pelo *H. pylori* (57, 58). Zaterka e colaboradores (2002) demonstraram prevalências extremamente elevadas de infecção pelo *H. pylori* em crianças de classe social baixa no Brasil. A infecção foi observada em mais de 20% das crianças com menos de 1 ano de idade, e em mais de 50% nas maiores de 3 anos (59). Em outro estudo realizado com indivíduos adultos brasileiros, as taxas de prevalência estão situadas em torno de 60-65%, sendo observada uma relação entre a frequência do patógeno e fatores como a idade e o nível socioeconômico, como previamente mencionado (60).

Sousa e colaboradores (2001) demonstraram através de estudo transversal baseado na revisão de arquivos médicos que a prevalência de *H. pylori* em crianças avaliadas entre 1990 e 1997 num hospital de Porto Alegre/RS que a frequência do patógeno foi de aproximadamente 25% na

população investigada (61). Outro estudo realizado em um serviço de referência da região central do estado do Rio Grande do Sul demonstrou uma prevalência de 76% de *H. pylori*, sendo a infecção por este patógeno determinou uma razão de chances 10 vezes maior de se encontrar algum grau de alteração histológica na mucosa gástrica (62).

Tem sido relatada uma maior frequência de infecção em negros do que em brancos, assim como, quanto maior a escolaridade, menor é a prevalência da infecção pelo *H. pylori*. Por outro lado, fatores como sexo, tabagismo e alcoolismo não parecem influenciar as taxas de prevalência do microrganismo (51, 63).

Vias de transmissão

Embora esteja definido que o principal reservatório do *H. pylori* seja o estômago de seres humanos, as rotas de transmissão continuam desconhecidas (47).

Evidências sugerem que a transmissão se dá basicamente de pessoa a pessoa. Essa hipótese é apoiada por estudos de crianças em creches, onde a prevalência é maior do que a esperada, e de estudos de famílias nas quais a presença de uma pessoa infectada deixa os outros membros da família substancialmente mais propensos a serem infectados. A incapacidade do *H. pylori* de sobreviver em temperatura ambiente por mais do que 1 a 3 dias, favorece a hipótese de que a transmissão ocorra mais frequentemente de pessoa a pessoa, do que por reservatórios ambientais (64).

A maneira pela qual o *H. pylori* é transmitido entre as pessoas ainda é incerta. Uma das possibilidades seria transmissão fecal-oral. No entanto, a

cultura de fezes deste microrganismo têm sido extremamente difícil e a simples determinação da bactéria nas fezes, através da reação em cadeia da polimerase, não garante a viabilidade da mesma (65). Parece que esta bactéria é vulnerável aos sais biliares e à competição com a flora intestinal, o que poderia dificultar a sobrevivência da mesma no intestino (66).

Outra forma de transmissão pode ser através da contaminação oral-oral. O *H. pylori* tem sido encontrado na cavidade oral, saliva e placa dentária, porém essa não parece ser uma forma importante de transmissão, visto que dentistas não apresentam risco aumentado de portarem a bactéria. A cavidade oral poderia servir como fonte de re-infecção, em razão de a placa dentária impedir a ação da antibioticoterapia sobre esse patógeno(67).

Por fim, outro meio de transmissão pode ocorrer através da contaminação gastro-oral, já que estudos demonstram que o *H. pylori* pode ser recuperado do suco gástrico, regurgitação e vômito (68). Fortes evidências a favor dessa rota de transmissão são as epidemias de gastrites pelo *H. pylori* em voluntários que sofreram sondagem gástrica em experimentos, as transmissões da infecção por endoscópios mal desinfetados, e a maior prevalência da infecção entre gastroenterologistas, especialmente entre aqueles que, no passado (antes de 1983), realizavam endoscopias sem a utilização de luvas e com antigos endoscópios, nos quais o canal de biópsia era próximo da boca do examinador (63). Portanto, as evidências sugerem que qualquer meio que permita ao *H. pylori* alcançar o estômago, pode potencialmente ser um meio de transmissão deste patógeno.

2.2.3 Diagnóstico da infecção por *H. pylori*

Os testes diagnósticos para o *H. pylori* podem ser invasivos ou não invasivos em razão da utilização ou não de procedimento endoscópico, respectivamente (69). Os aspectos endoscópicos da mucosa gástrica não são suficientes para determinar a presença do mesmo. A pesquisa da bactéria é onerosa e somente deve ser realizada quando houver indicação para o procedimento (70).

Métodos diagnósticos invasivos

O teste considerado padrão-ouro para o diagnóstico do *H. pylori* é o exame histológico de biópsias gástricas, por apresentar a melhor especificidade e sensibilidade (38, 70). As colorações com melhor desempenho para avaliar o processo inflamatório e identificar a bactéria são as técnicas de Genta e Giemsa (71).

O exame histológico revisado por patologista especializado tem demonstrado sensibilidade de 98,8% e especificidade de 100%. A análise do corpo gástrico é importante após o tratamento, especialmente se estiverem sendo utilizados fármacos inibidores da bomba de prótons, situações em que ocorre a migração do microrganismo do antro para o corpo gástrico e o número de bactérias pode ser pequeno (72, 73).

Outra técnica com biópsia gástrica é o teste rápido da urease, que consiste na adição de fragmentos de mucosa gástrica em frasco com ureia e corante sensível ao pH. Se a biópsia gástrica estiver infectada por *H. pylori*, a urease produzida pela bactéria irá transformar ureia em amônia, com alcalinização do meio e consequente modificação da cor do indicador. Embora

seja um método dependente da carga bacteriana, o teste apresenta especificidade e sensibilidade de aproximadamente 90%, sendo uma excelente alternativa, especialmente em razão do baixo custo (74).

A cultura de biópsia gástrica é menos sensível e de alto custo, sendo utilizada para determinar a sensibilidade bacteriana aos antibióticos, mas não é utilizada na rotina diagnóstica do *H. pylori*. Outra vantagem deste método é o isolamento da cepa, favorecendo a aplicação de técnicas moleculares para fins de caracterização da mesma (47).

As exigências nutricionais da bactéria são limitantes para o sucesso de seu crescimento *in vitro*. Tradicionalmente, o patógeno é isolado em meios sólidos ou líquidos comumente empregados, como agar chocolate, ou agar Mueller-Hinton enriquecidos com sangue ou soro (75, 76). Mais recentemente, inovações e suplementos comerciais vêm sendo sugeridos na tentativa de aumentar a sensibilidade do método (77).

Métodos diagnósticos não-invasivos

Testes sorológicos pesquisam anticorpos contra o *H. pylori* e são relativamente sensíveis e específicos, podendo ser aplicados em consultórios (adaptados para sangue total) (69). Seu papel na confirmação da cura da infecção é limitado porque os títulos dos anticorpos permanecem positivos por longos períodos de tempo (geralmente mais de 2 anos) após a erradicação da bactéria (78, 79).

Testes respiratórios com ureia marcada com Carbono 13 ou 14 são muito utilizados. Quando um indivíduo infectado pelo *H. pylori* ingere isótopo (carbono 13 ou 14) ligado à ureia, essa é catalisada pela urease bacteriana,

assim, formando amônia que, ao ser metabolizada, produz dióxido de carbono, o qual é liberado na circulação e detectado no ar exalado (47). Este teste apresenta bons resultados, embora falsos negativos possam ocorrer quando houver uma pequena quantidade de bactérias no estômago (80), indicando-se então este teste para identificação inicial do *H. pylori* e controle de erradicação (78).

Um estudo multicêntrico utilizando o teste respiratório com ureia marcada apresentou bons resultados, ou seja, 0,1% dos resultados foram inconclusivos e o tempo médio para execução do exame foi entre 10-13 minutos (81). Apesar de ser rápido e de fácil realização, este método ainda requer alto investimento financeiro e os estudos de análise econômica não são consistentes suficientemente para justificar sua implementação na prática diária (82).

O desenvolvimento de um teste, que detecta antígenos fecais do *H. pylori*, demonstrou boa sensibilidade e especificidade, além de ser não-invasivo e simples (78, 83-85). Esta metodologia igualmente tem se mostrado útil para o diagnóstico de *H. pylori* em pacientes pediátricos (86) e se apresentado custo-efetivo (87).

2.2.4 Fatores de virulência e colonização

A maioria dos indivíduos infectados pela *H. pylori* desenvolvem somente gastrite assintomática, enquanto uma proporção menor desenvolve doenças graves, incluindo úlcera péptica e câncer gástrico e linfoma MALT (88). A literatura aponta que tanto a permanência da bactéria no epitélio gástrico quanto as lesões por ela ocasionadas são favorecidas pela presença de fatores de virulência deste patógeno (Tabela 2) e as sofisticadas interações entre ele e

seu hospedeiro (89). A seguir, discorreremos brevemente acerca de alguns deles:

Flagelos

A motilidade, conferida pelos flagelos, é o que permite à bactéria atravessar rapidamente a camada viscosa de muco que reveste o estômago, atingindo a superfície epitelial e as criptas (47). Este mecanismo, essencial para favorecer a colonização, está localizado em um dos pólos da bactéria, em número de até seis, sendo que os mesmos são constituídos por dois tipos de filamentos codificados pelos genes *flaA* e *flaB* (90).

Tabela 2 Proteínas de *H. pylori* envolvidas na colonização e patogênese do epitélio gástrico humano.

Produto	Genes	Funções desempenhadas
Urease ^a	<i>ure</i>	Neutralização do pH gástrico, fonte de nitrogênio e dano à mucosa
NixA	<i>nixA</i>	Absorção de Ni ²⁺ para a função da urease
Flagelos ^a	<i>flaA, flaB, flgE, flbA</i>	Motilidade bacteriana
Adesinas	<i>hpaA</i> e outros	Aderência ao epitélio gástrico
Superóxido dismutase	<i>sod</i>	Resistência aos fagócitos
Catalase	<i>katA</i>	Resistência aos fagócitos
HP-NAP	<i>napA</i>	Ativação de neutrófilos
Proteínas de choque térmico	<i>hspA, hspB^b</i>	Chaperoninas; absorção de Ni ²⁺

^a produto essencial para a colonização bacteriana

^b produto essencial para a sobrevivência bacteriana

Adaptado de Dunn, BE *et al.* in *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*, 1997. **10**(4): p.727

Urease

A urease, uma enzima que tem por finalidade hidrolisar a ureia em amônia (NH₃) e CO₂, produzindo além de um efeito citopático sobre as células epiteliais, a elevação do pH gástrico, o que favorece sua colonização e a

persistência da infecção, uma vez que seu crescimento ótimo é exibido em pH entre 6,0 e 7,0 (47).

A produção desta enzima é um estímulo potente para ativação de fagócitos mononucleares e para a produção de citocinas inflamatórias (91). *In vitro*, a atividade da urease também se mostrou um agente tóxico às células do epitélio gástrico humano (92). Desse modo, a produção de urease pelo patógeno parece ser um fator tanto de virulência quanto de colonização para a manutenção do mesmo (47).

Catalase e superóxido dismutase

Fatores de virulência adicionais incluem as enzimas extracelulares catalase e superóxido dismutase as quais conferem resistência aos mecanismos líticos oxidativos dos fagócitos polimorfonucleares (47).

Os genes que codificam estas enzimas no *H. pylori* demonstram uma homologia significativa com os mesmos genes de microrganismos patogênicos intracelulares. Tal característica é sugestiva de uma resistência maior à ação fagocítica mencionada (93).

Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico, do inglês *heat shock protein* (Hsp), são fundamentais para a manutenção da sobrevivência de *H. pylori* (47). Tais proteínas são codificadas por sequências altamente conservadas, o que sugere que as mesmas não podem ser modificadas sem que seja afetada a função da proteína (94). A HspB possui a função de chaperona, dando sustentação estrutural para a urease, enquanto que a HspA está envolvida na absorção de

níquel. A ação de ambas as proteínas tem por finalidade aumentar a atividade da urease, enzima igualmente de grande importância para a colonização bacteriana (47, 95).

Além dos mecanismos supramencionados, nos últimos anos intensificou-se a pesquisa de marcadores de patogenicidade na tentativa de detectar linhagens bacterianas associadas a cada uma das doenças. Estudos têm correlacionado a patogenicidade de *H. pylori* com dois genes principais: *cagA* e *vacA* (96).

VacA

Além de induzir a formação de vacúolos nas células epiteliais (97), a citotoxina *VacA* possui: 1. a habilidade de induzir várias atividades celulares com a formação de um canal de membrana; 2. liberar o citocromo C da mitocôndria, favorecendo a apoptose; e 3. se ligar a receptores de membrana, contribuindo na ativação da resposta pro-inflamatória (96, 98).

Estudos também demonstraram a capacidade de *VacA* de produzir efeitos prejudiciais diretos nas células da mucosa gástrica, como a alteração do citoesqueleto, estrutura fundamental no processo de migração e proliferação celular, impedindo a reconstrução do epitélio gástrico, processo essencial na cura da úlcera. A *VacA* também promove a indução da apoptose celular (99, 100). Outros efeitos observados são a inibição da ativação e da proliferação dos linfócitos T, e a modulação da resposta a citocinas mediada por células T. Desta forma a proteína *VacA* é uma potente toxina imunossupressora, tendo como alvo o sistema imune adaptativo (101). Willhite e Blaque (2004) demonstraram que isolados clínicos infectados por linhagens com genótipo

vacAs1m1 tem a capacidade de mediar a formação de canais de ânion seletivos e a intoxicação celular, o que resulta em redução do potencial transmembrana das mitocôndrias e liberação de citocromo C, induzindo apoptose (102).

CagA

CagA é o fator de virulência de *H. pylori* mais extensivamente estudado, o qual é codificado pelos genes situados na ilha de patogenicidade *CagA*, conhecida também como *cagPAI* (89). Existem dois tipos de isolados clínicos bacterianos: as cepas produtoras de *CagA* (*cagA* positivos) e os não-produtoras de *CagA* (*cagA* negativos) (88).

Em meados da década de 1990, o sequenciamento de *cagPAI* de uma série de cepas de *H. pylori* possibilitou a descoberta de que o mesmo representa um elemento de inserção de 40 kb no cromossomo bacteriano e que é formado por 32 genes. Os estudos realizados nos últimos anos também demonstraram que *cagPAI* codifica o sistema de secreção do tipo IV, do inglês, *type-IV secretion system* (T4SS), o qual possibilita a injeção da proteína *CagA* dentro da célula do hospedeiro aonde a mesma parece interferir com múltiplas cascatas de sinalização celular do hospedeiro (103, 104). Dessa maneira, a proteína *CagA* serve de marcador para as cepas que expressam os genes da ilha de patogenicidade *cagPAI* (105, 106).

