

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIA DE BOTUCATU – IBB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BEATRIZ DE OLIVEIRA GARCIA

INFLUÊNCIA DO JEJUM E DO ÁCIDO CÍTRICO NO TESTE
RESPIRATÓRIO COM ISÓTOPOS ESTÁVEIS DO CARBONO PARA
DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI*

BOTUCATU

2017

Beatriz de Oliveira Garcia

Influência do jejum e do ácido cítrico no teste respiratório com isótopos estáveis do carbono
para detecção da infecção por *Helicobacter pylori*

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biotecnologia do
Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista - UNESP,
para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa
Orientador

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Garcia, Beatriz de Oliveira.

Influência do jejum e do ácido cítrico no teste respiratório com isótopos estáveis do carbono para detecção da infecção por *Helicobacter pylori* / Beatriz de Oliveira Garcia. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

Capes: 90400003

1. Estômago - Infecções - Diagnóstico. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Jejum. 4. Isótopos estáveis. 5. Ácido cítrico. 6. Exercícios respiratórios. 7. Carbono 13.

Palavras-chave: Carbono-13; Diagnóstico; *Helicobacter pylori*; UBT.

Comissão Examinadora

Prof. Dr Vladimir Eliodoro Costa
Centro de Isótopos Estáveis – IBB/UNESP
(Orientador)

Prof. Dr. José Albertino Bendassolli
Laboratório de Isótopos Estáveis – CENA/USP
(Membro Titular)

Prof. Dr. Rogério Antônio De Oliveira
Departamento de Bioestatística – IBB/UNESP
(Membro Titular)

Profª. Dra. Nádia dos Reis Carvalho
Centro de Isótopos Estáveis – IBB/UNESP
(Membro Suplente)

Profª. Drª. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues
Departamento de Patologia – FMB/UNESP
(Membro Suplente)

**Dedico aos meus pais,
Meu sol em tempos de chuvas.**

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente à Deus, pela força e esperança que a fé proporciona, pela paz em momentos de angústia, gratidão por todas as pessoas que Ele colocou em minha vida durante esse ciclo, sem elas, sem Ele, essa etapa não seria concluída.

Aos meus pais, essenciais para a conclusão desse ciclo, por todo apoio, espero ser merecedora de todo o esforço que eles fizeram para que eu chegasse em uma pós-graduação, obrigada pela paciência nos momentos de decisões, pelo carinho nos momentos de tristeza e ansiedade, pelo amor que me manteve forte apesar da distância.

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa, agradeço pela oportunidade, por acreditar em meu potencial e me orientar por todo esse tempo. Um pouco mais de três anos de convivência entre graduação e pós-graduação, e foi um período que aprendi muito, obrigada por me aconselhar sobre o trabalho e sobre a vida.

O Prof. Carlos Ducatti (*in memoriam*) tem toda minha gratidão, ele foi um grande pesquisador, um grande ser humano, detentor de um imensurável conhecimento e de uma imensa sabedoria de vida, eu tive o privilégio de conviver com ele, sinto me agradecida por todas as conversas e pelos ensinamentos profissionais e pessoais.

Os funcionários do Centro de Isótopos Estáveis – IBB/UNESP, Mariana, Evandro, Cibele, Nádia e Edson, obrigada pela paciência, pela generosidade, pela amizade. Aos Alunos do CIE, que ajudaram durante esse período, principalmente ao Geraldo Gabriel que se tornou um grande amigo nesse tempo de pós-graduação.

Aos professores que me ajudaram nessa caminhada, agradeço ao Prof. Paulo Ramos e Prof. Joel Mesa, pelos conselhos, pela amizade, ao Prof. Rogério Antônio de Oliveira, à Prof. Maria Aparecida M. Rodrigues, ao Prof. José Albertino Bendassolli e ao Laboratório de Isótopos Estáveis – CENA/USP, pela parceria, sua ajuda foi importantíssima para execução e conclusão desse trabalho.

Agradeço também ao apoio que recebi dos amigos, Paola obrigada pela paciência, por ouvir minhas reclamações, por me aconselhar em algumas decisões, obrigada por fazer parte da minha vida nesses últimos seis anos. Grata por todos os amigos que fiz durante essa caminhada, desde os mais antigos, até os mais recentes, vocês fizeram da minha estadia em Botucatu muito melhor, cheia de boas lembranças.

Agradeço também a todos os voluntários que se disponibilizaram a participar dessa pesquisa, sem vocês nada poderia ser feito, muito obrigada pela compreensão e disposição.

*“A mente que abre uma janela,
jamais volta ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

Diversas doenças gástricas estão associadas à presença do microrganismo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) na mucosa gástrica. O método de diagnóstico não invasivo, simples, seguro e bastante recomendado é o teste respiratório com ureia marcada com o isótopo estável do Carbono (^{13}C -UBT). Existem consenso no protocolo de aplicação do ^{13}C -UBT, contudo a necessidade do jejum ainda é alvo de controvérsias, além disso, o ácido cítrico utilizado junto a ureia marcada torna o substrato azedo, dificultando a aplicação do ^{13}C -UBT em crianças e idosos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o jejum influencia no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* pelo ^{13}C -UBT, analisado por espectrômetro de massa de razão isotópica específico, e verificar a necessidade do ácido cítrico junto com a ^{13}C -ureia. Para isso foi selecionado 40 pacientes, sendo que 35 estavam infectados e 5 não infectados pelo *H. pylori*. O ^{13}C -UBT foi aplicado em 40 pacientes nos tempos de jejum de 1h, 2h, 4h e 6h com ácido cítrico. Por fim, 30 pacientes infectados foram submetidos ao ^{13}C -UBT em 1h de jejum sem o ácido cítrico. Assim obtivemos o *turnover* do ^{13}C da expiração do paciente durante aplicação do ^{13}C -UBT em diferentes tempos de jejum. Com comportamento da curva do *turnover* foi possível observar que o jejum não interfere no resultado final do ^{13}C -UBT, apesar do *turnover* do ^{13}C em menores tempos de jejum atingiram menores intensidades, esse comportamento pode ser explicado pelo gasto energético. Verificou-se também que o ácido cítrico não é necessário, pois durante o período pós-prandial há produção de ácido clorídrico, que pode substituí-lo. Concluímos que em 1h de jejum, com e sem o ácido cítrico é possível aplicar o ^{13}C -UBT sem alterar a eficácia do diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*, Carbono-13, UBT, diagnóstico

SUMÁRIO

Introdução	12
Revisão de Literatura.....	15
Metodologia.....	23
<i>Delineamento Experimental</i>	23
<i>Pacientes</i>	23
^{13}C -UBT.....	23
<i>Turnover do ^{13}C</i>	24
<i>Questionário</i>	24
<i>Análise Isotópica</i>	24
<i>Análise Estatística</i>	26
Resultados.....	27
Discussão	33
Conclusão	37
Referências Bibliográficas	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Influência do jejum e necessidade de ácido cítrico no teste respiratório com ureia marcada com ^{13}C . *Turnover* médio do ^{13}C com erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* para cada tempo de jejum: 1h, 2h, 4h, 6h com ácido cítrico (ac.) e sem ácido cítrico em 1h. As letras minúsculas (a,b,c) indicam a análise estatística; letras iguais não houve diferença significativa e letras diferentes houve diferença estatística. Foi utilizado o método Tukey com 95% de confiança. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal

..... 28

Figura 2: Influência do Jejum no Teste Respiratório com Ureia Marcada com ^{13}C em pacientes não infectados pelo *Helicobacter pylori*: *Turnover* médio do ^{13}C , com erro padrão dos 5 pacientes não infectados pelo *H. pylori* para cada tempo de jejum: 1h, 2h, 4h, 6h com ácido cítrico. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal. 28

Figura 3: Intensidade de DOB x atividade física. *Turnover* médio do ^{13}C e erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* separados em praticantes (18) e não praticantes (17) de atividade física para cada tempo de jejum. **A:** 1h de jejum sem ácido cítrico. **B:** 1h de jejum com ácido cítrico. **C:** 2h de jejum com ácido cítrico. **D:** 4h de jejum com ácido cítrico. **E:** 6h de jejum com ácido cítrico. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal.

..... 30

Figura 4: Intensidade de DOB x consumo de bebidas alcoólicas. *Turnover* médio do ^{13}C e erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* separados por consumo (23) e não consumo (12) de bebidas alcoólicas para cada tempo de jejum. **A:** 1h de jejum sem ácido cítrico. **B:** 1h de jejum com ácido cítrico. **C:** 2h de jejum com ácido cítrico. **D:** 4h de jejum com ácido cítrico. **E:** 6h de jejum com ácido cítrico. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal. 31

Figura 5: Intensidade de DOB x tabagismo. *Turnover* médio do ^{13}C e erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* separados por fumantes (5) e não fumantes (30) para cada tempo de jejum. **A:** 1h de jejum sem ácido cítrico. **B:** 1h de jejum com ácido cítrico. **C:** 2h de jejum com ácido cítrico. **D:** 4h de jejum com ácido cítrico. **E:** 6h de jejum com ácido cítrico. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal. 32

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

^{13}C-UBT	“Urea breath test” - Teste respiratório com ureia marcada com ^{13}C
^{13}C-ureia	Ureia marcada com ^{13}C
^{14}C-UBT	Urea breath test” - Teste respiratório com ureia marcada com ^{14}C
^{14}C-ureia	Ureia marcada com ^{14}C
ABCA-IRMS	“ <i>Automated breath carbon analyzer - isotope ratio mass spectrometer</i> ” - Espectrômetro de massa de razão isotópica - analisador automático de carbono no Sopro
DOB	“Delta over baseline” - Variação entre basal e amostra
EDA	Endoscopia digestiva Alta
H. pylori	Helicobacter pylori
HE	Hematoxilina-eosina
MALT	“Mucosa-associated lymphoid tissue” - Tecido linfóide associado à mucosa
NDIRS	“Nondispersive isotope-selective infrared spectroscope” - Espectroscópio infravermelho seletivo de isótopos não dispersivos
PDB	“Pee Dee Belemnite” - Padrão internacional para análise isotópico do Carbono
R	Razão isotópica
ROC	“Receiver operating characteristic curve” - Curva característica para determinar valor de corte
$\delta^{13}\text{C}$	Enriquecimento isotópico

INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é um microrganismo espiralado, gram-negativo (HUANG *et al.*, 2016; MARSHALL; WARREN, 1984) que tem a capacidade de habitar a mucosa gástrica, tem sido associado a doenças digestivas como gastrites, úlceras, linfoma MALT e carcinoma (ATKINSON; BRADEN, 2016; DEBONGNIE *et al.*, 1991; JORDAAN; LAURENS, 2008; MIFTAHUSSURUR; YAMAOKA, 2016; SUERBAUM; MICHETTI, 2002), e foi identificado por Marshall e Warren no início dos anos 80 (MARSHALL; WARREN, 1984). Devido à importância dessa descoberta Marshall e Warren foram premiados com o Nobel de Fisiologia e Medicina em 2005.

Atualmente cerca de metade da população mundial está infectado pelo *H. pylori* (ATKINSON; BRADEN, 2016; LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2002; PELETEIRO *et al.*, 2014), com prevalência de um terço da população no norte da Europa e América do Norte e de 50% na América do Sul, Ásia e sul da Europa (EUSEBI; ZAGARI; BAZZOLI, 2014). A prevalência da infecção aumenta conforme o baixo nível socioeconômico (EUSEBI; ZAGARI; BAZZOLI, 2014; LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2002; MENTIS; LEHOURS; MÉGRAUD, 2015), outros fatores como falta de saneamento básico, acesso à água potável, higiene básica e superpopulação também podem estar associados a infecção (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Com isso, a infecção pelo *H. pylori* tornou-se um problema de saúde pública, principalmente, porque boa parte da população infectada é assintomática. As formas de transmissão da infecção por *H. pylori* são através do contato com fezes ou vômito, portanto a infecção ocorre geralmente de forma indireta, através de água ou alimentos infectados (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002; LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2002; TONKIC *et al.*, 2012).

Para eficiência do tratamento, faz-se necessário um diagnóstico correto da presença do *H. pylori*, onde os métodos estão divididos entre os invasivos e não invasivos. Nos métodos invasivos, por meio da endoscopia digestiva alta – EDA e com biópsias, apresenta-se: a histopatologia; detecção direta de atividade da enzima urease do *H. pylori* no tecido gástrico, e a cultura de células. Entre os métodos não invasivos estão o teste fecal, sorologia e o teste respiratório, sendo este último mais recomendado e prático (LEAL *et al.*, 2011; MODAK, 2007; PIZZOFERRATO *et al.*, 2013).

O teste respiratório com ureia marcada com ^{13}C (^{13}C -UBT – *Urea Breath Test*) consiste na análise a razão isotópica do sopro do paciente, antes e após a ingestão de uma solução de ácido cítrico com ureia marcada com ^{13}C (^{13}C -ureia). A escolha da ureia como substrato se deve à produção da enzima urease pelo *H. pylori* e o ácido cítrico é adicionado ao substrato, pois o ambiente gástrico deve ter um pH ácido para estimular a produção dessa enzima e retardar o esvaziamento gástrico (GISBERT; PAJARES, 2004; GRAHAM *et al.*, 1999; SCHOEP *et al.*, 2010).

Desde a proposta inicial do ^{13}C -UBT (GRAHAM *et al.*, 1987), vários estudos surgiram com o intuito de obter um protocolo único de aplicação para o teste. Atualmente chegou-se a um consenso sobre: (1) a quantidade de ^{13}C -ureia, sendo 50 mg para crianças e 75 mg para adultos na abundância isotópica de 99 átomos% com administração via oral (GISBERT; PAJARES, 2004; GRAHAM *et al.*, 2001; LEAL *et al.*, 2011); (2) o uso de drogas como antibióticos e inibidor de bomba de prótons (omeprazol) deve ser evitado por quatro e duas semanas respectivamente (CONNOR *et al.*, 1999; SELGRAD; KANDULSKI; MALFERTHEINER, 2009; SHIRIN *et al.*, 2003); (3) o valor de corte entre 2 e 4 ‰ (CAMPUZANO-MAYA, 2007; KOPÁCOVÁ *et al.*, 2005; MANA *et al.*, 2001); (4) o tempo para coleta do sopro pelo paciente após a ingestão da ^{13}C -ureia no intervalo entre 10 e 30 min, (CALVET *et al.*, 2009; MANA *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2016); (5) e quantidade de ácido cítrico

que varia entre 1 e 4 g diluídos em 200 ml de água ou suco de laranja ou maçã (GRAHAM *et al.*, 1999; KOPÁCOVÁ *et al.*, 2005; KWON *et al.*, 2015; LEODOLTER *et al.*, 1999).

Entretanto, o ácido cítrico possui sabor azedo dificultando a aplicação do ^{13}C -UBT em crianças, idosos e pessoas com paladar mais sensível. Uma alternativa é o suco natural de frutas cítricas como laranja ou maçã, contudo o açúcar adicionado ao suco pode interferir no diagnóstico final da infecção, ou oxidar devido ao armazenamento. Já o tempo de jejum para aplicação do ^{13}C -UBT, não possui consenso, além de existir controvérsias na literatura quanto ao melhor tempo de jejum para aplicação do teste. Há autores que dizem não haver a necessidade de jejum e autores que utilizam até 12h de jejum (GRAHAM *et al.*, 2001; MANA *et al.*, 2001; PACHECO *et al.*, 2013). Além disso, na prática clínica ou mesmo em pesquisa, a necessidade do jejum dificulta a aplicação do exame.

Assim as duas hipóteses para esse trabalho foram: (1) não estar em jejum altera o resultado final no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*; (2) se o jejum não é necessário, o ácido cítrico pode ser substituído pela acidez endógena pós-prandial no ^{13}C -UBT. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar a necessidade do jejum e do ácido cítrico nos protocolos de aplicação do ^{13}C -UBT para detecção da infecção do *H. pylori* em pacientes adultos com diferentes hábitos cotidianos.

REVISÃO DA LITERATURA

O *H. pylori* pode ser encontrado na mucosa gástrica e está associado a doenças gástricas como gastrites crônicas e antrais, úlceras duodenais e gástricas, linfoma MALT (tecido linfoide associado à mucosa) e carcinoma (DEBONGNIE *et al.*, 1991; DI RIENZO *et al.*, 2013; GRAHAM, 2015; MITCHELL *et al.*, 2016; SUERBAUM *et al.*, 1998; SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

O *H. pylori* é um microrganismo espiralado, gram-negativo (HUANG *et al.*, 2016; MARSHALL; WARREN, 1984), que tem a capacidade de trocar material genético com outras bactérias da mesma espécie, conferindo-lhe mais resistência (FALUSH *et al.*, 2001; SUERBAUM; MICHETTI, 2002). Além disso, o *H. pylori* codifica diversas proteínas como a enzima urease (ALM *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2016; TOMB *et al.*, 1997) e possui um flagelo que se adapta ao ambiente ácido e se fixa firmemente em células epiteliais gástricas, contribuindo para que a bactéria adentre e habite a mucosa gástrica (HUANG *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016; SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

Esse microrganismo possui canais de ureia que controlam a atividade enzimática da urease, sendo que em pHs ácidos, esses canais se abrem, e em pHs neutros eles se fecham (MOBLEY; HAUSINGER, 1989; SUERBAUM; MICHETTI, 2002), por isso a necessidade da adição do ácido cítrico junto à ureia. A enzima hidrolisa a ureia em dióxido de carbono e amônia, onde o CO₂ é absorvido pela corrente sanguínea e exalado nos pulmões, enquanto a amônia tem como principal função aumentar o pH do ambiente gástrico, como um sistema de defesa para que o *H. pylori* sobreviva nesse ambiente predominantemente ácido (MACHADO *et al.*, 2006; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995; SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

A infecção por *H. pylori* pode causar gastrite crônica na maioria das pessoas infectadas recidivamente (DEBONGNIE *et al.*, 1991; DI RIENZO *et al.*, 2013; MITCHELL *et al.*, 2016),

contudo grande parte da população infectada é assintomática (EUSEBI; ZAGARI; BAZZOLI, 2014; SUERBAUM; MICHETTI, 2002). A infecção por *H. pylori* também pode causar gastrite antral que possivelmente evolui para úlceras duodenais; em outros casos o paciente infectado pode desenvolver úlceras gástricas que podem evoluir para carcinoma; e ainda a infecção pode induzir a formação de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) (SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

O *H. pylori* é o microrganismo mais prevalente na população mundial e considerado um agente cancerígeno, fator de risco para câncer gástrico (GRAHAM, 2015; HUANG *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014). O câncer, de modo geral, tornou-se um grande problema de saúde pública, cerca de 20 milhões de pessoas no mundo sofrem com essa doença e, no Brasil, há 600 mil novos casos por ano (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER/MINISTÉRIO DA SAUDE, 2015). Segundo o mesmo Instituto, para 2016 estimou-se 7600 novos casos de câncer de estômago em mulheres e 12920 em homens, sendo este o segundo mais frequente em homens nas regiões norte e nordeste do Brasil (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER/MINISTÉRIO DA SAUDE, 2015). O câncer de estômago está fortemente associado à prevalência da infecção pelo microrganismo *H. pylori* há longo tempo (GRAHAM, 2015; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER/MINISTÉRIO DA SAUDE, 2015; JORDAAN; LAURENS, 2008; MIFTAHUSSURUR; YAMAOKA, 2016; PELETEIRO *et al.*, 2014), por isso existe a necessidade do tratamento desse microrganismo, principalmente em pacientes assintomáticos.