O sucesso de todo o maquinário do sistema T4SS bem como de todos os eventos desencadeados pelo mesmo (figura 2), deve-se, em grande parte, à existência de adesinas bacterianas, a saber, *BabA/B*, *SabA*, *AlpA/B*, *OipA* e *HopZ*. *BabA* e *SabA* as quais possuem a capacidade de se ligar ao antígeno do

grupo sanguíneo e a proteínas sializadas, respectivamente; enquanto que uma série de componentes de T4SS como CagI, CagL, CagY e CagA têm mostrado uma interação com o receptor-alvo integrina $\beta 1$ seguido da injeção de CagA bacteriano através da membrana da célula hospedeira (89).

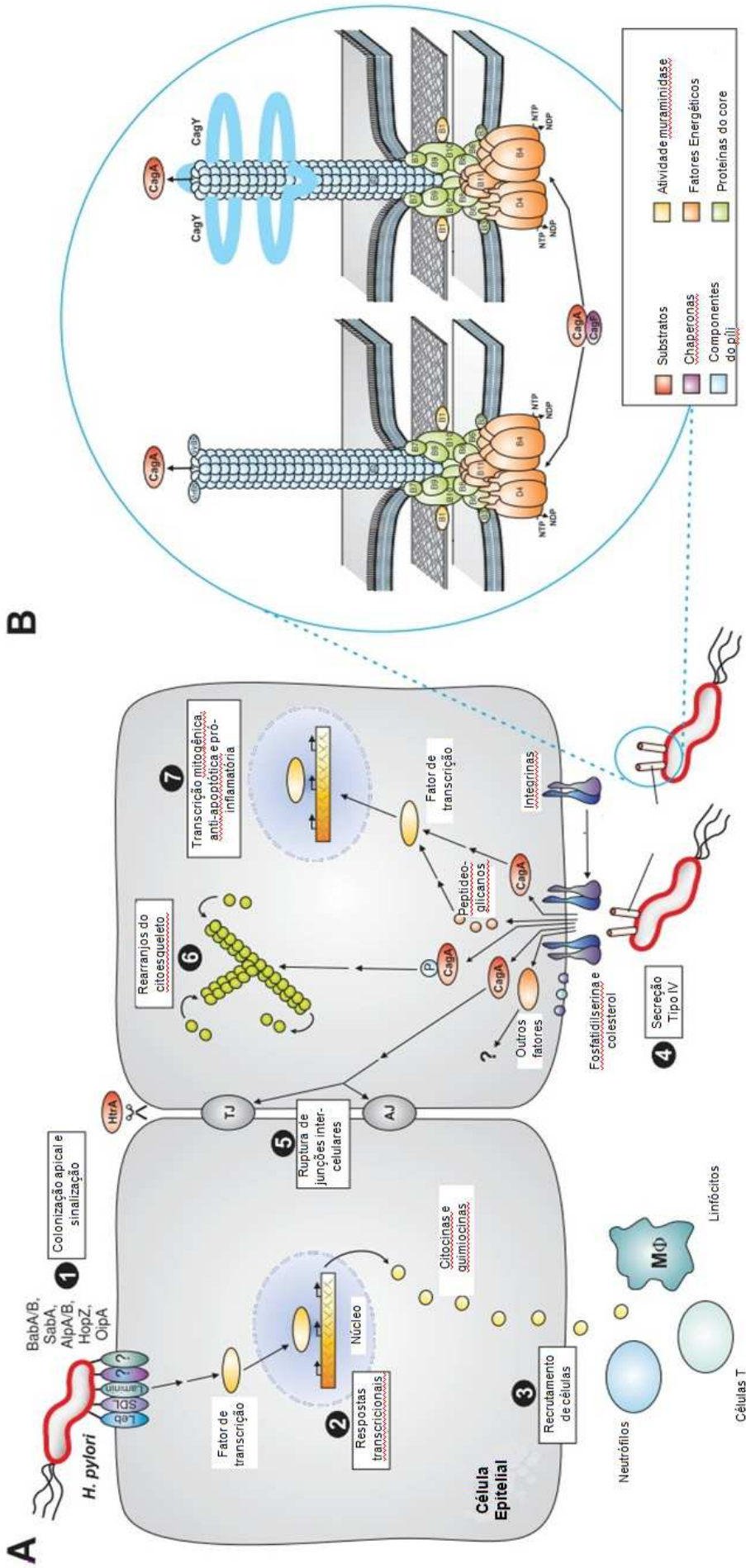


Figura 2. Interação entre *H. pylori* e células do epitélio gástrico sinalizando o papel das adesinas e do sistema de secreção do tipo IV, codificado pelo *cagPAI*. (A) (1) As adesinas de *H. pylori* intermediam sua ligação apical com receptores conhecidos e desconhecidos do epitélio gástrico e também provavelmente com sinais de transdução diretos conforme indicado. (2) A ativação de fatores transcricionais como NF- κ B leva a uma produção de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas. (3) A secreção de mediadores nas superfícies basolaterais ataca as células do sistema imune no sítio da infecção. (4) Em contacto célula hospedeira, *H. pylori* monta o T4SS em sua superfície permitindo a transferência de moléculas, CagA e peptídeoglicanos, a partir do citoplasma bacteriano para o interior da célula hospedeira. As proteínas de *cagPAI* (CagA, CagI, CagL e CagY) interagem com receptores de integrina. Interações com fosfatidilserina (PS) e colesterol de lipídios também integram os processos de T4SS. T4SS e CagA estão envolvidos em vários efeitos celulares que incluem a disrupção das junções celulares (5), rearranjos de citoesqueleto (6) e sinalização nuclear (7). (B) Têm sido hipotetizados dois modelos para o funcionamento do maquinário do sistema T4SS: o modelo 1 assume a participação das proteínas VirB1-11, do fator de acoplamento VirD4 e de fatores acessórios como CagF; enquanto que o modelo 2 incorpora a participação de moléculas de CagY (VirB10) no revestimento do pili bacteriano e a exclusão de VirB5. Adaptado de Backert S et AL in Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal*, 2011.

As cepas positivas para CagA são consideradas produtoras de inflamação de maior intensidade, dispepsia, gastrites atróficas e adenocarcinoma, uma vez que induzem a secreção de interleucina 8 (IL-8) (88). A ilha de patogenicidade *cagPAI*, aonde se situa o gene *cagA*, parece estar envolvida na indução de produção de IL-8 no epitélio gástrico, enquanto que, em contraste, alguns estudos tenham demonstrado que a proteína não estaria causando a indução de IL-8 (103, 107). Outro achado relevante considerando o aumento de secreção desta interleucina é que, aparentemente, cepas do leste asiático *cagA* positivas, localidade onde existe uma prevalência consideravelmente maior de adenocarcinoma gástrico, teriam um potencial maior de causar essa indução de IL-8 quando comparadas às cepas *cagA* positivas ocidentais (108).

O gene *cagA* também é responsável pela remodelação da superfície celular e formação de pedestal, fosforilação de tirosinas em proteínas das células do hospedeiro, ativação do fator transcricional AP-1 e expressão de proto-oncogenes. Por essa razão, a produção dessa proteína tem sido

associada à progressão das doenças gastrointestinais e a presença do gene é considerada um marcador de virulência (109, 110). Parsonnet et al. (1997) demonstraram que pacientes infectados por linhagens mais virulentas (*cagA* positivas) teriam um risco 3 vezes maior de desenvolver câncer gástrico (111).

Do mesmo modo, um estudo recente de caso-controle realizado em Porto Alegre, identificou, através de reação em cadeia da polimerase, uma prevalência de 90% de positividade para *CagA* em um grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico infectados por *H. pylori* frente a uma frequência de aproximadamente 42,5% no grupo controle também infectado pelo patógeno mencionado. Tal achado corrobora a associação entre a presença do fator de virulência *CagA*, com a ocorrência de adenocarcinoma gástrico, denotando um risco de 3,95 vezes maior de desenvolvimento de câncer gástrico em indivíduos portadores de *H. pylori CagA* positivas (112).

Contudo, estudos sorológicos igualmente têm se demonstrado como ferramentas úteis na caracterização da virulência bacteriana através de métodos imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-*CagA* (113, 114).

A detecção de anti-*CagA* está presente em cerca de 45% dos pacientes com úlcera péptica (114). Da mesma forma, um estudo epidemiológico populacional alemão demonstrou através da pesquisa de anticorpos anti-*CagA* uma prevalência similar, enfatizando, sobretudo, uma maior frequência de infecção pela cepa mais virulenta em mulheres jovens (com idade inferior a 30 anos) (115).

Em contraponto, den Hoed e colaboradores (2011) demonstraram que a prevalência de infecção por *H. pylori CagA* positivas parece ser variável e até

mesmo sugerem que, de acordo com outros autores, a cepa mais virulenta estaria “desaparecendo” em países ocidentais (116).

2.3 Proteína C Reativa

As proteínas reagentes de fase aguda compartilham a propriedade de apresentarem elevações nas concentrações em resposta a situações de estresse ou condições inflamatórias que ocorrem nas infecções, traumatismos, cirurgias, lesões ou em outras necroses teciduais. Dentre esses marcadores inflamatórios, destaca-se a proteína C reativa (PCR), o qual é o reagente de fase aguda mais sensível (117).

A PCR é produzida através da expressão de seu gene nos hepatócitos em resposta ao estímulo de citocinas – IL-6 e IL-1 β - e consiste em uma molécula de cinco cadeias polipeptídicas idênticas totalizando um anel de massa molar de 120.000 Daltons, com um substancial conteúdo de carboidratos (118, 119). Trata-se de um marcador com meia vida longa (19 horas) e com facilidade de mensuração através dos métodos de nefelometria, precipitações, radioimunoensaio e imunoturbidimetria, quimioluminescência e eletro quimioluminescência. Os ensaios padronizados precisos e de alta sensibilidade propiciam resultados semelhantes tanto para material fresco, armazenado ou congelado (120).

Esse constituinte sérico foi descoberto por Tillett e Francis na década de 1930 devido à interação do soro de pacientes que haviam se recuperado de infecções pneumocócicas com o polissacarídeo C dessa bactéria. Foi observado que a PCR encontra-se no soro de pacientes com distúrbios

diversos, se elevando, de maneira notável, sempre que houver necrose tecidual (121).

Fatores como idade, tabagismo, consumo de álcool, dieta hiperproteica, consumo de café, resistência insulínica, sedentarismo, hipertensão e hipertrigliceridemia são responsáveis por dosagens elevadas da PCR. Anticoncepcionais orais e reposição hormonal contendo estrógenos também podem contribuir para a elevação da concentração sérica desta proteína de fase aguda (122-124).

A PCR humana além de possuir alta afinidade por resíduos de fosfocolina também é capaz de se ligar a uma série de outros ligantes autólogos e extrínsecos, a saber: lipoproteínas plasmáticas modificadas, membranas celulares danificadas, células apoptóticas, além de componentes capsulares e somáticos de microrganismos incluindo bactérias, fungos e parasitas (125).

Uma vez agregada aos ligantes macromoleculares, a PCR humana é reconhecida pela C1q, fato que é capaz de promover a ativação do sistema complemento, engajando C3, a principal molécula de adesão do sistema complemento, ao complexo terminal de ataque à membrana, C5-C9. A PCR ligada é capaz de disponibilizar sítios secundários de ligação para o fator H e, através disto, regular uma via alternativa de amplificação e convertases C5 (125, 126).

Os efeitos secundários da PCR que se seguem à ligação são semelhantes a algumas propriedades-chave dos anticorpos, sugerindo que, sob algumas circunstâncias, a PCR possa contribuir na defesa do hospedeiro diante de um quadro infeccioso, realizando a função de um mediador

proinflamatório e participando no manejo fisiológico e patofisiológico dos constituintes autólogos. Além do mais, a conservação estrutural da PCR com suas respectivas habilidades são fatores que reforçam o valor que teve essa proteína para a evolução da espécie humana (125).

Na maioria das doenças, o valor de PCR circulante é capaz de refletir a inflamação e/ou dano tecidual de forma mais acurada do que outros parâmetros laboratoriais de resposta de fase aguda, como viscosidade plasmática e a velocidade de sedimentação eritrocitária. É importante salientar também que esta proteína não sofre variações ao longo do dia, caracterizando-se como um marcador inflamatório não-específico cuja dosagem contribuem de forma significativa em situações como i. *screening* para doenças orgânicas; ii. Monitoramento da resposta ao tratamento e infecção; e, iii. detecção de infecções intercorrentes em imunossuprimidos e nas doenças caracterizadas por pouca ou nenhuma resposta de fase aguda, como é o caso das doenças auto-imunes (118, 125).

Mais recentemente, esse marcador, apesar de sua inespecificidade, tem sido associado pelos cardiologistas como um marcador do processo inflamatório relacionado à formação de placas ateroscleróticas que culminam em diferentes eventos cardiovasculares (124, 127-130).

Dentre os estudos existentes, destaca-se o estudo duplo-cego, multicêntrico JUPITER, o qual incluiu 17.802 indivíduos saudáveis com níveis séricos de colesterol inferiores a 130 mg/dL e PCRus iguais ou superiores a 2,0 mg/L randomicamente selecionados para receber rosuvastatina ou placebo. Apesar de algumas limitações, este estudo foi capaz de enfatizar a importância da PCR como preditor de risco para doença cardiovascular (129, 130).

Sabe-se que a PCR induz a expressão de inúmeras moléculas de adesão pelas células endoteliais, intermedia a oxidação e captação de LDL pelos macrófagos endoteliais, estimula o recrutamento de monócitos na parede arterial, contribuindo no aumento de material necrótico e oxidado entre as camadas íntima e a média dos vasos arteriais. Além disso a PCR é capaz de induzir a produção de fatores teciduais pró-trombóticos pelos macrófagos, estabelecendo uma conexão entre as vias inflamatórias e as da coagulação (131, 132).

Em relação a este analito e a infecção por *H. pylori*, alguns dados revelam que após a erradicação do agente infeccioso os níveis de PCR diminuíram significativamente(133, 134).