O tratamento mais recomendado para a infecção pelo *H. pylori* é claritromicina, amoxicilina e/ou metronidazol (antibióticos) e uma dose padrão de inibidores de bomba de prótons (omeprazol) duas vezes ao dia durante sete dias (COELHO *et al.*, 2013; SELGRAD; KANDULSKI; MALFERTHEINER, 2009). O diagnóstico pode ser realizado através de métodos invasivos e não invasivos. Entre os invasivos, por meio da endoscopia digestiva alta –

EDA com biópsias, estão: (1) a histopatologia, caracterizada pela análise microscópica do tecido da biópsia, utiliza técnicas como hematoxilina-eosina (HE), revelando células infectadas pela mudança de coloração (EGUCHI *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2007); (2) a detecção direta de atividade da urease do *H. pylori* no tecido gástrico, que é feita através da coloração do meio com ureia e indicador de pH (SIQUEIRA *et al.*, 2007; UOTANI; GRAHAM, 2015); (3) e a cultura de células, em meio não seletivo como ágar sangue, no qual obteve-se melhores resultados, devido ao alto custo é mais utilizado para pesquisa (LOGAN *et al.*, 1991; PENG *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2007).

A análise histopatológica é o padrão ouro utilizado no Brasil para a detecção dessa infecção, sendo caracterizada pela aplicação de alta complexidade, principalmente em crianças e idosos, devido à necessidade em alguns casos de sedação. Apesar do desconforto ao paciente, este exame é predominante para o diagnóstico pois possui um baixo custo se comparado a outros métodos invasivos, além da infraestrutura para realização da endoscopia gástrica simultaneamente à coleta de biópsia gástrica (COSTA *et al.*, 2013). Entre os métodos não invasivos estão o teste fecal e o teste respiratório, sendo esse último mais eficaz e seguro.

Além do desconforto ao paciente, a EDA tem custo que varia entre R\$300 e R\$500, em contrapartida o custo para a realização do ^{13}C -UBT é aproximadamente R\$55 (SANT'ANA FILHO *et al.* 2013). Indicando que o ^{13}C -UBT é um método não invasivo e rápido e, seu custo é inferior se comparado à EDA.

No teste respiratório é necessária a administração via oral de um substrato marcado no Carbono para a detecção da infecção por *H. pylori*, inicialmente utilizava-se ureia marcada com ^{14}C , um radionuclídeo ou radioisótopo, emissor de radiação ionizante (DEBONGNIE *et al.*, 1991; STUBBS; MARSHALL, 1993). Devido à produção da enzima urease pelo microrganismo, sugeriu-se o uso da ureia como substrato para o teste respiratório, dessa forma, quando havia ingestão da ^{14}C -ureia, essa enzima hidrolisava a molécula de ureia formando dois

compostos principais, a amônia (NH_3) e o dióxido de carbono marcado ($^{14}\text{CO}_2$), sendo que o dióxido de ^{14}C é levado pela corrente sanguínea até os pulmões onde era expirado (DESROCHES *et al.*, 1997; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). Um líquido cintilador é adicionado à amostra de expiração e as cintilações contadas por meio de um contador de cintilação líquida ou detector de radiação (BRADEN *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2013; DEBONGNIE *et al.*, 1991; DESROCHES *et al.*, 1997) com a detecção da radiação (contagem das cintilações) nas amostras de ar exalado, o teste é positivo para a infecção. A atividade do ^{14}C empregado varia entre 1 e 5 μCi (DEBONGNIE *et al.*, 1991; DEDE *et al.*, 2015; DESROCHES *et al.*, 1997; OZTÜRK *et al.*, 2003; RASOOL; ABID; JAFRI, 2007). Devido às limitações do uso de radioisótopos, principalmente em crianças e gestantes, o teste respiratório como ^{14}C começou a ser substituído por ^{13}C (BAILEY, 2002; COSTA *et al.*, 2013).

Atualmente também se utiliza o ^{13}C para a aplicação do teste respiratório com ureia (^{13}C -UBT – “*Urea Breath Test*”) devido a suas propriedades de elemento estável, sendo que o ^{13}C é um isótopo estável, ou seja, não emite radiação. Os isótopos são elementos que possuem o mesmo número de prótons e diferente número de nêutrons no núcleo atômico, assim isótopos estáveis são aqueles que não decaem formando outros átomos. Usualmente, eles são mensurados por meio da razão isotópica, definida pela razão do isótopo raro ou menos abundante na natureza, pelo isótopo mais abundante na natureza, como exemplo, a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ para o Carbono. A abundância é definida pela proporção natural (%Atomos) de cada elemento na natureza ou em organismos de origem biológica, para o Carbono, o ^{12}C tem abundância natural de aproximadamente 98,8890 %Atomos e o ^{13}C tem abundância de 1,1110 %Atomos (BOUTTON, 1991; ZANASI *et al.*, 2006).

Os equipamentos mais utilizados para medir a razão isotópica em amostras de sopro são o espectrômetro de massa de razão isotópica e o espectroscópio de infravermelho seletivo de isótopo não dispersivo. A diferença entre os dois equipamentos é a precisão e o volume de

amostra, o IRMS (*Isotope Ratio Mass Spectrometer*) é mais preciso, contudo tem um custo inicial mais elevado se comparado ao NDIRS (*Non-Dispersive Isotope-Selective Infrared Spectroscope*) (MUCCIO; JACKSON, 2009; SAVARINO *et al.*, 1999, 2000). O NDIRS apesar de mais barato e prático apresenta menor sensibilidade e especificidade em comparação com o IRMS (KATO *et al.*, 2004; MODAK, 2007). O IRMS possui maior aplicabilidade, podendo analisar amostras gasosas, sólidas e líquidas dos seguintes elementos: Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre (MUCCIO; JACKSON, 2009; WIESER; BRAND, 1999).

O IRMS é composto de um sistema de admissão, ionização, deflexão e analisador coletor. No sistema de admissão a amostra é oxirreduzida (somente para amostras sólidas e líquidas) e o CO₂ obtido é conduzido até o ionizador por meio de um gás de arraste (Hélio). No ionizador a amostra é ionizada e conduzida, sob vácuo, através da atração elétrica passando por um campo magnético onde é defletida. Quando os íons chegam no analisador, cada trajetória será traçada de acordo com a razão massa/carga do feixe de íons. Os coletores convertem as cargas dos íons em sinais elétricos amplificados pelo computador. O IRMS proporciona dados de alta precisão, da ordem de 0,1 ‰ (MUCCIO; JACKSON, 2009; WIESER; BRAND, 1999).

O software nos fornece resultados da razão isotópica em enriquecimento relativo isotópico do ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$) que relaciona a razão isotópica da amostra e do padrão internacional, *Pee Dee Belemnite* (PDB), em per mil (‰) (BOUTTON, 1991; JORDAAN; LAURENS, 2008; MUCCIO; JACKSON, 2009). Os resultados fornecidos pelo equipamento são transformados em DOB (*Delta Over Baseline*), que é utilizado internacionalmente para testes respiratórios com isótopos estáveis, e consiste na subtração do $\delta^{13}\text{C}$ da amostra pelo basal, e é dado em per mil (‰) (KAWAKAMI *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2006; MAITY *et al.*, 2014).

Atualmente, existe um modelo específico de IRMS próprio para análise de CO₂, onde as amostras da expiração são colocadas em tubos de 12 ml, que facilitam a aplicação e análise

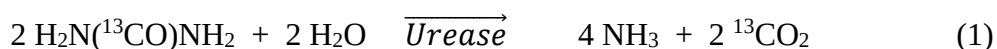
do ^{13}C -UBT. Este modelo, chamado de ABCA-IRMS “*Automated Breath Carbon Analyser-IRMS*” é automático, muito mais prático para análise de amostras gasosas.

No final dos anos oitenta, quando Graham propôs o ^{13}C -UBT (GRAHAM *et al.*, 1987) este teste passou a ser amplamente estudado. Muitos autores pesquisaram sobre a dose de ^{13}C -ureia ideal a ser administrada (CAMPUZANO-MAYA, 2007; GRAHAM *et al.*, 2001; SAVARINO *et al.*, 2000), se o ácido cítrico era necessário (CAMPUZANO-MAYA, 2007; DOMÍNGUEZ-MUÑOZ *et al.*, 1997; LEODOLTER *et al.*, 1999), e qual seria o valor de corte (GISBERT; PAJARES, 2004; MANA *et al.*, 2001; MAURO *et al.*, 2006). O valor de corte é o ponto no qual acima desse valor o paciente está infectado pelo *H. pylori*. Esse valor é encontrado pela comparação do ^{13}C -UBT com o padrão ouro, a histopatologia por meio da EDA, onde se quantificam os pacientes verdadeiramente positivos e negativos pelo padrão ouro e pelo teste em busca da sensibilidade e especificidade, determinando a curva ROC (*Receiver operating characteristic curve*) e consequentemente o valor de corte. (MAITY *et al.*, 2014; SOM *et al.*, 2014).

Entre os protocolos de aplicação, o jejum é um dos parâmetros que ainda não foi padronizado. Estudos provaram que o jejum é benéfico ao corpo humano pois estimula a autofagia (MOCHIDA *et al.*, 2015; OHSUMI, 2014; YAMASAKI *et al.*, 2016). O mecanismo de autofagia contribui para o metabolismo celular, fornecendo energia, proporcionando limpeza das células, com a degradação e eliminação de substâncias nocivas além de ser importante na supressão tumoral (LEVINE; KROEMER, 2008; OHSUMI, 2014) e devido esses estudos o pesquisador japonês Yoshinori Oshumi foi laureado com Nobel de Medicina e Fisiologia de 2016. Entretanto, para realização de exames, o jejum é uma prática desconfortável ao paciente, muitas vezes já debilitado, por isso alguns pesquisadores propuseram o fim do jejum para determinados exames de sangue como perfil lipídico (ANDERSON *et al.*, 2016; DRIVER *et al.*, 2016; LANGSTED; NORDESTGAARD, 2015). Dessa forma, no Brasil foi elaborado o

Consenso Brasileiro para a Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS *et al.*, 2016) afim de definir procedimentos para exame laboratorial pós-prandial.

O ^{13}C -UBT consiste da seguinte forma: o paciente ingere a ^{13}C -ureia e o ácido cítrico diluídos em 200ml de água, assim a enzima urease, produzida pelo *H. pylori* age hidrolisando a ureia ingerida em amônia e dióxido de carbono ($^{13}\text{CO}_2$) (equação 1) (MOBLEY; HAUSINGER, 1989; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995). Portanto quando o paciente está infectado há diferença na análise isotópica do sopro entre esses dois momentos; antes e após a ingestão da ureia, se o paciente não está infectado, não ocorre essa reação de hidrólise da ureia, que será eliminada possivelmente pela urina. Importante ressaltar que por intermédio do ^{13}C -UBT é possível diagnosticar a infecção em sua forma ativa, essencial para indicação de tratamento.



A forma de obter um diagnóstico do *H. pylori*, por meio do ^{13}C -UBT, é por meio da análise da expiração do paciente, mas existem alguns fatores como: tabagismo, consumo de álcool, prática de atividade física e índice de massa corporal que podem interferir no padrão de produção de CO_2 e, conseqüentemente, influenciar no resultado final (FRAY; JOHNSON, 2008; LUCE, 1980; RAVUSSIN *et al.*, 1986).

O ^{13}C -UBT é um teste não invasivo, simples e seguro, que proporciona excelente precisão (BRADEN, 2009; LEAL *et al.*, 2011; MAITY *et al.*, 2014), tanto para o diagnóstico inicial de infecção por *H. pylori* quanto para a confirmação de sua erradicação após o tratamento (COELHO *et al.*, 2013; GISBERT; PAJARES, 2005), pois possui sensibilidade e especificidade de cerca de 95% comparado ao padrão ouro (FERWANA, 2015; GISBERT; PAJARES, 2004; MIFTAHUSSURUR; YAMAOKA, 2016). Vale lembrar que o 3º Consenso

Brasileiro sobre *H. pylori* recomendou o ^{13}C -UBT para verificar a erradicação dessa infecção após o tratamento (COELHO *et al.*, 2013).

METODOLOGIA

Delineamento Experimental

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu, parecer nº 292.236. Primeiramente, foram selecionados pacientes infectados e não infectados por meio do ^{13}C -UBT e aplicado um questionário sobre os hábitos cotidianos. Em seguida foi obtido o *turnover* do ^{13}C nos tempos de jejum de 1h, 2h, 4h e 6h com ácido cítrico e de 1h sem ácido cítrico nos pacientes que concordaram em continuar na pesquisa.

Pacientes

Os critérios de seleção dos pacientes foram: idades entre 18 e 65 anos, não ter ingerido antibióticos por quatro semanas e inibidor de bomba de prótons (omeprazol) por duas semanas. Participaram, inicialmente, 129 voluntários, para a seleção de infectados e não infectados pelo *H. pylori*. Em seguida, 35 pacientes infectados e 5 não infectados, identificados anteriormente, aceitaram fazer o ^{13}C -UBT nos tempos de jejum de 1h, 2h, 4h e 6h com ácido cítrico. Destes, 30 pacientes infectados participaram do ^{13}C -UBT em 1h de jejum sem ácido cítrico.

^{13}C -UBT

O ^{13}C -UBT foi aplicado da seguinte forma: primeiro o sopro do paciente foi coletado em duplicata, por meio de tubos de 12 ml com tampa rosqueada, sendo a primeira a amostra basal, em seguida o paciente ingeriu o substrato, composto de 75 mg de ^{13}C -ureia (99 % Átomos de ^{13}C) e 1,4 g de ácido cítrico, diluído em 200 ml de água; depois de 15 min o sopro foi coletado novamente em outros dois tubos. Para o ^{13}C -UBT a ^{13}C -ureia utilizada foi importada da empresa AB Analítica Advanced Biomedicine. A coleta do sopro foi realizada em duplicatas para a garantia dos resultados.

Turnover do ^{13}C

O *turnover* do ^{13}C de cada paciente, em cada tempo de jejum com e sem ácido cítrico, foi obtido por meio do ^{13}C -UBT. Para isso o ^{13}C -UBT foi aplicado da seguinte maneira: inicialmente o sopro do paciente foi coletado, por meio de dois tubos de 12 ml com tampa rosqueada; em seguida o paciente ingeriu o substrato, composto de 75 mg de ^{13}C -ureia (99 %Átomos de ^{13}C) e 1,4 g de ácido cítrico, diluído em 200 ml de água; em seguida o sopro foi coletado novamente em outros dois tubos a cada 2 min 30 s até 30 min e a cada 5 min até 45 min. Para o *turnover* do ^{13}C nos tempos de jejum com ácido cítrico a ^{13}C -ureia utilizada foi importada da empresa AB Analitica Advanced Biomedicine. Para o *turnover* do ^{13}C no tempo de 1h sem o ácido cítrico a ^{13}C -ureia (99 %Átomos de ^{13}C) utilizada foi sintetizada pelo Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

Questionário

Todos os voluntários responderam um questionário para relacionar o *turnover* de ^{13}C de cada paciente e seus hábitos cotidianos. No questionário havia a identificação de cada paciente: nome, endereço, identidade, contato. Em seguida, foi dividido em três partes: tabagismo, atividade física e bebidas alcoólicas. Sobre o tabagismo foi questionado: fumante, sim ou não. Quanto à prática de atividade física: sim ou não, se sim, qual e frequência por semana: 1 vez, entre 2 e 3 vezes ou mais que 3 vezes. Para bebidas alcoólicas foi perguntado: sim ou não, e frequência por semana: 1 vez, entre 2 e 3 vezes ou mais que 3 vezes.

Análise Isotópica

Para a aplicação do ^{13}C -UBT foram utilizados 4 tubos para cada um dos 129 pacientes, totalizando 516 tubos. Para o *turnover* do ^{13}C nos tempos de jejum com ácido cítrico foram utilizados 32 tubos para cada um dos 40 pacientes para cada um dos 4 tempos de jejum, completando 5120. Para o *turnover* do ^{13}C no tempo de jejum de 1h sem o ácido cítrico foram

utilizados 32 tubos para cada um dos 30 pacientes, totalizando 960 tubos. Assim, ao final do experimento foram analisados cerca de 6596 tubos.

As amostras de sopro foram analisadas pelo ABCA-IRMS. A análise foi feita no máximo uma semana após a realização do ^{13}C -UBT e, em cada sequência de análise cerca de 100 tubos eram analisados, com tempo de 170 s por tubo. Para a sequência de análise as amostras eram organizadas da seguinte maneira: primeiro um tubo, também de 12 ml, contendo o gás Hélio (He) era colocada, para a limpeza do equipamento evitando qualquer efeito de memória, em seguida um tubo, também de 12 ml, contendo padrão com razão isotópica conhecida era colocado, para assegurar a confiança dos resultados, depois as amostras da expiração eram dispostas na sequência e por fim outro tubo contendo outro padrão.

O ABCS-IRMS mede a razão isotópica (R) de cada amostra, definida pela razão entre o elemento raro ou menos abundante (^{13}C) e o elemento mais abundante (^{12}C) e, através do software, calcula-se o enriquecimento relativo isotópico ($\delta^{13}\text{C}$) como mostra a equação (2), comparando os valores de razão isotópica (R) com o padrão internacional para o Carbono, PDB (*Pee Dee Belmnite*). Por meio do enriquecimento relativo isotópico ($\delta^{13}\text{C}$), o DOB (*Delta Over Baseline*), utilizado como grandeza internacionalmente para testes respiratórios, é definido pela comparação entre a amostra de sopro ao longo do tempo e amostra de sopro basal. O DOB foi calculado para cada amostra conforme equação (3).

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left(\frac{R_{\text{Amostra}}}{R_{\text{Padrão(PDB)}}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (2)$$

Onde R_{Amostra} é a razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) na amostra de CO_2 expirado e $R_{\text{Padrão(PDB)}}$ é a razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) do padrão internacional para o Carbono (PDB) sendo que

$$R_{\text{Padrão(PDB)}} = 0,0112372.$$

$$\text{DOB} (\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{Amostra}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Basal}} \quad (3)$$

Análise estatística

O tamanho amostral adequado foi calculado considerando 4 tempos de jejum, $\alpha=0.05$, com desvio padrão de 5,5 e com poder do teste estatístico igual ou superior a 90%. O tamanho dimensionado da amostra com 40 voluntários apresenta um poder do teste igual a 93%, aproximadamente. Para cada tempo de jejum foi construído também a curva média com intervalos de confiança de 95%.

Para análise estatística, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de modelos lineares multivariados para estudar a possível relação da variável resposta DOB com os tempos de jejum, tempo de coleta, tabagismo, consumo de álcool e prática de atividade física codificados como variáveis indicadores. Para comparações das médias das variáveis, foram realizadas as análises de comparações múltiplas de médias, utilizando o teste de Tukey. Todos os testes estatísticos que apresentam valor p menor que 5%, ($p<0,05$) são considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico Minitab versão 16, os gráficos foram gerados pelo software OriginPro versão 8.

RESULTADOS

Na seleção de voluntários, participaram 129 pacientes, sendo que 39 foram diagnosticados com infecção por *H. pylori* e 90 não apresentaram a infecção. Após o convite, 35 voluntários infectados e 5 não infectados aceitaram continuar participando da pesquisa, dessa forma, participaram 40 pacientes, 16 mulheres e 24 homens.

A Figura 1 apresenta o *turnover* médio do ^{13}C nos tempos de jejum de 1h, 2h, 4h e 6h com ácido cítrico, em 1h sem esse ácido e a linha de corte. Apesar do *turnover* do ^{13}C apresentar menor valor em menores tempos de jejum, não observamos resultados falso-negativos. Importante ressaltar que não houve diferença estatística entre os tempos de 1h, 2h com ácido cítrico e 1h sem ácido.

Observa-se na Figura 2 o *turnover* médio do ^{13}C , em pacientes não infectados pelo *H. pylori* em cada tempo de jejum: 1h, 2h, 4h, 6h. Nota-se que os maiores valores estão em torno de 1,25‰, abaixo do valor de corte de 3‰, indicando que não há resultados falso positivos devido aos diferentes tempos de jejum.