Um estudo clínico demonstrou que a erradicação do *H. pylori* reduz significativamente a obstrução do lúmen das artérias coronárias, além de que, corrobora a hipótese de uma forte relação entre cepas CagA positivas e doença cardiovascular (135). Outro estudo ainda compara a infecção crônica por *H. pylori*, citomegalovírus e *Chlamydomphila pneumoniae*, dentre os quais, apenas o primeiro mostrou uma associação com aterogênese através da alteração do perfil lipídico de sujeitos saudáveis (136).

Considerando a influência da virulência bacteriana expressada através do gene *cagA* na alteração sérica da PCR, um estudo de Jafarzadeh e colaboradores (2009) foi um dos precursores na avaliação de uma possível associação entre ambos fatores. Através da comparação realizada entre um grupo de pacientes com úlcera péptica *H. pylori* positivos, portadores assintomáticos de *H. pylori* e controles assintomáticos não infectados pela bactéria foi observado um aumento significativo de PCRus no grupo portado do

patógeno, independentemente de qual fosse o status de virulência bacteriana (137)

Igualmente, considerando a relação entre o patógeno, sua virulência e o risco para o infarto agudo do miocárdio, Singh (2002) e colaboradores demonstraram a existência de uma associação positiva entre a soropositividade para anti-CagA e o desenvolvimento de doença coronariana ($p=0,022$), especialmente em se tratando de homens de raça branca de meia idade (127).

Um estudo realizado em uma população de idosos dispépticos demonstrou que a positividade para o microrganismo não teria relação com a presença de lesões ateroscleróticas, tampouco com os fatores de risco e dosagem de perfis metabólicos e lipídicos relacionados a doenças cérebro e cardiovasculares. Dentre as variáveis analisadas, a presença da bactéria pareceu estar associada a uma maior frequência de úlcera péptica, mas não com a prevalência de lesões ateroscleróticas extracardíacas (138).

Outros achados ainda corroboram essa última hipótese, nos quais, entre outros parâmetros, os níveis de PCR mostraram-se indiferentes frente à infecção por *H. pylori* (8, 139-141), sendo esta uma constatação feita independente da presença do fator de virulência CagA (142).

Um estudo realizado nos Estados Unidos com homens na faixa etária entre 40-74 anos confirmou a associação entre soropositividade para *H. pylori* e a prevalência de infarto do miocárdio no grupo de pacientes com diabetes melito. A soropositividade para *H. pylori* não foi significativamente associada à prevalência de diabetes melito ou às variáveis de síndrome metabólica. Por exemplo, as concentrações de glicose e insulina sérica no estado de jejum não

mostraram associações com a soropositividade para a bactéria no grupo de pacientes não-diabéticos. Com exceção da ferritina sérica, outros marcadores sorológicos de inflamação se mostraram indiferentes à presença de *H. pylori* (8).

Brenner e colaboradores (1999) conduziram um estudo com mais de 1.800 indivíduos saudáveis com o objetivo de acessar a relação entre a evidência sorológica da infecção com cepas CagA positivas e negativas e vários marcadores de inflamação sistêmica, dentre eles, PCR, contagem de leucócitos e albumina sérica. Embora tenha se constatado uma relação inversa entre os níveis séricos de albumina e a soropositividade para *H. pylori*, os achados referentes ao número de leucócitos e a dosagem de PCR não foram compatíveis com a hipótese de que a infecção crônica por esta bactéria desencadearia uma reação inflamatória sistêmica (142).

Embora existam divergências entre os estudos sobre interação entre bactéria, fator de virulência, marcadores sorológicos de inflamação aguda e potencial aumento no risco de eventos cardiovasculares, existe outra razão para que se prossiga o estudo a respeito do tema mencionado: a detecção do DNA bacteriano em placas ateroscleróticas humanas sugere uma participação mais do que coadjuvante do *H. pylori* no processo inflamatório que desencadeia a manifestação de eventos cardiovasculares e de alterações em marcadores laboratoriais que estejam relacionados à predição de risco para tais eventos (135, 143-145).

Adicionalmente, não existem estudos que contemplem o comportamento dos níveis séricos de PCRus em pacientes dispépticos funcionais em função da presença da bactéria, independente de seu status de virulência. Faz-se

necessário também mencionar que, com frequência, grandes estudos populacionais utilizam-se de sorologia para a determinação da infecção por *H. pylori*, metodologia esta incapaz de diferenciar atuais de passadas, o que prejudica a interpretação correta sobre a associação entre as variáveis em estudo.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 Justificativa

O estudo de marcadores, sejam estes sorológicos ou a genotipagem bacteriana, são importantes ferramentas para análises epidemiológicas, patogênicas e de suscetibilidade bacteriana. O debate existente sobre uma possível associação entre a infecção por *H. pylori*, seus fatores de virulência e as alterações inflamatórias sistêmicas decorrentes desta infecção são objetos de investigação. Da mesma forma, são escassos os trabalhos que envolvam a temática em questão estudada em uma população de indivíduos com dispepsia funcional bem caracterizada.

Assim, este estudo visa, sobretudo, investigar a relação entre infecção por *H. pylori* (e de seu fator de virulência CagA) em pacientes com dispepsia funcional, sendo esta clinicamente diagnosticada e confirmada por achados endoscópicos compatíveis, com possíveis alterações inflamatórias no epitélio gástrico e sistemicamente aferida através da dosagem dos níveis séricos de PCRus.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo Principal

Avaliar os níveis séricos de PCRus em pacientes dispépticos funcionais e a possível associação com a infecção por *H. pylori*, de acordo com a presença ou ausência de marcador sorológico da virulência bacteriana (anti-CagA).

3.2.2 Objetivos Específicos

(1) Verificar a associação da PCRus com a severidade da inflamação crônica e atividade inflamatória do epitélio gástrico de uma população de dispépticos funcionais.

(2) Verificar a associação da virulência do *H. pylori* com a severidade da inflamação crônica e atividade inflamatória do epitélio gástrico de uma população de dispépticos funcionais através dos níveis de PCRus e da revisão dos laudos de biópsia, respectivamente.

4. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Estudo transversal para avaliação da relação dos níveis séricos de PCRus em pacientes com DF infectados ou não por *H. pylori* com sorologia positiva ou negativa para anti-CagA.

Amostra e amostragem

Foram avaliados pacientes dispépticos funcionais oriundos do ensaio clínico HEROES (*Helicobacter Eradication Relief of Dyspeptic Symptoms*) previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob protocolo nº 05-422.

Para o cálculo do tamanho amostral foi estimada uma prevalência de 60% do patógeno em questão na população investigada. Para atingir poder de 90% e significância de 5%, detectar uma diferença de 1mg/L e um desvio padrão de $\pm 2,8$, o somatório dos extratos de pacientes deste estudo deveria totalizar 348 pacientes, sendo que destes, 209 positivos para *H. pylori*.

Crêterios de inclusão

Foram incluídos pacientes com mais de 18 anos de idade, que preencheram os cr terios clínicos de dispepsia funcional segundo o Consenso Roma III, que devem incluir um ou mais dos seguintes sintomas: A. Plenitude pós-prandial desconfortável; B. Saciedade precoce; C. Dor epigástrica; D. Queima o epigástrica. Os pacientes não podiam apresentar nenhuma evidência de doenças estruturais (incluindo endoscopia digestiva alta) que pudessem explicar os sintomas. Foram incluídos pacientes que apresentaram achados endoscópicos normais ou apenas com gastrite conforme a classifica o endoscópica de Sydney (146).

Crêterios de exclusão

Foram excluídos pacientes com as seguintes características:

- Ausência de sintomas dispépticos nos 30 dias antecedentes   avalia o para inclusão no estudo, ou escore de sintomas dispépticos menor do que 15, do Questionário Porto Alegre de sintomas dispépticos (PADYQ);
- Pirose ou regurgita o frequentes;
- Sintomas exclusivos da Síndrome do Intestino Irritável;
- Passado de úlcera péptica;
- Passado de cirurgia esofágica ou gastroduodenal;
- Tratamento prévio para o *H. pylori*;
- Utiliza o de antibióticos ou sais de bismuto nas últimas quatro semanas e inibidores da bomba de prótons (IBP) nas 2 semanas antecedentes   endoscopia digestiva alta inicial;

- Achados endoscópicos que pudessem justificar a presença de sintomas gastrintestinais, tais como esofagite, esôfago de Barrett, doença péptica ulcerosa, neoplasia gastroesofágica, ou alteração anatômica cirúrgica do trato gastrintestinal superior;
- Diagnóstico prévio de doenças sistêmicas ou uso de medicamentos que reconhecidamente interfiram na motilidade ou sensibilidade do trato gastrintestinal alto e que pudessem desenvolver sintomas dispépticos, direta ou indiretamente (através do seu tratamento), tais como diabete melito, esclerose sistêmica progressiva, tireoideopatias, dentre outras;
- Manifestações clínicas de doenças orgânicas (“sinais de alerta”): anorexia, disfagia, sangramentos, perda ponderal superior a 10% do peso corporal e anormalidade no exame físico sugestivas de doenças orgânicas;
- Presença de comorbidades significativas (hepatopatias, cardiopatias, nefropatias e neuropatias);
- Gestaçãõ (diagnóstico prévio) ou mulheres em idade fértil que não utilizassem métodos contraceptivos seguros;
- Nível intelectual reduzido que inviabilizasse a adequada compreensão dos objetivos do estudo;
- Não aceitação em participar do estudo e/ou em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Procedimentos endoscópicos

Foi realizado com videoendoscopia (GIF-100, Olympus Co). Depois de jejum mínimo de 8 horas, os pacientes foram sedados por via intravenosa de

acordo com a respectiva idade, peso e tolerância ao fentanil ou mepiridina e midazolam. Os pacientes foram biopsiados de acordo com o descrito abaixo. As amostras colhidas foram utilizadas para pesquisa de *H. pylori* por duas metodologias distintas: histologia e teste rápido da urease.

Avaliação de H. pylori

Foram coletadas três biópsias do antro, duas da *incisura angularis* e 3 do corpo gástrico. Uma amostra do antro, uma do corpo e uma da incisura foram utilizadas para o teste rápido da urease e as demais amostras foram utilizadas para estudo histológico. As amostras histológicas foram coradas pelas técnicas de GIEMSA e H&E, e a severidade da gastrite, graduada de acordo com as modificações de Houston do Sistema de Sydney (146).

Os espécimes de biópsias foram analisados por dois patologistas independentes, especializados e desconhecedores de qualquer informação clínica ou endoscópica. Divergências nos resultados foram resolvidas por um terceiro patologista sem o conhecimento prévio da amostra em questão.

A positividade do *H. pylori* foi considerada quando o teste histológico e o teste rápido da urease foram positivos para a presença da bactéria.

Determinação dos níveis séricos de PCR

Aproximadamente 10 ml de sangue total foram colhidos de cada paciente e, após centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos, as amostras de soro foram aliquotadas e armazenadas em ultrafreezer - 80°C para posteriormente serem empregadas nas determinação dos parâmetros utilizados por este estudo.

A dosagem de PCRus (Cardiophase® hsCRP Dade Behring) foi realizada através de imunonefelometria no Laboratório de Patologia Clínica do HCPA. O limite inferior de detecção foi estabelecido em 0,17 mg/L, e o intervalo de leitura foi de 0,175-1100 mg/L de acordo com as instruções do fabricante.

Determinação do status para CagA

A determinação do fator de virulência CagA foi realizada através de pesquisa sorológica de anticorpos anti-CagA utilizando-se um kit comercial CagA IgG EIA WELL (Radim, Itália), de acordo com as instruções do fabricante.

O princípio desse teste é a utilização de enzimaensaio do tipo sanduíche, seguido de detecção colorimétrica. Durante a primeira incubação, as amostras contendo anti-CagA IgG, se existirem, ligam-se ao antígeno CagA que está impregnado nos poços. Um ciclo de lavagem é realizado para retirar o material que não está conjugado. Em seguida, um segundo anticorpo (anti-IgG humano conjugado com peroxidase) liga-se ao complexo CagA-antígeno-anticorpo. Após mais um ciclo de lavagem, uma solução TMB foi adicionada aos poços e sua reação com a enzima peroxidase resultará em um composto cuja intensidade de cor será medida por espectrofotometria a 450 e 405 nm. A intensidade de cor formada será proporcional às concentrações de anti-CagA presente nos calibradores e amostras. Salientamos ainda que os testes foram realizados em duplicata a fim de assegurar a precisão e exatidão dos resultados. Os resultados foram considerados positivos se, ao espectrofotômetro, as amostras apresentassem valores superiores a 15 RU/MI.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi criado um banco de dados no programa Excel, e este, posteriormente analisado pelo programa SPSS v. 18.0. Os dados foram apresentados através de média ou mediana (percentil 25-75). Variáveis quantitativas foram inicialmente analisadas de acordo com a distribuição Gaussiana e acessadas com teste t de Student ou ANOVA *one way* (paramétricas), Mann-Whitney e Kruscal-Wallis (não paramétricas). Variáveis categóricas foram descritas por suas frequências absolutas e relativas e analisadas utilizando o teste qui-quadrado e de resíduos ajustados. O nível de significância estabelecido para o P foi 0,05.

6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foi obtido consentimento informado (TCLE) assinado de todos os participantes do estudo (Anexo 12.1) antes de qualquer intervenção na população estudada.

O projeto de pesquisa e o TCLE foram encaminhados para avaliação no Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre obtiveram deferimento sob protocolo 07-547 e 05-422, respectivamente.

7. RESULTADOS

As características sociodemográficas dos pacientes dispépticos funcionais estão demonstradas na Tabela 3. Na população estudada, a taxa de prevalência da infecção por *H. pylori* foi de 63,3%. Dos pacientes *H. pylori* positivos, 42,8% apresentaram anticorpos ao fator de virulência CagA.

Dentre os achados relevantes deste estudo, destacam-se: i. uma maior prevalência do *H. pylori* na população com escolaridade inferior a nove anos e ii. não foi observada associação entre a frequência da infecção por *H. pylori* e sexo, raça, tabagismo e consumo de álcool.

Além disso, os participantes foram questionados sobre o hábito de consumir chimarrão (*Ilex paraguariensis*) e, dentre os pacientes dispépticos funcionais que referiram consumo da bebida, 45,3% apresentaram positividade para *H. pylori* ($p = 0,006$).