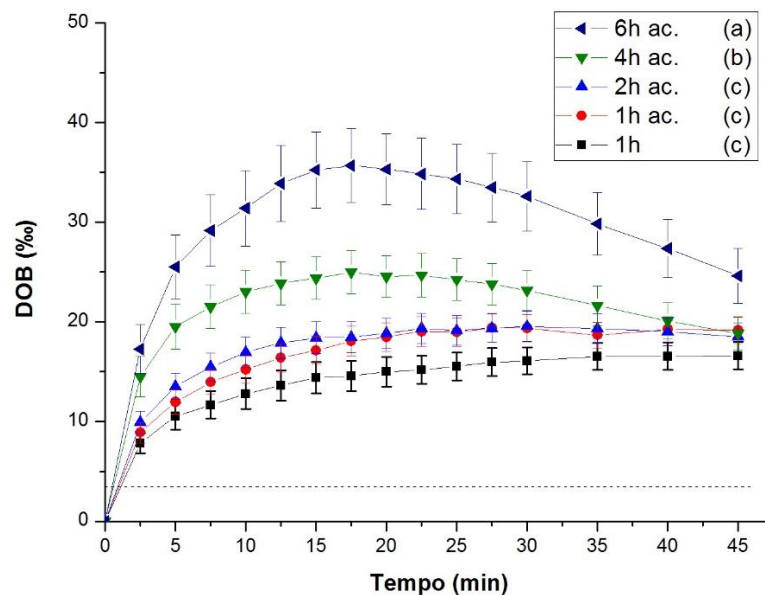


Figura 1: Influência do jejum e necessidade de ácido cítrico no teste respiratório com ureia marcada com ^{13}C . Turnover médio do ^{13}C com erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* para cada tempo de jejum: 1h, 2h, 4h, 6h com ácido cítrico (ac.) e sem ácido cítrico em 1h. As letras minúsculas (a,b,c) indicam a diferença estatística; letras iguais não houve diferença significativa e letras diferentes houve diferença estatística. Foi utilizado o teste de Tukey com 95% de confiança. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal.

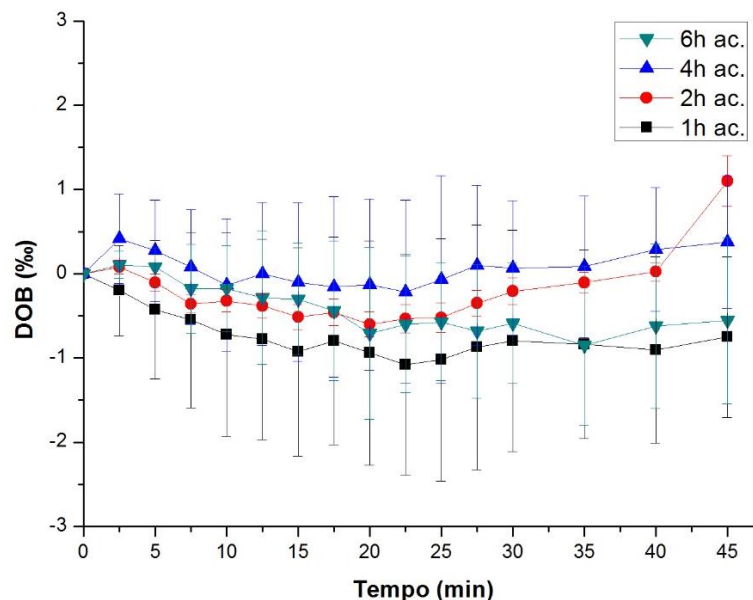


Figura 2: Influência do Jejum no Teste Respiratório com Ureia Marcada com ^{13}C em pacientes não infectados pelo *Helicobacter pylori*: Turnover médio do ^{13}C , com erro padrão dos 5 pacientes não infectados pelo *H. pylori* para cada tempo de jejum: 1h, 2h, 4h, 6h com ácido cítrico. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal.

A Figura 3 apresenta a comparação do *turnover* médio do ^{13}C entre voluntários infectados que praticam, ou não, atividade física para cada tempo de jejum com e sem ácido cítrico. Descritivamente em 1h sem ácido cítrico e 4h com ácido cítrico houve diferença entre os praticantes, ou não. Contudo, a análise estatística mostrou que não há diferença entre eles no mesmo tempo de jejum ($p>0,05$).

A relação entre voluntários infectados que consomem, ou não, bebidas alcoólicas e o comportamento do *turnover* médio do ^{13}C para cada tempo de jejum com e sem ácido cítrico é apresentada na Figura 4. Nota-se que em 1h de jejum, com e sem ácido cítrico e em 2h de jejum os valores de DOB para quem consome, ou não, são muito próximos, e não houve diferença significativa para esses tempos de jejum ($p>0,05$). Para o consumo de álcool há diferença significativa no *turnover* do ^{13}C para consumo ou não de bebidas alcoólicas, no tempo de jejum de 6h ($p<0,001$).

Outra relação avaliada foi o *turnover* médio do ^{13}C entre voluntários infectados fumantes e não fumantes e o valor de DOB para todos os tempos de jejum, com e sem ácido cítrico, que é apresentada na Figura 5. É possível observar que em 1h, 4h e 6h de jejum há uma pequena diferença, descritivamente, entre fumantes, ou não, contudo não há diferença significativa em 1h, 2h e 4h de jejum ($p>0,05$). Há diferença significativa entre os grupos, fumantes ou não, no tempo de jejum de 6h ($p<0,01$).

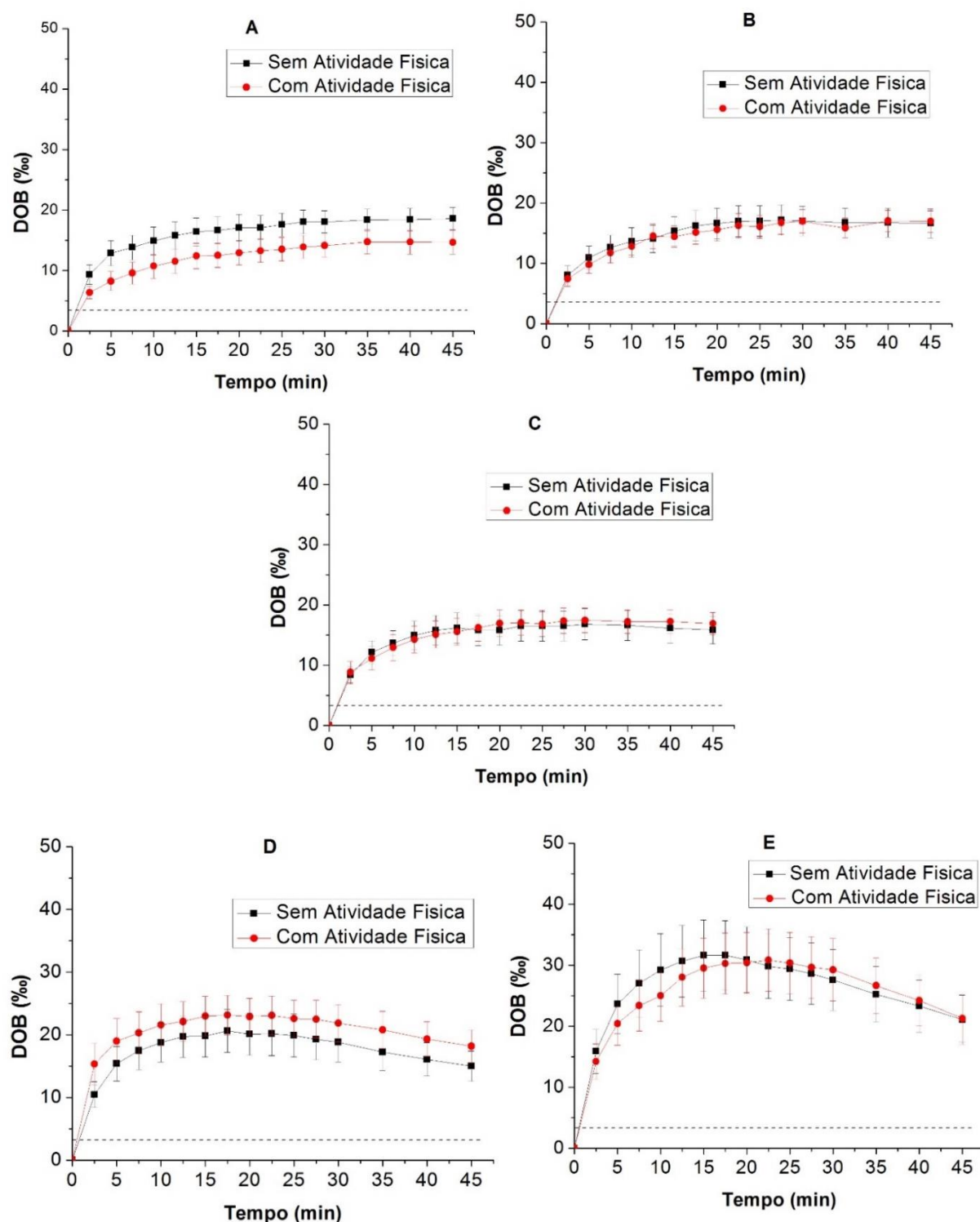


Figura 3: Intensidade de DOB x atividade física. *Turnover* médio do ^{13}C e erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* separados em praticantes (18) e não praticantes (17) de atividade física para cada tempo de jejum. **A:** 1h de jejum sem ácido cítrico. **B:** 1h de jejum com ácido cítrico. **C:** 2h de jejum com ácido cítrico. **D:** 4h de jejum com ácido cítrico. **E:** 6h de jejum com ácido cítrico. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal.

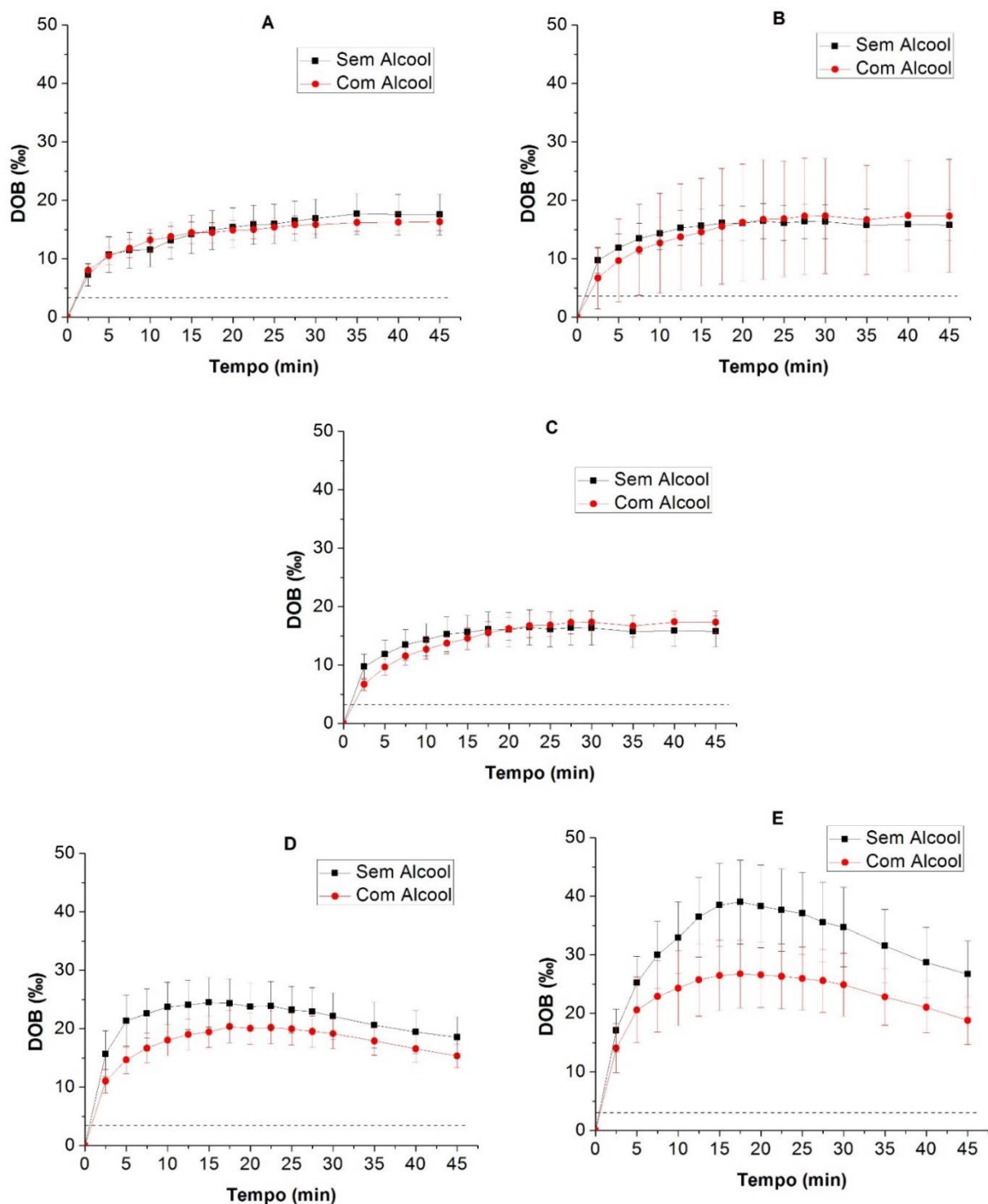


Figura 4: Intensidade de DOB x consumo de bebidas alcoólicas. *Turnover* médio do ^{13}C e erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* separados por consumo (23) e não consumo (12) de bebidas alcoólicas para cada tempo de jejum. **A:** 1h de jejum sem ácido cítrico. **B:** 1h de jejum com ácido cítrico. **C:** 2h de jejum com ácido cítrico. **D:** 4h de jejum com ácido cítrico. **E:** 6h de jejum com ácido cítrico. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal.

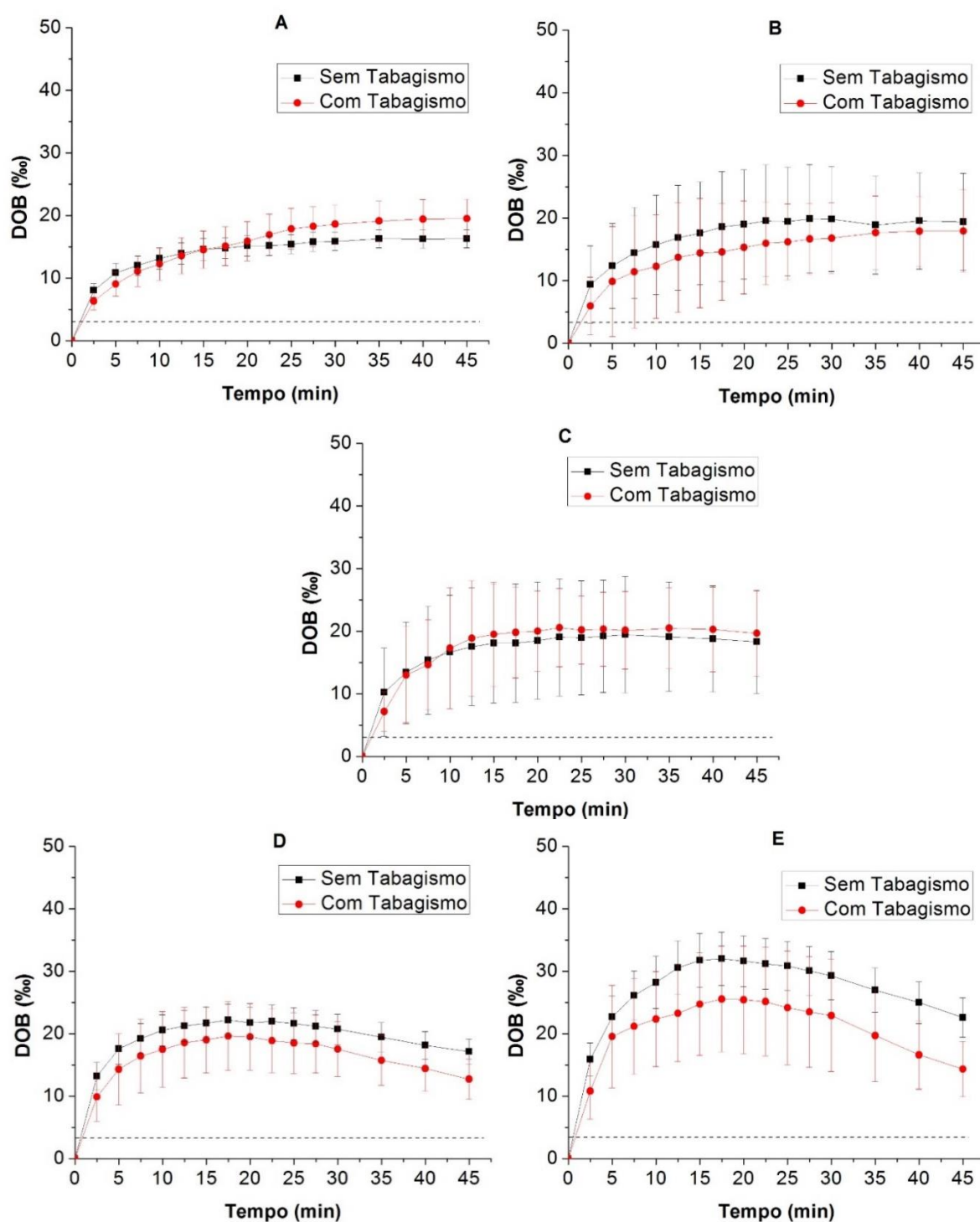


Figura 5: Intensidade de DOB x tabagismo. *Turnover* médio do ^{13}C e erro padrão dos 35 pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* separados por fumantes (5) e não fumantes (30) para cada tempo de jejum. **A:** 1h de jejum sem ácido cítrico. **B:** 1h de jejum com ácido cítrico. **C:** 2h de jejum com ácido cítrico. **D:** 4h de jejum com ácido cítrico. **E:** 6h de jejum com ácido cítrico. A linha tracejada indica o valor de corte de 3‰. DOB (*Delta Over Baseline*), definido pela diferença do valor da razão isotópica da amostra pelo basal.

DISCUSSÃO

Esse estudo buscou testar duas hipóteses, sendo a primeira sobre o jejum não alterar o resultado final no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*; e a segunda sobre o ácido cítrico possivelmente ser substituído pela acidez endógena pós-prandial no ^{13}C -UBT. Os resultados mostram a partir do comportamento do *turnover* do ^{13}C que o jejum, a partir de uma hora, não influencia no ^{13}C -UBT e o ácido cítrico não é necessário em 1h de jejum.

A diferença no *turnover* do ^{13}C entre os tempos de jejum (Figura 1), pode ser devido a diluição isotópica do ^{13}C no organismo. Em 1h de jejum, há um gasto energético maior, uma vez que o organismo está em processo de digestão alimentar, assim há maior volume de CO_2 expirado, diminuindo a razão isotópica no sopro (FRAY; JOHNSON, 2008). Outro fator que pode explicar a variação no *turnover* do ^{13}C entre os tempos de jejum é a presença do bolo alimentar no trato gastrointestinal, que possivelmente reduz a velocidade de absorção do substrato e dificulta a hidrólise da ureia (BOKLAGE *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2006; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995; SOM *et al.*, 2014). Já no jejum de 6h há menor gasto de energia se comparado a 4h, 2h e 1h, portanto menor liberação de volume de CO_2 metabólico, aumentando a razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no sopro, pois a quantidade de ^{13}C ingerida para o ^{13}C -UBT é a mesma.

Foi escolhido o mínimo tempo de jejum de 1h para a aplicação do ^{13}C -UBT, pois na prática clínica frequentemente há um tempo para a realização do exame, somando a isso fatores externos como locomoção até a clínica ou hospital onde será realizado o teste, de forma que o tempo de jejum do paciente no momento do exame não seria menor que 1h.

Em 1h de jejum, sem ácido cítrico, esperava-se que os valores de DOB do *turnover* do ^{13}C fossem menores se comparado ao ^{13}C -UBT sem ácido cítrico (DOMÍNGUEZ-MUÑOZ *et al.*, 1997; GRAHAM *et al.*, 1999; KWON *et al.*, 2015), mas a Figura 1 mostrou que eles são

semelhantes, isso pode ser explicado pela presença da acidez gástrica natural devido a produção endógena de ácido clorídrico durante a digestão alimentar. Outro fator que influencia a produção de ácido clorídrico no estômago durante o ^{13}C -UBT em 1h de jejum é o tempo de esvaziamento gástrico, que é a passagem do bolo alimentar do estômago para o duodeno, em que o meio tempo de esvaziamento gástrico de um indivíduo normal é em média entre 52 e 86 min (BONAZZI *et al.*, 2005; SZARKA *et al.*, 2008), e enquanto há alimento no estômago há produção de ácido clorídrico.