Na Tabela 4 encontram-se os dados relacionados ao status inflamatório sistêmico (PCRus) e local (inflamação e atividade inflamatória do epitélio gástrico) com o status de infecção por *H. pylori* e virulência bacteriana. De modo geral, foi observada uma alta associação entre a presença de anti-CagA e elevada inflamação e atividade inflamatória no epitélio gástrico ($p < 0,001$). Considerando o marcador de inflamação sistêmica elencado para este estudo, não foi observado relação entre a PCRus e inflamação ($p = 0,508$) e atividade inflamatória ($p = 0,339$) na população investigada de pacientes dispépticos funcionais.

TABELA 3

Características sociodemográficas e estilo de vida de pacientes dispépticos funcionais de acordo com a positividade para *H. pylori* e com o fator de virulência CagA

	n	Idade média (DP)	%Mulheres	%Raça branca	% Escolaridade ≥ 9 anos	% Fumantes			%Consumidores de álcool
						Fumantes	Ex-fumantes	Nunca fumaram	
<i>H. pylori</i> (-)	165	46,4 (14,7)	83,0	80,6	68,9	16,8	23,0	60,2	6,2
<i>H. pylori</i> (+)	324	46,1 (12,8)	82,4	77,2	57,5	19,2	20,8	60,1	8,8
valor-p ^c		0,794	0,964	0,448	0,020		0,746		0,593
anti-cagA negativos	111	44,3 (13,1)	83,8	79,3	59,6	18,3	22,0	59,6	7,3
anti-cagA positivos	83	45,1 (12,6)	75,9	75,9	52,4	17,1	24,4	58,5	11,0
Dado indisponível	130	47,3 (13,8)	84,1	78,6	64,6	18,8	20,5	60,8	7,3
p ^a		0,680	0,236	0,700	0,398		0,920		0,634
p ^b		0,102	0,208	0,834	0,125		0,960		0,640
Total	489	46,2 (13,5)	82,6	78,3	61,4	18,4	20,5	60,1	7,9

DP: desvio padrão

n: número de indivíduos

^a Não foram considerados os dados indisponíveis (utilizados teste t de Student para variáveis contínuas e qui-quadrado para as variáveis categóricas)

^b Foram considerados os dados indisponíveis (utilizado teste ANOVA one-way para variáveis contínuas e qui-quadrado para as variáveis categóricas)

^c Utilizado teste t de Student para variáveis contínuas e qui-quadrado para as variáveis categóricas

TABELA 4

Status inflamatório local e sistêmico de acordo com a presença da infecção por *H. pylori* e fator de virulência cagA

		<i>H. pylori</i> (+) (%)		<i>H. pylori</i> (-) (%)	p ^a
		cagA (-) n=111	cagA (+) n=83	n=165	
PCRus (mg/L)	Mediana (percentil 25-75)	1,65 (0,69 – 3,94)	1,46 (0,71 – 3,5)	1,39 (0,71 – 3,04)	0,817
Inflamação - n(%)	Ausente	0 (0,0)	0 (0,0)	88 (54,7) ^b	<0,001
	Leve	36 (33,0)	7 (8,5)	60 (37,3) ^b	
	Moderada	71 (65,1) ^b	70 (85,4) ^b	13 (8,1)	
	Severa	2 (1,8)	5 (6,1) ^b	0 (0,0)	
Atividade inflamatória - n(%)	Ausente	0 (0,0)	0 (0,0)	145 (90,1) ^b	<0,001
	Leve	74 (67,9) ^b	16 (19,5)	9 (5,6)	
	Moderada	34 (31,2)	60 (73,2) ^b	7 (4,3)	
	Severa	1 (0,9)	6 (7,3) ^b	0 (0,0)	

^aUtilizado teste Kruskal-wallis para variáveis contínuas e qui-quadrado para variáveis categóricas

^bAssociação estatisticamente significativa, teste de resíduos ajustados, considerando um nível de significância de 5%

8. DISCUSSÃO

Recentemente, o *H. pylori* tem sido referido como um importante fator relacionado a manifestações externas ao trato gastrointestinal como, por exemplo, pelo aumento dos níveis séricos de proteína C reativa e da inflamação sistêmica, resultando em um fator de risco potencial para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (147, 148). Contudo, a relação entre a bactéria e as alterações inflamatórias por ela provocadas não parecem estar bem estabelecidas. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar uma possível associação entre a infecção por *H. pylori* e sua virulência com a resposta inflamatória sistêmica e/ou local através da dosagem de proteína C reativa sérica e a avaliação histológica da mucosa gástrica de pacientes dispépticos funcionais minuciosamente caracterizados.

Acerca da influência do patógeno no sistema imunológico do hospedeiro, um estudo publicado por Lee et al (2010) indica que a infecção por *H. pylori* ou a estimulação pelos lipopolissacarídeos bacterianos resultam em uma expressão significativamente elevada de mediadores inflamatórios que incluem fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-8, óxido nítrico e ciclooxigenase-2 (149). O mecanismo desta resposta afeta a imunidade inata através do reconhecimento de alguns constituintes microbianos conservados por receptores expressos na membrana das células do hospedeiro bem como na superfície de neutrófilos. No trato gastrointestinal, tal reconhecimento resulta na ativação de cascatas de sinalização mediadas pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B), proteína quinase ativada por mitógeno e vias de sinalização dependentes de caspase (150).

Os principais achados do nosso estudo foram: 1. Falta de associação entre os níveis séricos de PCR em pacientes dispépticos funcionais infectados por *H. pylori*, independentemente da presença do fator de virulência CagA; 2. Significativo aumento de inflamação e de atividade inflamatória no epitélio gástrico de pacientes portadores da cepa mais virulenta; 3. A alta prevalência do patógeno em pacientes com escolaridade inferior a nove anos de estudo; e 4. A alta prevalência do patógeno em pacientes que relataram o consumo o consumo de chimarrão (*Ilex paraguariensis*).

Considerando o primeiro achado supracitado, nosso estudo não concorda com alguns trabalhos que demonstraram uma associação considerável de *H. pylori* com níveis aumentados de proteína C reativa, especialmente em se tratando de cepas CagA-positivas (137). Em relação a uma possível associação entre níveis aumentados de PCR e infecção por *H. pylori*, alguns dados indicam que após a erradicação do patógeno, os níveis séricos de proteína C reativa podem mostrar uma redução significativa (133, 134). Além do mais, não existe consenso acerca deste assunto. Por exemplo, um estudo conduzido por Brenner e cols envolvendo mais de 1.800 indivíduos saudáveis não foi constatada a relação entre infecção por *H. pylori*, virulência bacteriana e marcadores inflamatórios como albumina sérica, proteína C reativa e contagem de leucócitos. Embora tenha sido observada uma relação inversa entre infecção por *H. pylori* e albumina sérica, a presença da bactéria não foi relacionada aos níveis de proteína C reativa e de contagem de leucócitos, independentemente do status para CagA (142). Tal achado também foi reportado em alguns estudos que investigaram o impacto da infecção por *H. pylori* em marcadores de inflamação sistêmica (8, 140, 141, 151).

CagA é o fator de virulência mais extensivamente investigado de *H. pylori* sendo codificado pelos genes associados da ilha de patogenicidade CagA (cagPAI) (89). Cepas que expressem a proteína CagA, a qual está presente nos isolados mais virulentos, estão tipicamente associadas com a produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente interleucina-8 (IL-8), a qual tem sido relacionada a ocorrência de úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico (88). Em nosso estudo observou-se uma associação positiva entre a infecção por cepa produtora de CagA e níveis aumentados de inflamação e atividade inflamatória no epitélio gástrico, enquanto que à análise histológica do epitélio gástrico não revelou atividade inflamatória em mais de 90% dos pacientes negativos para *H. pylori*. A maioria dos pacientes *H. pylori* negativos (54%) também não apresentaram inflamação ao exame histopatológico do epitélio gástrico.

Da mesma forma, este estudo identificou uma maior frequência da bactéria em pacientes que relataram consumo de chimarrão e escolaridade inferior a nove anos. Conforme já relatado em outras pesquisas conduzidas no Brasil, a prevalência de *H. pylori* na nossa população de estudo foi de 66%, dos quais, cerca de 60% relataram menos de nove anos de estudo. Este achado também já foi observado em outros estudos e possivelmente está associado, juntamente com o nível socioeconômico, a condições associadas a um maior risco de transmissão e infecção de *H. pylori* (53, 54).

Comportamentos e hábitos culturais igualmente parecem ter alguma relevância, do ponto de vista epidemiológico, para a transmissão de *H. pylori*. Um destes hábitos pode ser o consumo de chimarrão, uma bebida típica da região Sul do Brasil e em alguns países sul-americanos como Argentina,

Uruguai e Paraguai. O chimarrão é preparado através da infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e, apesar de possuir uma atividade anti-*H. pylori*, o mesmo foi descrito pela primeira vez em nosso trabalho como uma possível via adicional para a disseminação do microrganismo, disseminação esta, possivelmente associada à forma através da qual a bebida é servida e consumida através do compartilhamento da bomba entre diferentes indivíduos. Em relação a outros hábitos, a saber, consumo de álcool e o tabagismo, não parece existir associação entre a frequência da infecção bacteriana e tais fatores, estando estes achados em concordância com dados previamente publicados (51).

Considerando os procedimentos realizados em nosso estudo, nós reconhecemos que a proteína C reativa seja um marcador inespecífico de inflamação aguda e que sua elevação possa estar associada a diferentes condições clínicas (129, 130). Inicialmente descrita por Tillett e Francis (1930), esta proteína inflamatória possui uma importante relevância na predição do risco cardiovascular entre outras aplicações (121, 125). Embora tenhamos avaliado a inflamação sistêmica através da PCRus, acreditamos que outros marcadores sejam úteis e mais específicos para investigar esta possível relação entre a infecção por *H. pylori* e seu impacto na inflamação sistêmica. Por exemplo, alguns estudos utilizaram como ferramenta para investigar a inflamação sistêmica marcadores inflamatórios como interleucina-6 (IL-6), IL-8 e TNF- α , os quais parecem estar especialmente relacionados com a infecção por *H. pylori* (89, 152).

Além de termos observado uma relação entre infecção por *H. pylori* e inflamação e atividade inflamatória, foi percebida uma relação bastante

significativa entre estas variáveis e a presença de anticorpos anti-CagA ($p < 0,001$), embora este marcador de virulência não se tenha mostrado associado a alterações na inflamação sistêmica aferida através da dosagem sérica de PCRus. Deste modo, estudos adicionais são necessários envolvendo marcadores de inflamação aguda adicionais e mais específicos para que se possa estabelecer ou refutar a ideia de que o patógeno supracitado possa causar uma resposta inflamatória sistêmica, sobretudo em se tratando de cepas CagA-positivas.

9. CONCLUSÕES

As conclusões e considerações finais desta dissertação serão descritas de acordo com os objetivos propostos.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os níveis séricos da PCRus em pacientes dispépticos funcionais e a possível relação com a infecção por *H. pylori*, de acordo com a presença ou ausência de marcador sorológico da virulência bacteriana (anti-CagA).

Considerando a falta de consenso acerca de tal matéria na literatura médica recente, os resultados deste estudo não suportam os achados de outros autores que relataram uma associação positiva entre a infecção por *H. pylori* e o aumento dos níveis séricos de proteína C reativa, especialmente em se tratando de cepas CagA-positivas. Da mesma forma, vale ressaltar que tal investigação é inédita em uma população de pacientes com DF, a qual foi exaustivamente estudada e cujo diagnóstico foi estabelecido através de exame clínico e investigação endoscópica.

Em relação ao primeiro objetivo específico, o qual foi verificar a relação entre PCRus com a severidade da inflamação crônica e a atividade inflamatória do epitélio gástrico de uma população de dispépticos funcionais, nosso estudo não identificou associação estatisticamente significativa entre inflamação local do epitélio gástrico e níveis séricos de PCRus em pacientes com DF.

Em relação ao segundo objetivo específico, cuja finalidade foi verificar a relação entre virulência do *H. pylori* com a severidade da inflamação crônica e atividade inflamatória do epitélio gástrico de uma população de dispépticos funcionais, nosso estudo identificou uma forte associação entre atividade inflamatória aumentada e inflamação severa em pacientes infectados por cepas

mais virulentas (CagA-positivas). Tal achado está de acordo com os dados previamente publicados sobre o potencial de cepas positivas para CagA serem produtoras de inflamação de maior intensidade, dispepsia, gastrites atróficas e adenocarcinoma, uma vez que induzem uma maior secreção de IL-8.

Embora se saiba que a transmissão da bactéria se dá especialmente durante a infância, um dado relevante do ponto de vista epidemiológico em nosso estudo foi a associação estatisticamente significativa entre o consumo de chimarrão (infusão de *Ilex paraguariensis*) e a infecção por *H. pylori*. Tal achado foi descrito pela primeira vez em nosso trabalho e fomenta novas investigações acerca da temática, especialmente no sul do Brasil, aonde o consumo da bebida é frequente e as taxas de prevalência da bactéria situam-se em torno de 65-70%.

Reconhecemos ainda que, embora largamente utilizado em outros estudos com finalidade semelhante a nossa, a proteína C reativa constitui-se um marcador pouco específico para podermos inferir uma possível associação entre infecção pelo patógeno e inflamação sistêmica. Alguns estudos têm utilizados como ferramenta para avaliação da inflamação sistêmica marcadores como interleucina-6 (IL-6), IL-8 e TNF- α , os quais parecem estar especialmente relacionados à presença do *H. pylori*.