A ^{13}C -ureia utilizada para a aplicação do ^{13}C -UBT em cada tempo de jejum foi produzida pela empresa AB Analitica Advanced Biomedicine Itália, e a ^{13}C -ureia utilizada para o ^{13}C -UBT em 1h de jejum sem o ácido cítrico foi sintetizada no Brasil pelo Laboratório de Isótopos Estáveis - CENA/USP (SANT'ANA FILHO *et al.*, 2013). Uma comparação entre o desempenho da ureia importada e da nacional foi feito e mostrou que ambas tiveram resultados similares, indicando que a ureia nacional é confiável para a realização do ^{13}C -UBT (COELHO *et al.* 2016.)

Foi utilizado o valor de corte de 3‰ nesse estudo pois na literatura esse ponto varia entre 2 e 4‰ (CAMPUZANO-MAYA, 2007; GISBERT; PAJARES, 2004; KOPÁCOVÁ *et al.*, 2005; MANA *et al.*, 2001), além de 3‰ ser um valor médio dessa variação, em nosso laboratório foi feita uma verificação anterior, através da comparação do ^{13}C -UBT e o padrão ouro para esse diagnóstico, obtendo-se o valor de 3‰ (trabalho não publicado). Além disso, para esse trabalho o valor de corte poderia ser 2‰, pois os valores de DOB máximos alcançados, em torno de 1,25‰, para pacientes não infectados não chegam a esse ponto de corte como observado na Figura 2. Como esses pacientes não possuem a infecção, não houve a hidrólise da ^{13}C -ureia, o pequeno aumento na curva logo nos primeiros minutos do teste deve-se possivelmente à outras bactérias naturais da mucosa bucal, que também produzem urease, mas em proporção menor não interferindo no diagnóstico final (LEE *et al.*, 2001).

Na Figura 3 observamos similaridade no *turnover* do ^{13}C entre os voluntários infectados praticantes de atividade física e não praticantes, principalmente em 1h, 2h e 6h de jejum com ácido cítrico. Entretanto esperávamos uma diferença entre praticantes, ou não, pois, adeptos de atividade física possuem maior gasto energético devido ao metabolismo acelerado, aumentando o volume de CO_2 e diminuindo a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, mas isso não foi observado. Uma explicação para isso foi a forma de quantificação da intensidade da atividade física praticada, os dados que obtemos foram da atividade física relatada pelo paciente, passível de erro.

Sabe-se que o índice de massa corporal, consumo de álcool e tabagismo podem influenciar na produção de CO_2 , aumentando o ^{12}C expirado e, consequentemente diminuindo o valor de DOB no ^{13}C -UBT, pois a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ apresentará valores menores, definimos isso como diluição isotópica (FRAY; JOHNSON, 2008; LUCE, 1980; RAVUSSIN *et al.*, 1986). Na Figura 4, mostra o *turnover* médio do ^{13}C em pacientes que consomem ou não bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por semana. Em 6h e 4h de jejum foi observado uma tendência de que voluntários que não consomem tem maior intensidade de DOB, diferindo significativamente em 6h ($p < 0,001$), portanto menor diluição isotópica, uma vez que o organismo desses pacientes não precisa gastar energia para reparar os danos causados por bebidas alcoólicas ao metabolismo. Em 1h de jejum, com e sem ácido cítrico, e 2h com ácido cítrico não se observou diferença significativa na intensidade de DOB, devido à atividade metabólica digestiva consumir energia para ambos.

Na Figura 5, notamos que aqueles que não fumam tem maior valor de DOB, visto mais claramente em 1h, 4h e 6h com ácido cítrico. Em 1h de jejum sem ácido cítrico, 1h e 2h com o ácido não há diferença significativa, possivelmente devido a atividade metabólica digestiva presente em fumantes, ou não. Já para 6h de jejum, há diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos de fumantes e não fumantes. Essa diferença pode ser explicada, principalmente em 6h de jejum, pela diminuição da capacidade respiratória de pessoas adeptas ao tabagismo, uma vez

que o monóxido de carbono, uma das substâncias presentes no cigarro, tem afinidade com a hemoglobina, alterando sua ligação ao oxigênio e consequentemente diminuindo o transporte de O₂ pelas células e a capacidade respiratória (BORBA *et al.*, 2012; LUIS; CORREA, 2005). A presença da nicotina, um potente vasoconstritor, aumenta a pressão arterial e a frequência cardiorrespiratória, diminuindo o fluxo sanguíneo e o transporte de CO₂ que será expirado (BORBA *et al.*, 2012; NUNES; CASTRO, 2011). A nicotina também provoca alteração na digestão alimentar, pois altera a contração gástrica (LUIS; CORREA, 2005) que pode interferir na absorção do ¹³C e consequentemente diminuir a razão isotópica, como observado na Figura 5 em 6h de jejum.

Dessa forma podemos dizer que aqueles que são adeptos do tabagismo e/ou consomem bebidas alcoólicas tem maior volume de CO₂ (FRAY; JOHNSON, 2008; LUCE, 1980), devido ao maior gasto energético produzido para recuperar o organismo dos danos causados pelas substâncias tóxicas do álcool e cigarro. Foi observado que quanto maior o tempo de jejum, maior a diferença entre os grupos, pois o gasto energético do organismo em estado de jejum difere entre os pacientes, principalmente em relação ao consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo. Já em menores tempos de jejum, 1h e 2h com e sem ácido cítrico, não há diferença de valor de DOB, devido ao gasto energético uma vez que há digestão alimentar. Dessa forma o ¹³C-UBT se mantém eficaz e seguro, visto que não encontramos resultados falso-negativos, e em menores tempos de jejum o teste se mantém acurado.

Este é o primeiro estudo que abrange vários tempos de jejum, abordando a influência de fatores que podem interferir no comportamento do *turnover* do ¹³C em cada paciente, uma vez que as curvas diferem em valores de DOB de um paciente para outro, observado principalmente na Figura 1 através do erro padrão e, não há muitos trabalhos que expliquem porque ocorre esse comportamento. (GRAHAM *et al.*, 2001) mostra resultados de aplicação do ¹³C-UBT em dois tempos de jejum, 4h e 1h, com ácido cítrico, contudo ele não utiliza a mesma dose de ¹³C-ureia

para cada tempo, sendo 125 mg em 1h e 75 mg em 4h. Além disso, nesse trabalho, mostramos que a acidez endógena, ácido clorídrico, substitui a acidez exógena, o ácido cítrico.

Em resumo, o ^{13}C -UBT realizado a partir de 1h de jejum, com e sem ácido cítrico, amplia a praticidade do teste e o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* torna-se mais rápido possibilitando sua aplicação em situações emergenciais. Outra questão relevante é que o ácido cítrico tem um sabor azedo devido a acidez, o que dificulta a aplicação do ^{13}C -UBT em crianças, idosos e pessoas com um paladar mais sensível, portanto isso pode ser solucionado com a aplicação do teste em 1h de jejum sem ácido cítrico. Por fim, essa ampliação da aplicabilidade do ^{13}C -UBT facilita avanços em estudos epidemiológicos e farmacológicos.

CONCLUSÃO

Concluimos que o jejum a partir de uma hora não interfere no resultado do ^{13}C -UBT para detecção de *H. pylori* em pacientes adultos, e que pacientes que consomem bebidas alcoólicas, e/ou fumantes e/ou praticam atividade física não apresentam diferença no resultado do ^{13}C -UBT. Além disso, concluimos que o ácido cítrico não é necessário em uma hora de jejum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALM, R. A *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 397, n. February, 1999.
- ANDERSON, L. N. *et al.* Duration of Fasting, Serum Lipids, and Metabolic Profile in Early Childhood. **The Journal of Pediatrics**, v. 180, p. 47–52, 2016.
- ATKINSON, N. S. S.; BRADEN, B. *Helicobacter Pylori* Infection: Diagnostic Strategies in Primary Diagnosis and After Therapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 1, p. 19–24, 21 jan. 2016.
- BAILEY, R. J. Using Breath Tests Wisely in a Gastroenterology Practice : An Evidence-Based Review of Indications and Pitfalls in Interpretation. **The American journal of gastroenterology**, v. 97, n. 5, p. 1113–25, 2002.
- BOKLAGE, S. *et al.* Impact of patient adherence on the cost-effectiveness of noninvasive tests for the initial diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the United States. **Patient Preference and Adherence**, v. 10, p. 45–55, jan. 2016.
- BONAZZI, P. *et al.* Gastric emptying and intragastric balloon in obese patients. **European review for medical and pharmacological sciences.**, v. 9, n. 5 Suppl 1, p. 15–21, 2005.
- BORBA, A. T. DE *et al.* Influência do tabagismo ativo e passivo sobre a capacidade cardiorrespiratória. **Fisioterapia Brasil**, v. 13, n. 3, p. 253–259, 2012.
- BOUTTON, T. . Stable carbon isotope ratios of natural materials. I. Sample preparation and mass spectrometric analysis. In: C.COLEMAN, D.; FRY, B. (Eds.). . **Carbon Isotope Techniques**. [s.l.] Academic Press Inc., 1991.
- BRADEN, B. *et al.* 13C-breath tests: Current state of the art and future directions. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 9, p. 795–805, set. 2007.
- BRADEN, B. Methods and functions: Breath tests. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 23, n. 3, p. 337–352, jun. 2009.
- CALVET, X. *et al.* Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a reappraisal. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 10, p. 1385–91, 15 maio 2009.
- CAMPUZANO-MAYA, G. An optimized 13C-urea breath test for the diagnosis of H pylori infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 41, p. 5454–5464, 2007.
- COELHO, L. G. *et al.* 3rd BRAZILIAN CONSENSUS ON *Helicobacter pylori*. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 50, n. 2, p. 1–17, 2013.
- COELHO L. G., SANT ' ANA C. R., BENDASSOLLI J. A., *et al.* Performance of 13 C- urea breath test using substrate synthesized in Brazil L. **Helicobacter**, v. 21, p. 91–92, 2016.