Contudo, concluímos que apesar de não termos identificado qualquer influência da bactéria nos níveis séricos de proteína C reativa, os indivíduos infectados pela cepa mais virulenta apresentaram, em sua maioria, níveis acentuados de inflamação e de atividade inflamatória no epitélio gástrico. Desse modo, incentivamos estudos adicionais com marcadores inflamatórios mais específicos para investigar a influência do patógeno e de seus fatores de

virulência como possíveis promotores de inflamação local e sistêmica, em especial, em indivíduos sem comorbidades significativas. Da mesma forma, faz-se necessária uma investigação mais apurada sobre o consumo de chimarrão como possível fator de risco para a infecção por *H. pylori*, especialmente no que se refere ao risco de re-infecção em pacientes consumidores que reportam o consumo de tal bebida.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oustamanolakis P, Tack J. Dyspepsia: organic versus functional. *J Clin Gastroenterol*. 2012 Mar;46(3):175-90.
2. Laine L, Schoenfeld P, Fennerty MB. Therapy for *Helicobacter pylori* in patients with nonulcer dyspepsia. A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med*. 2001 Mar 6;134(5):361-9.
3. Talley NJ, McNeil D, Piper DW. Environmental factors and chronic unexplained dyspepsia. Association with acetaminophen but not other analgesics, alcohol, coffee, tea, or smoking. *Dig Dis Sci*. 1988 Jun;33(6):641-8.
4. Kay L, Jorgensen T. Epidemiology of upper dyspepsia in a random population. Prevalence, incidence, natural history, and risk factors. *Scand J Gastroenterol*. 1994 Jan;29(1):2-6.
5. Sander GB, Mazzoleni LE, Francesconi CF, Balbinotto G, Mazzoleni F, Wortmann AC, et al. Influence of organic and functional dyspepsia on work productivity: the HEROES-DIP study. *Value Health*. 2011 Jul-Aug;14(5 Suppl 1):S126-9.
6. Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CF, Mazzoleni F, Uchoa DM, De Bona LR, et al. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES trial. *Arch Intern Med*. 2011 Nov 28;171(21):1929-36.
7. Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A, Stolte M. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut*. 2004 Jan;53(1):34-7.

8. Gillum RF. Infection with *Helicobacter pylori*, coronary heart disease, cardiovascular risk factors, and systemic inflammation: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Natl Med Assoc.* 2004 Nov;96(11):1470-6.
9. Jackson L, Britton J, Lewis SA, McKeever TM, Atherton J, Fullerton D, et al. A population-based epidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection and its association with systemic inflammation. *Helicobacter.* 2009 Oct;14(5):108-13.
10. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 2002 Oct 10;347(15):1175-86.
11. Geeraerts B, Tack J. Functional dyspepsia: past, present, and future. *J Gastroenterol.* 2008;43(4):251-5.
12. El-Serag HB, Talley NJ. Health-related quality of life in functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Aug 15;18(4):387-93.
13. Holtmann G, Gschossmann J, Holtmann M, Talley NJ. *H. pylori* and functional dyspepsia: increased serum antibodies as an independent risk factor? *Dig Dis Sci.* 2001 Jul;46(7):1550-7.
14. Mahadeva S, Yadav H, Rampal S, Goh KL. Risk factors associated with dyspepsia in a rural Asian population and its impact on quality of life. *Am J Gastroenterol.* 2010 Apr;105(4):904-12.
15. Mahadeva S, Goh KL. Epidemiology of functional dyspepsia: a global perspective. *World J Gastroenterol.* 2006 May 7;12(17):2661-6.
16. Shaib Y, El-Serag HB. The prevalence and risk factors of functional dyspepsia in a multiethnic population in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2004 Nov;99(11):2210-6.

17. Rabeneck L, Graham DY. *Helicobacter pylori*: when to test, when to treat. *Ann Intern Med*. 1997 Feb 15;126(4):315-6.
18. Elta GH, Behler EM, Colturi TJ. Comparison of coffee intake and coffee-induced symptoms in patients with duodenal ulcer, nonulcer dyspepsia, and normal controls. *Am J Gastroenterol*. 1990 Oct;85(10):1339-42.
19. Shankar RR, Vikram K, Ananthakrishnan N, Harish BN, Jayanthi S. Erosive gastroduodenitis and *Helicobacter pylori* infection. *Med Sci Monit*. 2003 Jun;9(6):CR222-4.
20. Hawkey CJ. Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy: causes and treatment. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996;220:124-7.
21. Hawkey CJ. Is *Helicobacter pylori* eradication useful in patients taking NSAIDs? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Aug;11 Suppl 2:S47-50; discussion S73.
22. McColl K, Murray L, El-Omar E, Dickson A, El-Nujumi A, Wirz A, et al. Symptomatic benefit from eradicating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med*. 1998 Dec 24;339(26):1869-74.
23. Talley NJ, Vakil N, Ballard ED, 2nd, Fennerty MB. Absence of benefit of eradicating *Helicobacter pylori* in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med*. 1999 Oct 7;341(15):1106-11.
24. Talley NJ, Ruff K, Jiang X, Jung HK. The Rome III Classification of dyspepsia: will it help research? *Dig Dis*. 2008;26(3):203-9.
25. Talley NJ. Therapeutic options in nonulcer dyspepsia. *J Clin Gastroenterol*. 2001 Apr;32(4):286-93.

26. Suzuki H, Matsuzaki J, Hibi T. What is the difference between Helicobacter pylori-associated dyspepsia and functional dyspepsia? *J Neurogastroenterol Motil.* 2011 Apr;17(2):124-30.
27. Fock KM. Functional dyspepsia, H. pylori and post infectious FD. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Apr;26 Suppl 3:39-41.
28. Miwa H, Watari J, Fukui H, Oshima T, Tomita T, Sakurai J, et al. Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Apr;26 Suppl 3:53-60.
29. Armstrong D. Helicobacter pylori infection and dyspepsia. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996;215:38-47.
30. Azuma T, Suto H, Ito Y, Ohtani M, Dojo M, Kuriyama M, et al. Gastric leptin and Helicobacter pylori infection. *Gut.* 2001 Sep;49(3):324-9.
31. Lankarani KB, Moghadami M, Masoumpoor M, Geramizadeh B, Omrani GR. Serum leptin level in patients with functional dyspepsia. *Dig Liver Dis.* 2004 Nov;36(11):717-21.
32. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Suzuki S, Matsuzaki J, Hirata K, et al. Dysfunctional gastric emptying with down-regulation of muscle-specific microRNAs in Helicobacter pylori-infected mice. *Gastroenterology.* 2011 Jan;140(1):189-98.
33. Talley NJ, Walker MM, Aro P, Ronkainen J, Storskrubb T, Hindley LA, et al. Non-ulcer dyspepsia and duodenal eosinophilia: an adult endoscopic population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 Oct;5(10):1175-83.

34. Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Perez GI, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med*. 1989 Dec 7;321(23):1562-6.
35. Jonsson KA, Gotthard R, Bodemar G, Brodin U. The clinical relevance of endoscopic and histologic inflammation of gastroduodenal mucosa in dyspepsia of unknown origin. *Scand J Gastroenterol*. 1989 May;24(4):385-95.
36. Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GN. Functional gastroduodenal disorders. *Gut*. 1999 Sep;45 Suppl 2:II37-42.
37. Blum AL, Talley NJ, O'Morain C, van Zanten SV, Labenz J, Stolte M, et al. Lack of effect of treating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. Omeprazole plus Clarithromycin and Amoxicillin Effect One Year after Treatment (OCAAY) Study Group. *N Engl J Med*. 1998 Dec 24;339(26):1875-81.
38. Talley NJ, Janssens J, Lauritsen K, Racz I, Bolling-Sternevald E. Eradication of *Helicobacter pylori* in functional dyspepsia: randomised double blind placebo controlled trial with 12 months' follow up. The Optimal Regimen Cures *Helicobacter* Induced Dyspepsia (ORCHID) Study Group. *BMJ*. 1999 Mar 27;318(7187):833-7.
39. Soylu A, Dolapcioglu C, Dolay K, Ciltas A, Yasar N, Kalayci M, et al. Endoscopic and histopathological evaluation of acute gastric injury in high-dose acetaminophen and nonsteroidal anti-inflammatory drug ingestion with suicidal intent. *World J Gastroenterol*. 2008 Nov 21;14(43):6704-10.
40. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984 Jun 16;1(8390):1311-5.

41. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, et al. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J*. 1994 May;71(5):437-9.
42. Blaser MJ. Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. *Gastroenterology*. 1987 Aug;93(2):371-83.
43. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990 Jan;9(1):1-13.
44. Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect*. 1993 Dec;111(3):483-90.
45. Hunt RH. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med*. 1996 May 20;100(5A):42S-50S; discussion S-1S.
46. Strohl Wea. *Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
47. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Oct;10(4):720-41.
48. Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1987 Dec;25(12):2378-9.
49. Sullivan PB, Thomas JE, Wight DG, Neale G, Eastham EJ, Corrah T, et al. *Helicobacter pylori* in Gambian children with chronic diarrhoea and malnutrition. *Arch Dis Child*. 1990 Feb;65(2):189-91.
50. Tebbe B, Geilen CC, Schulzke JD, Bojarski C, Radenhausen M, Orfanos CE. *Helicobacter pylori* infection and chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Apr;34(4):685-6.

51. Kodaira MS, Escobar AM, Grisi S. [Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection in childhood and adolescence]. *Rev Saude Publica*. 2002 Jun;36(3):356-69.
52. Castro Lde P, Coelho LG. *Helicobacter pylori* in South America. *Can J Gastroenterol*. 1998 Oct;12(7):509-12.
53. Escobar-Pardo ML, de Godoy AP, Machado RS, Rodrigues D, Fagundes Neto U, Kawakami E. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and intestinal parasitosis in children of the Xingu Indian Reservation. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Sep-Oct;87(5):393-8.
54. Queiroz DM, Carneiro JG, Braga-Neto MB, Fialho AB, Fialho AM, Goncalves MH, et al. Natural History of *Helicobacter pylori* infection in childhood: eight-year follow-up cohort study in an urban community in northeast of Brazil. *Helicobacter*. 2012 Feb;17(1):23-9.
55. Banatvala N, Mayo K, Megraud F, Jennings R, Deeks JJ, Feldman RA. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis*. 1993 Jul;168(1):219-21.
56. Oliveira AM, Queiroz DM, Rocha GA, Mendes EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. *Am J Gastroenterol*. 1994 Dec;89(12):2201-4.
57. Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, Oliveira AM, Moura SB, Barbosa MT, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-*H. pylori* antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(7):683-9.
58. Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, Oliveira AM, Moura SB, Silva RJ. Source of *Helicobacter pylori* infection: studies in abattoir workers and pigs. *Am J Gastroenterol*. 1992 Oct;87(10):1525.

59. Zaterka S, Nishimura JM, Parente JM, L L. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children population in Brazil. Gut. 2002;51(Suppl III):A93.
60. Zaterka S, Eisig JN, Chinzon D, Rothstein W. Factors related to Helicobacter pylori prevalence in an adult population in Brazil. Helicobacter. 2007 Feb;12(1):82-8.
61. Marcelo Basso Sousa LPL, Daniel Martins Moreira, Omar Moreira Bacha, Rogério Menezes Chultz, Maria Isabel Edelweiss. Prevalência de infecção por Helicobacter pylori em crianças avaliadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. Arq Gastroenterol. [Original article]. 2001;38(2):6.
62. Leandro Bizarro Muller RBF, Claudia Carvalho de Moraes e Alexandre Rampazzo. Prevalência da infecção por Helicobacter pylori e das lesões precursoras do câncer gástrico em pacientes dispépticos. Arq Gastroenterol. [Original article]. 2007;44(2):5.
63. Cave DR. Transmission and epidemiology of Helicobacter pylori. Am J Med. 1996 May 20;100(5A):12S-7S; discussion 7S-8S.
64. West AP, Millar MR, Tompkins DS. Survival of Helicobacter pylori in water and saline. J Clin Pathol. 1990 Jul;43(7):609.
65. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of Helicobacter pylori from human faeces. Lancet. 1992 Nov 14;340(8829):1194-5.
66. Hanninen ML. Sensitivity of Helicobacter pylori to different bile salts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991 Jun;10(6):515-8.
67. Desai HG, Gill HH, Shankaran K, Mehta PR, Prabhu SR. Dental plaque: a permanent reservoir of Helicobacter pylori? Scand J Gastroenterol. 1991 Nov;26(11):1205-8.

68. Axon AT. Review article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Aliment Pharmacol Ther.* 1995 Dec;9(6):585-8.
69. Cutler AF. Testing for *Helicobacter pylori* in clinical practice. *Am J Med.* 1996 May 20;100(5A):35S-9S; discussion 9S-41S.
70. Greenberg PD, Koch J, Cello JP. Clinical utility and cost effectiveness of *Helicobacter pylori* testing for patients with duodenal and gastric ulcers. *Am J Gastroenterol.* 1996 Feb;91(2):228-32.
71. Vaira D, Holton J, Menegatti M, Ricci C, Gatta L, Geminiani A, et al. Review article:invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000 Oct;14 Suppl 3:13-22.
72. Wong BC, Wong WM, Wang WH, Tang VS, Young J, Lai KC, et al. An evaluation of invasive and non-invasive tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Apr;15(4):505-11.
73. MacOni G, Vago L, Galletta G, Imbesi V, Sangaletti O, Parente F, et al. Is routine histological evaluation an accurate test for *Helicobacter pylori* infection? *Aliment Pharmacol Ther.* 1999 Mar;13(3):327-31.
74. Laine L, Chun D, Stein C, El-Beblawi I, Sharma V, Chandrasoma P. The influence of size or number of biopsies on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointest Endosc.* 1996 Jan;43(1):49-53.
75. Buck GE, Smith JS. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *J Clin Microbiol.* 1987 Apr;25(4):597-9.
76. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1988 Aug;7(4):555-8.

77. Hutton ML, Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. The use of AlbuMAX II((R)) as a blood or serum alternative for the culture of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2012 Feb;17(1):68-76.
78. Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? *Ann Med*. 2001 Mar;33(2):91-7.
79. Shiotani A, Nurgalieva ZZ, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori*. *Med Clin North Am*. 2000 Sep;84(5):1125-36, viii.
80. Adamek RJ, Szymanski C, Pfaffenbach B. Pantoprazole suppresses *Helicobacter pylori* without affecting cure. *Helicobacter*. 1999 Dec;4(4):266-71.
81. Schmilovitz-Weiss H, Sehayek-Shabat V, Eliakim R, Skapa E, Avni Y, Shirin H. Applicability of a short/rapid ¹³C-urea breath test for *Helicobacter pylori*: a retrospective multicenter chart review study. *BMC Gastroenterol*. 2012 Jan 19;12(1):8.
82. Nocon M, Kuhlmann A, Leodolter A, Roll S, Vauth C, Willich SN, et al. Efficacy and cost-effectiveness of the ¹³C-urea breath test as the primary diagnostic investigation for the detection of *Helicobacter pylori* infection compared to invasive and non-invasive diagnostic tests. *GMS Health Technol Assess*. 2009;5:Doc14.
83. Shepherd AJ, Williams CL, Doherty CP, Hossack M, Preston T, McColl KE, et al. Comparison of an enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* antigens in the faeces with the urea breath test. *Arch Dis Child*. 2000 Sep;83(3):268-70.
84. Oderda G, Rapa A, Marinello D, Ronchi B, Zavallone A. Usefulness of *Helicobacter pylori* stool antigen test to monitor response to eradication treatment in children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001 Feb;15(2):203-6.

85. Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon AT, Deltenre M, Gasbarrini G, et al. Noninvasive antigen-based assay for assessing *Helicobacter pylori* eradication: a European multicenter study. The European *Helicobacter pylori* HpSA Study Group. *Am J Gastroenterol*. 2000 Apr;95(4):925-9.
86. Leal YA, Cedillo-Rivera R, Simon JA, Velazquez JR, Flores LL, Torres J. Utility of stool sample-based tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011 Jun;52(6):718-28.
87. Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter*. 2004 Aug;9(4):347-68.
88. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Nov;7(11):629-41.
89. Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal*. 2011;9:28.
90. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol*. 1995 Jun;177(11):3010-20.
91. Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology*. 1996 Aug;111(2):419-25.

92. Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 1990 Jun;58(6):1992-4.
93. Odenbreit S, Wieland B, Haas R. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol.* 1996 Dec;178(23):6960-7.
94. Dunn BE, Roop RM, 2nd, Sung CC, Sharma SA, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Identification and purification of a cpn60 heat shock protein homolog from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 1992 May;60(5):1946-51.
95. Suerbaum S, Thiberge JM, Kansau I, Ferrero RL, Labigne A. *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol Microbiol.* 1994 Dec;14(5):959-74.
96. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):449-90.
97. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1992 May 25;267(15):10570-5.
98. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:63-96.
99. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM, Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* 2003 Mar 1;63(5):951-7.
100. Pai R, Cover TL, Tarnawski AS. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Aug 19;262(1):245-50.

101. Gebert B, Fischer W, Haas R. The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:205-20.
102. Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol.* 2004 Feb;6(2):143-54.
103. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14648-53.
104. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 1998 Apr;28(1):37-53.
105. Hatakeyama M. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Feb;11(1):30-7.
106. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter.* 2010 Jun;15(3):163-76.
107. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol.* 2001 Dec;42(5):1337-48.

108. Kim SY, Lee YC, Kim HK, Blaser MJ. Helicobacter pylori CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. Cell Microbiol. 2006 Jan;8(1):97-106.
109. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem. 1995 Jul 28;270(30):17771-7.
110. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. 1995 May 15;55(10):2111-5.
111. Parsonnet J, Replogle M, Yang S, Hiatt R. Seroprevalence of CagA-positive strains among Helicobacter pylori-infected, healthy young adults. J Infect Dis. 1997 May;175(5):1240-2.
112. Meine GC, Rota C, Dietz J, Sekine S, Prolla JC. Relationship between cagA-positive Helicobacter pylori infection and risk of gastric cancer: a case control study in Porto Alegre, RS, Brazil. Arq Gastroenterol. 2011 Jan-Mar;48(1):41-5.
113. Suzuki G, Cullings H, Fujiwara S, Hattori N, Matsuura S, Hakoda M, et al. Low-positive antibody titer against Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A (CagA) may predict future gastric cancer better than simple seropositivity against H. pylori CagA or against H. pylori. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007 Jun;16(6):1224-8.
114. Manguso F, Riccio E, Nucci G, Aiezza ML, Amato G, Degl'Innocenti L, et al. Helicobacter pylori infection in bleeding peptic ulcer patients after non-

steroidal antiinflammatory drug consumption. *World J Gastroenterol.* 2011 Oct 28;17(40):4509-16.

115. Wex T, Venerito M, Kreutzer J, Gotze T, Kandulski A, Malfertheiner P. Serological prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Saxony-Anhalt, Germany, in 2010. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Dec;18(12):2109-12.

116. den Hoed CM, Vila AJ, Holster IL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, de Jongste JC, et al. *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence for stabilized colonization rates in childhood. *Helicobacter.* 2011 Oct;16(5):405-9.

117. Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19 ed. São Paulo: Manole; [19--?].

118. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 1983;34:141-212.

119. Mortensen RF. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunol Res.* 2001;24(2):163-76.

120. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1351-7.

121. Tillett WS, Francis T. Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of *Pneumococcus*. *J Exp Med.* 1930 Sep 30;52(4):561-71.

122. Uchida T, Nguyen LT, Takayama A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, et al. Analysis of virulence factors of *Helicobacter pylori* isolated from a Vietnamese population. *BMC Microbiol.* 2009 Aug 23;9(1):175.

123. Blake GJ, PM R. C-Reactive Protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:37S-42S.
124. Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Feb 19;41(4 Suppl S):37S-42S.
125. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003 Jun;111(12):1805-12.
126. Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology.* 1999 May;42(1-3):23-30.
127. Singh RK, McMahon AD, Patel H, Packard CJ, Rathbone BJ, Samani NJ. Prospective analysis of the association of infection with CagA bearing strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease. *Heart.* 2002 Jul;88(1):43-6.
128. de Maat MP, Klufft C. Determinants of C-reactive protein concentration in blood. *Ital Heart J.* 2001 Mar;2(3):189-95.
129. Bajpai A, Goyal A, Sperling L. Should we measure C-reactive protein on earth or just on JUPITER? *Clin Cardiol.* 2010 Apr;33(4):190-8.
130. Abd TT, Eapen DJ, Bajpai A, Goyal A, Dollar A, Sperling L. The role of C-reactive protein as a risk predictor of coronary atherosclerosis: implications from the JUPITER trial. *Curr Atheroscler Rep.* 2011 Apr;13(2):154-61.
131. Singh SK, Suresh MV, Prayther DC, Moorman JP, Rusinol AE, Agrawal A. C-reactive protein-bound enzymatically modified low-density lipoprotein does not transform macrophages into foam cells. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):4316-22.
132. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol.* 2009;27:165-97.

133. Ando T, Minami M, Ishiguro K, Maeda O, Watanabe O, Mizuno T, et al. Changes in biochemical parameters related to atherosclerosis after *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;2(1):58-64.
134. Kanbay M, Gur G, Yucel M, Yilmaz U, Boyacioglu S. Does eradication of *Helicobacter pylori* infection help normalize serum lipid and CRP levels? *Dig Dis Sci.* 2005 Jul;50(7):1228-31.
135. Kowalski M. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in coronary artery disease: influence of *H. pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. *J Physiol Pharmacol.* 2001 Aug;52(1 Suppl 1):3-31.
136. Hoffmeister A, Rothenbacher D, Bode G, Persson K, Marz W, Nauck MA, et al. Current infection with *Helicobacter pylori*, but not seropositivity to *Chlamydia pneumoniae* or cytomegalovirus, is associated with an atherogenic, modified lipid profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Mar;21(3):427-32.
137. Jafarzadeh A, Hassanshahi GH, Nemati M. Serum levels of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in *Helicobacter pylori*-infected peptic ulcer patients and its association with bacterial CagA virulence factor. *Dig Dis Sci.* 2009 Dec;54(12):2612-6.
138. Pilotto A, Rumor F, Franceschi M. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection and extracardiac atherosclerosis in dyspeptic elderly subjects. *Age Ageing* 1999;28(4): 367-71.
139. Galante A, Pietroiusti A, Vellini M, Piccolo P, Possati G, de Bonis M, et al. C-Reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(4):1078-82.

140. Stettin D, Waldmann A, Strohle A, Hahn A. Association between *Helicobacter pylori*-infection, C-reactive protein and status of B vitamins. *Adv Med Sci.* 2008;53(2):205-13.
141. Tamer GS, Tengiz I, Ercan E, Duman C, Alioglu E, Turk UO. *Helicobacter pylori* seropositivity in patients with acute coronary syndromes. *Dig Dis Sci.* 2009 Jun;54(6):1253-6.
142. Brenner H, Berg G, Frohlich M, Boeing H, Koenig W. Chronic infection with *Helicobacter pylori* does not provoke major systemic inflammation in healthy adults: results from a large population-based study. *Atherosclerosis.* 1999 Dec;147(2):399-403.
143. Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE. Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke.* 2001 Feb;32(2):385-91.
144. Farsak B, Yildirim A, Akyon Y, Pinar A, Oc M, Boke E, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 Dec;38(12):4408-11.
145. Kaplan M, Yavuz SS, Cinar B, Koksall V, Kut MS, Yapici F, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of carotid artery by polymerase chain reaction. *Int J Infect Dis.* 2006 Mar;10(2):116-23.
146. Genta RM, Dixon MF. The Sydney System revisited: the Houston International Gastritis Workshop. *Am J Gastroenterol.* 1995 Jul;90(7):1039-41.
147. Nazmi A, Diez-Roux AV, Jenny NS, Tsai MY, Szklo M, Aiello AE. The influence of persistent pathogens on circulating levels of inflammatory markers:

a cross-sectional analysis from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *BMC Public Health*. 2010;10:706.

148. Huang B, Chen Y, Xie Q, Lin G, Wu Y, Feng Y, et al. CagA-positive *Helicobacter pylori* strains enhanced coronary atherosclerosis by increasing serum OxLDL and HsCRP in patients with coronary heart disease. *Dig Dis Sci*. 2011 Jan;56(1):109-14.

149. Lee JS, Paek NS, Kwon OS, Hahm KB. Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS) expression and signaling in *Helicobacter pylori* infection: a novel mechanism. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jan;25(1):194-202.

150. Peek RM, Jr., Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):831-58.

151. Galante A, Pietroiusti A, Vellini M, Piccolo P, Possati G, De Bonis M, et al. C-reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Oct;38(4):1078-82.

152. Rasmi Y, Raeisi S, Seyyed Mohammadzad MH. Association of inflammation and cytotoxin-associated gene a positive strains of *Helicobacter pylori* in cardiac syndrome x. *Helicobacter*. 2012 Apr;17(2):116-20.

11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

11.1 Manuscrito: Lack of association between *Helicobacter pylori*'s virulence and increased serum CRP levels in functional dyspeptic patients

Suggested running head: *H. pylori* virulence and serum CRP levels

Lack of association between *Helicobacter pylori*'s virulence and increased serum C-reactive protein levels in functional dyspeptic patients

Huander Felipe Andreolla^{1,4}, Laura Renata de Bona^{1,3}, Guilherme Becker Sander³, Luiz Edmundo Mazzoleni^{1,3}, Rejane Giacomelli Tavares^{2,5} and João Carlos Prolla^{1,4}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Post Graduation Program: Sciences in Gastroenterology and Hepatology – Porto Alegre/RS – Brazil

²Universidade Feevale – Instituto de Ciências da Saúde – Laboratório de Biomedicina – Novo Hamburgo/RS – Brazil

³Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Gastroenterologia – Porto Alegre/RS – Brazil

⁴Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – Porto Alegre/RS – Brazil

⁵Universidade Federal de Pelotas – UFPEL – Pelotas/RS – Brazil

Corresponding author: Huander Felipe Andreolla, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Molecular Biology Laboratory. Av Independencia 155, 8th floor, Zip code 90035-075, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 8233 6500; Fax: +55 51 3213 7490. E-mail: huanderandreolla@yahoo.com.br

ABSTRACT

Recently, a great variety of studies aimed to investigate and even suggest *Helicobacter pylori* as an important key factor in gastrointestinal and non-gastrointestinal events development. The well-established relationship between bacterial virulence and increased risk for peptic ulcer or gastric carcinoma is not so clear when comparing inflammation markers alterations, such C reactive protein (CRP), with the pathogen. We evaluated the presence of *H. pylori*, bacterial virulence and CRP serum levels in individuals diagnosed with functional dyspepsia. We evaluated prospectively 489 dyspeptic individuals. They fulfill Rome III clinical criteria for the diagnosis of functional dyspepsia with no organic disease at endoscopy. The bacterial infection was established by histology and urease rapid test. The levels of serum CRP were obtained by immunonefelometry and CagA status of *H. pylori* positive individuals was determined trough an imunoenzimatic assay. Prevalence rate of *H. pylori* was 66.3% and virulence factor CagA was detected in nearly 43% of positive samples. We found an association between *Ilex paraguariensis* consumption and pathogen's prevalence. An important effect of bacterial infection on inflammation was only observed in gastric epithelium. No systemic response to the pathogen, measured through CRP levels, was observed, regardless of CagA status.

Key words: *Helicobacter pylori*, dyspepsia, C-reactive protein, cagA protein, inflammation.

1. INTRODUCTION

Since *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) was described by Robin Warren and Barry Marshal, in 1982, this bacterium opened a new period in the gastric microbiology diagnosis and therapeutics (Marshall & Warren 1984, Dunn et al. 1997). *H. pylori* causes one of the most prevalent infections in human beings with a worldwide distribution that can reach relative frequencies that vary from 20 to 90 % in different populations (Ricci et al. 2011, Queiroz et al. 2012). The microorganism exhibits a high tropism to the gastric epithelium, where can causes immune and inflammatory responses that may persist for all life if not eradicated (Everhart 2000).

This pathogen, that initially was included in the *Campylobacter* genus, is a Gram-negative curved bacillus, presenting 2-6 flagella and an ability to produce urease abundantly (Marshall & Warren 1984, Goodwin & Armstrong 1990). Other virulence factors such CagA protein have been studied extensively (den Hoed et al. 2011, Lima et al. 2011, Wex et al. 2011). According to the recent reports, CagA positive strains can cause severe damage to the gastric epithelium, being related specially with increased levels of interleukin-8 (IL-8), gastroduodenal ulcers and gastric neoplasia occurrence (Parsonnet et al. 1997, Yamaoka 2010, Meine et al. 2011). In addition, this virulence factor has been associated with systemic inflammation, resulting in high serum CRP levels and being related to higher cardiovascular risks (Kowalski 2001).

Some behaviors have been associated to the transmission of *H. pylori*. Studies have reported that several aspects can be related to incidence and prevalence rates like socioeconomic status, years of study, institutionalization practice or social habits (Dunn et al. 1997, Kodaira et al. 2002). In 2010, a Brazilian study has demonstrated an anti-*H. pylori* activity of plant extracts, like yerba maté tea (*Ilex paraguariensis*), but no

association between bacteria prevalence and tea consumption has been previously described (Cogo et al. 2010).

All *H. pylori*'s infected people present histological gastritis. Moreover, the bacteria, classified as type I carcinogen (Peterson 2002), has been associated with the pathogenesis of gastric and duodenal peptic ulcers, with gastric carcinoma and with the gastric MALT lymphoma (Fischbach et al. 2004). Some studies also suggest a bacterial role in cardiovascular disorders, referring to the inflammatory process that results in the atheroma formation and evolution (Ameriso et al. 2001, Huang et al. 2011). Additionally, one of the most challenging questions related to *H. pylori* is the bacterium association with the functional dyspepsia (Fock 2011, Mazzoleni et al. 2011, Miwa et al. 2011).

As the influence of *H. pylori* CagA positive strains and potential changes in systemic inflammation remains a debatable matter. Thus, our study aimed to verify a possible relationship between bacterial virulence and systemic and/or local inflammation, through the measurement of CRP levels in serum and the comparison with the histological gastric mucosa analysis from functional dyspeptic patients.

2. PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Patients

Between November 2006 and June 2008, 489 subjects who had undergone upper gastrointestinal endoscopic evaluation to participate in HEROES trial (*Helicobacter Eradication Relief of Dyspeptic Symptoms*), at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil, were prospectively and consecutively included in this study.

As inclusion criteria, the patient should meet the Rome III criteria which includes at least one of the following symptoms: a. bothersome postprandial fullness; b. early satiation; c. epigastric pain; or d. epigastric burning. Individuals presenting organic disorders diagnosed by upper gastrointestinal endoscopy, such as esophagitis, gastric or duodenal peptic ulcers, neoplasia or other conditions that could be the cause of the referred symptoms were excluded from the study. Conditions such previous treatment to *H. pylori*, clinical manifestations of organic diseases or presence of significant comorbidities and non-acceptance of the intervention by the patient were equally considered exclusion criteria.

Additionally, after informed consent form assignment, subjects answered questions about medical history, dietary habits and quality of life.

Endoscopic procedures

It was performed with a videoendoscope (GIF-100, Olympus Co). After eight hour fast, patients were sedated intravenously according to their age, weight and tolerance to fentanyl or meperidine plus midazolam. From each patient were collected three antral fragments, one specimen from the gastric body, and one from the *incisura angularis* region. Biopsy samples were submitted to a *H. pylori* investigation by two distinct methodologies: histology and rapid urease test.

Helicobacter pylori diagnosis

A biopsy specimen from each gastric region (antrum, body and *incisura angularis*) was placed in a 0,5 ml Christensen solution (Uretest[®], Renylab) to verify the presence of bacterial urease. A positive result was reported if there was a color change from yellow to pink within 12h of incubation at room temperature according to the manufacturer's instructions.

Concurrently, paired biopsy specimens were collected from antrum, fixed with 10% formol and stained for Hematoxylin and Eosin (H&E) and Giemsa. Two independent, experienced and blinded pathologists performed the histological examination, and discordances were solved by a third expert's opinion. The inflammatory status was determined according to Sydney's Endoscopic Classification, as previously described (Genta & Dixon 1995). *H. pylori*'s infection was considered present according to the positivity in both methodologies (rapid urease test and histological evaluation).

Determination of CRP levels

Approximately 10 ml of whole blood were collected from each patient and after 3000 rpm centrifugation during 15 minutes, serum samples were stored at -80°C and analyzed for high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and anti-CagA *H. pylori* antibodies, as described below.

CRP levels were measured by a immunonephelometric assay (*CardioPhase*[®] hsCRP Dade Behring) on a Behring Nephelometer II analyzer. The detection limit for CRP was 0.17 mg/L, and the measuring range was 0.175–1100 mg/L.

Determination of cagA status

Serological search for anti-CagA was performed with a commercial available kit (CagA IgG EIA WELL[®], Radim) according to manufacturer's instructions. After incubation, plates were read in a spectrophotometer at 450 nm and samples with IgG values higher than 15 RU/mL were considered reactive for anti-CagA IgG antibodies. Each sample was measured twice to ensure the precision of the method.

Ethical Considerations

All study procedures were conducted in agreement with Declaration of Helsinki, with the Brazilian Federal Resolution 196/96 and were approved by our local institutional review board, inscribed as project number 07-547. All patients were informed about the study's objectives and subsequently provided written informed consent before any intervention.

Statistical analysis

Data are presented as mean (SD) or median (25th – 75th percentile), when otherwise stated. Quantitative variables were first analyzed concerning Gaussian distribution and assessed with t-test and one-way ANOVA (parametric) or Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test (non-parametric). Categorical variables were described by absolute and relative frequencies and analyzed using chi-square test with adjusted residuals test. The analysis was performed using SPSS v. 18. A *p* value was considered significant if < 0.05 .

3. RESULTS

The characteristics of the subjects are shown in the Table I. Regarding to the gastric *H. pylori* status, 66.3% of the functional dyspeptic patients were *H. pylori*-positive. Among these patients, 42.8% presented antibodies against CagA virulence protein.

Relevant findings include i. a higher prevalence of *H. pylori* in the population with less than nine years of education and ii. no association between bacterial frequency and gender, race, smoking habit or alcohol consumption was observed.

It was also asked to the patients about the habit of drinking yerba maté tea, and 45.3% of positive *H. pylori* individuals reported regular consumption of such beverage ($p = 0.006$).

Table II shows local and systemic inflammatory status according to the presence of *H. pylori* and CagA virulence factor. In general, it was observed a high association between the presence of anti-CagA and a high inflammation and inflammatory activity in the gastric epithelium ($p \leq 0.001$), without significantly affect the CRP values. Regarding the systemic inflammation marker (hsCRP) and local inflammatory activity or inflammation grade in dyspeptic patients, no association was observed between the systemic inflammation marker and an inflammatory activity ($p = 0.339$) nor between systemic inflammation marker and inflammation grade ($p = 0.508$).

4. DISCUSSION

Recently, *H. pylori* and has been suggested as an important factor in extra-gastric manifestations such as increased serum CRP levels and high systemic inflammation leading to a higher potential risk factor to the development of cardiovascular diseases (Huang et al. 2011, Nazmi et al. 2010). This study was developed in order to verify a possible relation between bacterial virulence and systemic and/or local inflammation through the measurement of CRP levels in serum and the histological evaluation of gastric mucosa of functional dyspeptic patients.

Regarding the bacterial influence on the immune system, a study conducted by Lee et al. (2010) indicates that *H. pylori* infection or their lipopolysaccharide stimulation led to significant increased expressions of inflammatory mediators including tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), IL-8, inducible nitric oxide synthase and

cyclooxygenase- 2 (Lee et al. 2010). The mechanism of this response affects the innate immunity through the recognition of some conserved microbial constituents by receptors expressed on host-epithelial cells as well as neutrophils. In the gut, such recognition results in the activation of conserved signaling cascades mediated by nuclear factor κ B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinases and caspase-dependent signaling pathways (Peek et al. 2010).

The main findings of our study were: 1. no association between CRP serum levels in *H. pylori* infected patients with functional dyspepsia, independently of CagA status; 2. a remarkable inflammation and inflammatory activity in gastric epithelium of patients carrying the most virulent strain; and 3. a high prevalence of *H. pylori* in patients with less than nine years of education; and, 4. in those who mentioned yerba maté tea consumption.

Regarding the first finding, our results do not agree with some reports that have shown a considerable association of *H. pylori* and increased serum CRP levels, especially in positive-CagA strains (Jafarzadeh et al. 2009). Considering the possible association between higher systemic inflammation levels and *H. pylori* infection, some data show that after the pathogen eradication, serum CRP levels can decrease significantly (Kanbay et al. 2005, Ando et al. 2006). Otherwise, there is no consensus about this matter. For example, a strong study conducted by Brenner and cols (1999) involving more than 1.800 healthy subjects did not prove the relation between *H. pylori*, bacterial virulence and inflammation markers. Although it was observed an inverse relation between *H. pylori* infection and serum albumin, the bacteria presence was unrelated to C-reactive protein and the leukocyte count, regardless of CagA status (Brenner et al. 1999). Such result was also reported in several studies that showed no

impact of *H. pylori*'s infection in systemic markers of inflammation (Galante et al. 2001, Gillum 2004, Stettin et al. 2008, Tamer et al. 2009).

CagA is the most extensively investigated virulence factor of *H. pylori* being encoded by cytotoxin-associated genes pathogenicity island (cagPAI) (Backert et al. 2011). A strain expressing cagA protein, which is present in more virulent isolates, is typically associated with the production of proinflammatory cytokines, especially IL-8, and such factor has been reported as an important factor related to the peptic ulcer and gastric adenocarcinoma occurrence (Yamaoka 2010). It was observed a remarkable inflammatory activity and inflammation in the gastric epithelium of those people with the most virulent strain, whereas, neither inflammatory activity nor inflammation were observed in more than 90% and 54% of *H. pylori*'s negative subjects, respectively.

We also found an important association between prevalence of the pathogen and years of education and yerba maté tea consumption. As previously appointed by other Brazilian researches, 66% of our study population presented *H. pylori*'s infection, among these patients, nearly 58% reported less than nine years of study. This finding has been also observed in other studies and possibly indicates socioeconomic status and years of study as important conditions associated to the risk factors for *H. pylori*'s transmission (Escobar-Pardo et al. 2011, Queiroz et al. 2012).

According to data previously reported (Kodaira et al. 2002), our findings support that *H. pylori* frequency is not related with smoking habit or alcohol consumption. On the other hand, we report here, for the first time, the association of *H. pylori*'s infection with the cultural habit of drinking maté. Maté is an infusion of the herb *Ilex paraguariensis* that is prepared in a gourd and is drunk very hot through a metal straw. The infusion is shared by different people using the same gourd and straw. Although it

has been reported that the herb presents anti-*H. pylori* activity (Cogo 2010) this cultural habit may provide a route for the bacterial transmission.

Considering our study procedures, we recognize that CRP is an unspecific marker of acute inflammation and that it can be related to a several diseases and conditions. Firstly described by Tillett e Francis (1930), this inflammatory protein has an important role to predict the cardiovascular risk, among other applications (Tillet & Francis 1930, Pepys & Hirschfield 2003). Although we have evaluated systemic inflammation through this analyte, we agree that other parameters should be useful and more specific to determine a possible link between *H. pylori*'s infection and systemic inflammation. In example, some studies have considered to study as inflammation markers interleukin-6 (IL-6), IL-8 and TNF- α , which seems to be specially related to bacterial infection (Backert et al. 2011, Rasmi et al. 2012).

As mentioned above, regarding the remarkable association between the presence of anti-CagA antibodies and higher tissue damage, although with no systemic responses through the measurement of hsCRP levels, we encourage the development of further studies involving additional inflammatory markers that could be related to higher systemic inflammation in functional dyspeptic people carrying *H. pylori* and its virulence factor.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

To HEROES trial staff, for their help in selecting functional dyspeptic patients and getting biological samples.

7. REFERENCES

- Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, Sevlever GE 2001. Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 32: 385-391.
- Ando T, Minami M, Ishiguro K, Maeda O, Watanabe O, Mizuno T, Fujita T, Takahashi H, Noshiro M, and Goto H 2006. Changes in biochemical parameters related to atherosclerosis after *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2: 58-64.
- Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N 2011. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal* 9: 28.
- Brenner H, Berg G, Frohlich M, Boeing H, Koenig W 1999. Chronic infection with *Helicobacter pylori* does not provoke major systemic inflammation in healthy adults: results from a large population-based study. *Atherosclerosis* 147: 399-403.
- Cogo LL, Monteiro CLB, Miguel MD, Miguel OG, Cunico MM, Ribeiro ML, de Camargo ER, Kussen GMB, Nogueira KS, Dalla Costa, LM 2010. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Braz. J. Microbiol* 41: 304-309.
- den Hoed CM, Vila, AJ, Holster IL, Perez-Perez GI, Blaser, MJ, de Jongste, JC, Kuipers, EJ 2011. *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence for stabilized colonization rates in childhood. *Helicobacter* 16: 405-409.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 10: 720-741.

- Escobar-Pardo ML, de Godoy AP, Machado RS, Rodrigues D, Fagundes Neto U, Kawakami E 2011. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and intestinal parasitosis in children of the Xingu Indian Reservation. *J Pediatr* 87: 393-398.
- Everhart JE 2000. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 29: 559-578.
- Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A, Stolte M 2004. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* 53: 34-37.
- Fock KM 2011. Functional dyspepsia, *H. pylori* and post infectious FD. *J Gastroenterol Hepatol* 26: 39-41.
- Galante A, Pietroiusti A, Vellini M, Piccolo P, Possati G, de Bonis M, Grillo R, Fontana C, Favalli C 2001. C-Reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol* 38: 1078-1082.
- Genta RM, Dixon MF 1995. The Sydney System revisited: the Houston International Gastritis Workshop. *Am J Gastroenterol* 90: 1039-1041.
- Gillum RF 2004. Infection with *Helicobacter pylori*, coronary heart disease, cardiovascular risk factors, and systemic inflammation: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Natl Med Assoc* 96: 1470-1476.
- Goodwin CS, Armstrong JA 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9: 1-13.
- Huang B, Chen Y, Xie Q, Lin G, Wu Y, Feng Y, Li J, Zhuo Y, Zhang P 2011. CagA-positive *Helicobacter pylori* strains enhanced coronary atherosclerosis by

- increasing serum OxLDL and HsCRP in patients with coronary heart disease. *Dig Dis Sci* 56: 109-114.
- Jafarzadeh A, Hassanshahi GH, Nemati M 2009. Serum levels of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in *Helicobacter pylori*-infected peptic ulcer patients and its association with bacterial CagA virulence factor. *Dig Dis Sci* 54: 2612-2616.
- Kanbay M, Gur G, Yucel M, Yilmaz U, Boyacioglu S 2005. Does eradication of *Helicobacter pylori* infection help normalize serum lipid and CRP levels? *Dig Dis Sci* 50: 1228-1231.
- Kodaira MS, Escobar AM, Grisi S 2002. Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection in childhood and adolescence. *Rev Saude Publica* 36: 356-369.
- Kowalski M 2001. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in coronary artery disease: influence of *H. pylori* eradication on coronary artery lumen after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The detection of *H. pylori* specific DNA in human coronary atherosclerotic plaque. *J Physiol Pharmacol* 52: 3-31.
- Lee JS, Paek NS, Kwon OS, Hahm KB 2010. Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS) expression and signaling in *Helicobacter pylori* infection: a novel mechanism. *J Gastroenterol Hepatol* 25: 194-202.
- Lima VP, Silva-Fernandes IJ, Alves MK, Rabenhorst SH 2011. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. *Cancer Epidemiol* 35: e32-37.

- Marshall BJ, Warren JR 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
- Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CF, Mazzoleni F, Uchoa DM, De Bona LR, Milbradt TC, Von Reisswitz PS, Berwanger O, Bressel M, Edelweiss MI, Marini SS, Molina CG, Folador L, Lunkes RP, Heck R, Birkhan OA, Spindler BM, Katz N, Colombo B, Guerrieri PP, Renck LB, Grando E, Hocevar de Moura B, Dahmer FD, Rauber J, Prolla JC 2011. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES trial. *Arch Intern Med* 171: 1929-1936.
- Meine GC, Rota C, Dietz J, Sekine S, Prolla JC 2011. Relationship between cagA-positive *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer: a case control study in Porto Alegre, RS, Brazil. *Arq Gastroenterol* 48: 41-45.
- Miwa H, Watari J, Fukui H, Oshima T, Tomita T, Sakurai J, Kondo T, Matsumoto T 2011. Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol* 26: 53-60.
- Nazmi A, Diez-Roux AV, Jenny NS, Tsai MY, Szklo M, Aiello AE 2010. The influence of persistent pathogens on circulating levels of inflammatory markers: a cross-sectional analysis from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *BMC Public Health* 10: 706.
- Parsonnet J, Replogle M, Yang S, Hiatt R 1997. Seroprevalence of CagA-positive strains among *Helicobacter pylori*-infected, healthy young adults. *J Infect Dis* 175: 1240-1242.
- Peek RM, Jr Fiske C, Wilson KT 2010. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol Rev* 90: 831-858.

- Pepys MB, Hirschfield GM 2003. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111: 1805-1812.
- Peterson WL 2002. Review article: *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 40-46.
- Queiroz DM, Carneiro JG, Braga-Neto MB, Fialho AB, Fialho AM, Goncalves MH, Rocha GA, Rocha AM, Braga LL 2012. Natural History of *Helicobacter pylori* infection in childhood: eight-year follow-up cohort study in an urban community in northeast of Brazil. *Helicobacter* 17: 23-29.
- Rasmi Y, Raeisi S, Seyyed Mohammadzad MH 2012. Association of inflammation and cytotoxin-associated gene a positive strains of *Helicobacter pylori* in cardiac syndrome x. *Helicobacter* 17: 116-120.
- Ricci V, Romano M, Boquet P 2011. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 17: 1383-1399.
- Stettin D, Waldmann A, Strohle A, Hahn A 2008. Association between *Helicobacter pylori*-infection, C-reactive protein and status of B vitamins. *Adv Med Sci* 53: 205-213.
- Tamer GS, Tengiz I, Ercan E, Duman C, Alioglu E, Turk UO 2009. *Helicobacter pylori* seropositivity in patients with acute coronary syndromes. *Dig Dis Sci* 54: 1253-1256.
- Tillett WS, Francis T 1930. Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus. *J Exp Med* 52: 561-571.
- Wex T, Venerito M, Kreutzer J, Gotze T, Kandulski A, Malfertheiner P 2011. Serological prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Saxony-Anhalt, Germany, in 2010. *Clin Vaccine Immunol* 18: 2109-2112.

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

TABLE I

Sociodemographic characteristics and life style of study population according to *H. pylori* status and virulence

	n	Mean age (SD)	%Females	%White Race	% Education ≥ 9 years	% Smokers			%Alcohol drinkers
						Current	Former	Never	
						<i>H. pylori</i> negative	165	46.4 (14.7)	
<i>H. pylori</i> positive	324	46.1 (12.8)	82.4	77.2	57.5	19.2	20.8	60.1	8.8
valor-p ^c		0.794	0.964	0.448	0.020		0.746		0.593
anti-cagA negative	111	44.3 (13.1)	83.8	79.3	59.6	18.3	22.0	59.6	7.3
anti-cagA positive	83	45.1 (12.6)	75.9	75.9	52.4	17.1	24.4	58.5	11.0
missing data	130	47.3 (13.8)	84.1	78.6	64.6	18.8	20.5	60.8	7.3
p-value ^a		0.680	0.236	0.700	0.398		0.920		0.634
p-value ^b		0.102	0.208	0.834	0.125		0.960		0.640

Total	489	46.2 (13.5)	82.6	78.3	61.4	18.4	20.5	60.1	7.9
-------	-----	-------------	------	------	------	------	------	------	-----

SD : standard deviation

n: number of subjects

^a Missing data not considered (Student's t-test used for continuous variables and Chi-Square test used for categorical variables)

^b Considering missing data (ANOVA one-way used to continuous variables and Chi-Square test used for categorical variables)

^c Student's t-test used for continuous variables e Chi-Square test used for categorical variables

TABLE II

Local and systemic inflammatory status according to the presence of *H. pylori* and *cagA* virulence factor

		<i>H. pylori</i> positive (%)		<i>H. pylori</i> negative (%)	p ^a
		cagA (-) n=111	cagA (+) n=83	n=165	
hsCRP (mg/L)	median (25th - 75th percentile)	1.65 (0.69 - 3.94)	1.46 (0.71 - 3.5)	1.39 (0.71 - 3.04)	0.817
Inflammation - n (%)	Absent	0 (0.0)	0 (0.0)	88 (54.7) ^b	<0.001
	Mild	36 (33.0)	7 (8.5)	60 (37.3) ^b	
	Moderate	71 (65.1) ^b	70 (85.4) ^b	13 (8.1)	
	Severe	2 (1.8)	5 (6.1) ^b	0 (0.0)	
Inflammatory Activity - n (%)	Absent	0 (0.0)	0 (0.0)	145 (90.1) ^b	<0.001
	Mild	74 (67.9) ^b	16 (19.5)	9 (5.6)	
	Moderate	34 (31.2)	60 (73.2) ^b	7 (4.3)	

Severe

1 (0.9)

6 (7.3)^b

0 (0.0)

^aKruskal-wallis test used for continuous variables and Chi-square test used for categorical variables

^bStatistically significant association by adjusted residuals test 5% of significance

12. ANEXOS

Convite para participação no estudo:

ERRADICAÇÃO DO *HELICOBACTER PYLORI* NA DISPEPSIA FUNCIONAL

A dispepsia funcional é uma das doenças mais frequentes da medicina. Vários trabalhos de pesquisa, em diferentes países, demonstraram que os pacientes com dispepsia funcional com muita frequência possuem uma bactéria no estômago, chamada *Helicobacter pylori*. Ainda não está definido cientificamente se essa bactéria é uma das causas dos sintomas da dispepsia funcional e se a eliminação da infecção melhora os sintomas desses pacientes.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre está realizando um trabalho de pesquisa sobre a eliminação da bactéria *Helicobacter pylori* nos pacientes com dispepsia funcional. O objetivo principal deste trabalho é observar se o tratamento melhora os sintomas digestivos desses pacientes.

Se pretende, assim, obter conclusões que poderão beneficiar os pacientes dispépticos funcionais. Para que os resultados da pesquisa possam ser considerados válidos para a população em geral, estamos selecionando um grande número de pacientes (cerca de quatrocentos).

Caso concorde, o início de sua participação no estudo se dá com a realização de uma consulta médica que irá avaliar o seu estado de saúde, a presença e intensidade dos sintomas digestivos, a avaliação da sua qualidade de vida e dos custos da sua doença, através de questionários. Após essa consulta inicial será solicitada uma endoscopia digestiva alta com biópsias do estômago (retirada de pequenos fragmentos do estômago para avaliar no microscópio). Caso o resultado do exame para a bactéria seja positivo, o Sr./Sra. poderá fazer parte do grupo de pacientes que vão participar da pesquisa, desde que preencha todos os critérios da pesquisa. Caso seja incluído entre os participantes, você irá iniciar o tratamento para combater o *Helicobacter pylori*, com os medicamentos fornecidos pela pesquisa. Os medicamentos serão fornecidos numa segunda consulta, após a endoscopia. O tratamento é feito com 3 medicações diferentes, que deverão ser tomadas durante 10 dias (2 vezes por dia). Os medicamentos são dois antibióticos (amoxicilina e claritromicina) associados com um medicamento contra a acidez do estômago (omeprazol). Este é o esquema atualmente mais utilizado para o tratamento da bactéria, em todo o mundo.

Para que se possa conhecer o verdadeiro efeito do tratamento da bactéria sobre os sintomas do estômago, metade dos pacientes irá receber os medicamentos descritos acima (com os dois antibióticos) e a outra metade irá receber o omeprazol associado a dois "falsos" antibióticos chamados de PLACEBOS. Placebos são cápsulas que não contêm a medicação ativa, mas que tem a aparência absolutamente igual às cápsulas dos dois antibióticos. É importante lembrar que, para que não exista nenhuma influência nos resultados, nem os pacientes nem os médicos terão conhecimento do conteúdo das cápsulas. No final da pesquisa, todos os médicos e pacientes saberão se a bactéria foi eliminada ou não. Dependendo das conclusões do estudo, saberemos se o tratamento realmente está indicado ou não para melhorar os sintomas dos pacientes.

Você deverá evitar o uso de outras medicações durante o período em que estiver participando do estudo, que terá a duração de 12 meses. Caso necessite, deverá entrar em contato com os médicos responsáveis, vindo ao ambulatório em qualquer dia, mesmo que você não tenha consulta marcada, ou por telefone. Alguns medicamentos serão permitidos pela pesquisa (Famox e Digipilus) os quais serão liberados para uso apenas SE NECESSÁRIO caso você tenha sintomas digestivos. Esses medicamentos serão fornecidos para todos os

RECIBO GRUPO
N.º 05/05/05
12/10/05
2005

pacientes, juntamente com um calendário para a marcação dos dias em que a medicação precisou ser utilizada. Os medicamentos que já vinham sendo utilizados, e que não foram proibidos pelos pesquisadores, deverão ser continuados normalmente.

Durante o estudo serão realizadas mais três consultas, além das duas iniciais. Uma será 4 meses e as outras 8 e 12 meses após o final do tratamento com os antibióticos (ou com os placebos). Nas consultas serão aplicados questionários sobre os sintomas, sobre a qualidade de vida, sobre o seu estado emocional e sobre os custos da sua doença. O estudo também irá avaliar o problema das aftas da boca. Na segunda e na última consulta serão realizados testes para avaliar o funcionamento do seu estômago através da ingestão de líquidos. Nestas duas consultas também serão realizados exames de sangue e de fezes para avaliar o seu estado clínico e nutricional. O seu sangue deverá ser armazenado para análises posteriores. O Sr. (Sra.) terá acesso aos resultados desses exames caso seja do seu interesse, bastando para tanto que o Sr. (Sra.) faça essa solicitação à equipe de pesquisa. Nenhum outro tipo de análise será realizada sem a sua autorização por escrito.

Durante o estudo serão realizadas duas endoscopias digestivas altas com biópsias do estômago e do duodeno. A primeira será antes de receber os medicamentos do estudo, e a última 12 meses após o tratamento. Nesses exames será realizada a pesquisa do *Helicobacter pylori* e a avaliação do seu estômago e duodeno. As endoscopias serão realizadas sob sedação (remédio que faz dormir). Depois que você dormir, o médico introduzirá pela sua boca uma sonda que vai descer até o duodeno. No percurso da sonda, o médico verifica se há lesões, como gastrites, úlceras e outras doenças. Durante a endoscopia, o médico irá fazer biópsias (que é a retirada de pequenos fragmentos do revestimento do seu estômago e do seu duodeno para complementar o seu exame). A realização de biópsias não provoca dor e tem riscos muito pequenos de sangramento, que, se ocorrer, poderá ser controlado durante o próprio procedimento. A realização de biópsias de estômago é um procedimento de rotina durante realização de endoscopias digestivas quando o endoscopista julga necessária uma avaliação mais adequada do revestimento do estômago. Dependendo do tipo de lesão encontrada você não poderá participar do estudo, e será encaminhado para tratamento da lesão encontrada.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são de caráter estritamente confidencial. Os dados coletados serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar os participantes do estudo.

Todas as despesas relacionadas ao custo das medicações, consultas e exames diagnósticos serão cobertas por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Caso você quiser retirar-se do estudo durante o seu andamento, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique a continuidade do seu acompanhamento médico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, caso você já seja paciente desse hospital.

Os médicos responsáveis estão à sua disposição para o esclarecimento de quaisquer dúvidas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: ERRADICAÇÃO DO *HELICOBACTER PYLORI* NA DISPEPSIA FUNCIONAL

G.P.P.G.: 05422

FICHA: _____

PACIENTE: _____

JUSTIFICATIVA:

A dispepsia funcional é uma doença muito frequente, assim como a infecção pelo *Helicobacter pylori*. Ainda não foi definido se a erradicação da bactéria beneficia os sintomas dispépticos. Essa pesquisa irá avaliar se a erradicação do *Helicobacter pylori* melhora os sintomas de pacientes com dispepsia funcional.

Os participantes deste estudo serão pacientes dispépticos funcionais portadores do *Helicobacter pylori* atendidos no HCPA. Os pacientes irão receber os seguintes esquemas terapêuticos: omeprazol, amoxicilina e claritromicina ou omeprazol e placebo dos antibióticos. Serão monitorizados com consultas para avaliação clínica, mensuração dos sintomas, avaliação da qualidade de vida além de avaliação econômica. Irão realizar testes funcionais do estômago, com teste de ingestão de líquidos. Também irão realizar avaliação endoscópica e histológica do estômago. Os pacientes serão acompanhados por 12 meses após o tratamento.

A assinatura desse consentimento informado dará autorização aos pesquisadores do estudo de utilizarem os dados obtidos somente para fins científicos, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a identidade dos pacientes.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada, conforme especificados em Convite para participar do estudo (em anexo). Recebi informações específicas sobre os procedimentos diagnósticos e tratamento aos quais serei submetido(a).

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

O profissional _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__

Assinatura dos participantes:

PACIENTE _____

TESTEMUNHA (nos casos especiais) _____

INVESTIGADOR _____

ORIENTADOR / COORDENADOR DO PROJETO _____

Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni: Fone 21018307

Versão 2 de 11 de outubro de 2006

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
11/10/06
V 05422

GPPG - Recebido

11 OUT. 2006

Por _____ nº 05422