CONNOR, S. J. *et al.* The effect of dosing with omeprazole on the accuracy of the ¹³C-urea breath test in *Helicobacter pylori*-infected subjects. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 10, p. 1287–1293, out. 1999.

COSTA, V. E. *et al.* Uso de Isótopos Estáveis para detecção de infecção por *Helicobacter pylori* em humanos no Brasil. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 7, n. 3, p. 191–194, 2013.

DEBONGNIE, J. C. *et al.* Quantification of *Helicobacter-Pylori* Infection in Gastritis and Ulcer Disease Using a Simple and Rapid Carbon-14-Urea Breath Test. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1192–1198, 1991.

DEDE, F. *et al.* Carbon-14 urea breath test: does it work in patients with partial gastric resection? **Annals of Nuclear Medicine**, v. 29, n. 9, p. 786–791, 2015.

DESROCHES, J. J. *et al.* Methodological validation and clinical usefulness of carbon-14-urea breath test for documentation of presence and eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 38, p. 1141–1145, 1997.

DIRIENZO, T. A. *et al.* ¹³C-Urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 17 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 51–8, 2013.

DOMÍNGUEZ-MUÑOZ, J. E. *et al.* A citric acid solution is an optimal test drink in the ¹³C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 40, n. 4, p. 459–62, abr. 1997.

DRIVER, S. L. *et al.* Fasting or Nonfasting Lipid Measurements. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 10, p. 1227–34, 2016.

EGUCHI, T. *et al.* Histopathological criteria for additional treatment after endoscopic mucosal resection for esophageal cancer: analysis of 464 surgically resected cases. **Modern Pathology**, v. 19, n. 3, p. 475–480, 27 mar. 2006.

EUSEBI, L. H.; ZAGARI, R. M.; BAZZOLI, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 19, n. 1, p. 1–5, set. 2014.

FALUSH, D. *et al.* Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15056–15061, 18 dez. 2001.

FERWANA, M. Accuracy of urea breath test in *Helicobacter pylori* infection: Meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 4, p. 1305, 2015.

FRAY, C. D.; JOHNSON, R. K. Energy. In: **Mahan, L K; Escott-Stump, S Krause's, food & nutrition therapy**. 12. ed. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2008. p. 22–35.

GISBERT, J. P.; PAJARES, J. M. Review article: ¹³C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection - a critical review. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 10, p. 1001–1017, 15 nov. 2004.

GISBERT, J.; PAJARES, J. ¹³C-urea breath test in the management of *Helicobacter pylori*

infection. **Digestive and liver disease**, v. 37, p. 899–906, 2005.

GRAHAM, D. *et al.* Campylobacter pylori detected noninvasively by ¹³C-Urea Breath Test. **The Lancet**, v. 329, n. 8543, p. 1174–1177, 1987.

GRAHAM, D. *et al.* Citric Acid as the Test Meal for the 13 C-Urea Breath Test. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 5, p. 1214–17, 1999.

GRAHAM, D. Y. *et al.* Simplified 13C-urea breath test for detection of Helicobacter pylori infection. **The American journal of gastroenterology**, v. 96, n. 6, p. 1741–5, jun. 2001.

GRAHAM, D. Y. Helicobacter pylori Update: Gastric Cancer, Reliable Therapy, and Possible Benefits. **Gastroenterology**, v. 148, n. 4, p. 719–731.e3, 2015.

HUANG, Y. *et al.* Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by Helicobacter pylori. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. November, 22 nov. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER/MINISTÉRIO DA SAUDE. **Estimativa 2016 - Incidência de Cancer no Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>

JORDAAN, M.; LAURENS, J. B. Diagnosis of Helicobacter pylori infection with the 13C-urea breath test by means of GC-MS analysis. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 2, p. 329–335, fev. 2008.

KATO, M. *et al.* 13C-Urea breath test, using a new compact nondispersive isotope-selective infrared spectrophotometer: comparison with mass spectrometry. **Journal of gastroenterology**, v. 39, n. 7, p. 629–34, jul. 2004.

KAWAKAMI, E. *et al.* 13 C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing helicobacter pylori infection in children and adolescents. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 39–43, 2002.

KIM, S. B. *et al.* Association between Helicobacter pylori status and metachronous gastric cancer after endoscopic resection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 44, p. 9794, 2016.

KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A. M. D. U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do Helicobacter pylori na infância e adolescência. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 356–369, 2002.

KOPÁCOVÁ, M. *et al.* Comparison of different protocols for 13C-urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in healthy volunteers. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 65, n. 6, p. 491–8, 8 jan. 2005.

KWON, Y. H. *et al.* The Diagnostic Validity of Citric Acid-Free, High Dose 13 C-Urea Breath Test After Helicobacter pylori Eradication in Korea. **Helicobacter**, v. 20, n. 3, p. 159–168, jun. 2015.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, M. D. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do Helicobacter pylori. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 1–8, 2002.

LANGSTED, A.; NORDESTGAARD, B. G. Nonfasting lipid profiles: The way of the future. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 9, p. 1123–1125, 2015.

LEAL, Y. A. *et al.* 13C-Urea Breath Test for the Diagnosis of Helicobacter pylori Infection in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Helicobacter**, v. 16, n. 4, p. 327–337, 2011.

LEE, T. *et al.* HELICOBACTER PYLORI INFECTION: BASIC AND CLINICAL PROBLEMS Effect of mouth washing on the [13 C] -urea breath test. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 16, p. 261–263, 2001.

LEODOLTER, A. *et al.* Citric acid or orange juice for the 13C-urea breath test: The impact of pH and gastric emptying. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 8, p. 1057–1062, 1999.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, 2008.

LI, H. *et al.* Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in Helicobacter pylori. **Helicobacter**, v. 21, n. 6, p. 445–461, 2016.

LOGAN, R. P. *et al.* Simplified single sample 13Carbon urea breath test for Helicobacter pylori: comparison with histology, culture, and ELISA serology. **Gut**, v. 32, n. 12, p. 1461–1464, 1991.

LUCE, J. M. Respiratory Complications of Obesity. **CHEST**, v. 78, n. 4, p. 626–631, 1980.

LUIS, A.; CORREA, N. Capacidade de VO₂ máximo para indivíduos fumantes e não fumantes durante o exercício físico. **Lecturas: Educación física y deportes**, v. 85, 2005.

MACHADO, R. S. *et al.* Urease activity does not reflect the degree of colonization by Helicobacter pylori in children. **Pediatrics International**, v. 48, n. 4, p. 398–402, ago. 2006.

MAITY, A. *et al.* Residual gas analyzer mass spectrometry for human breath analysis: a new tool for the non-invasive diagnosis of Helicobacter pylori infection. **Journal of Breath Research**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 1 mar. 2014.

MANA, F. *et al.* Cut-off point , timing and pitfalls of the 13C-urea breath as measured by infrared spectrometry. **Digestive and Liver Disease**, v. 5, p. 30–35, 2001.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic-ulceration. **Lancet**, v. 323, n. June, p. 1311–1315, 1984.

MAURO, M. *et al.* 13C urea breath test for Helicobacter pylori: Determination of the optimal cut-off point in a Canadian community population. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 12, p. 770–774, 2006.

MENTIS, A.; LEHOURS, P.; MÉGRAUD, F. Epidemiology and Diagnosis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, v. 20, p. 1–7, set. 2015.

MIFTAHUSSURUR, M.; YAMAOKA, Y. Diagnostic Methods of Helicobacter pylori Infection for Epidemiological Studies: Critical Importance of Indirect Test Validation. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–14, 2016.

- MITCHELL, H. *et al.* Epidemiology, clinical impacts and current clinical management of *Helicobacter pylori* infection. **The Medical Journal of Australia**, v. 204, n. June, 2016.
- MOBLEY, H. L.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.
- MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 451–480, 1995.
- MOCHIDA, K. *et al.* Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 359–62, 2015.
- MODAK, A. S. Stable isotope breath tests in clinical medicine: a review. **Journal of breath research**, v. 1, n. 1, p. 14003, 1 set. 2007.
- MUCCIO, Z.; JACKSON, G. P. Isotope Ratio Mass Spectrometry. **The Analyst**, v. 134, n. 2, p. 213–22, 2009.
- NUNES, S. O. V.; CASTRO, M. R. P. Tabagismo, Comorbidades e Danos à Saúde. In: **Tabagismo: Abordagem, prevenção e tratamento**. Londrina - PR: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2011. p. 224.
- OHSUMI, Y. Historical landmarks of autophagy research. **Cell research**, v. 24, n. 1, p. 9–23, 2014.
- OZTÜRK, E. *et al.* A new, practical, low-dose ¹⁴C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: clinical validation and comparison with the standard method. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 30, n. 11, p. 1457–62, 2003.
- PACHECO, S. L. M. *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by Means of Reduced-Dose ¹³C-Urea Breath Test and Early Sampling of Exhaled Breath. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 607–611, nov. 2013.
- PELETEIRO, B. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: A systematic review of studies with national coverage. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, n. 8, p. 1698–1709, 2014.
- PENG, N. *et al.* Comparison of Noninvasive Diagnostic Tests for *Helicobacter pylori* Infection. **Medical Principles and Practice**, v. 18, n. 1, p. 57–61, 2009.
- PIZZOFERRATO, M. *et al.* Specific ¹³C functional pathways as diagnostic targets in gastroenterology breath-tests: tricks for a correct interpretation. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 17 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 45–50, 2013.
- RASOOL, S.; ABID, S.; JAFRI, W. Validity and cost comparison of ¹⁴ carbon urea breath test for diagnosis of H Pylori in dyspeptic patients Validity and cost comparison of carbon urea breath test for. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. FEBRUARY, p. 925–929, 2007.
- RAVUSSIN, E. *et al.* Determinants of 24-Hour Energy Expenditure in Man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, p. 1568–1578, 1986.

SANT'ANA FILHO C., TAVARES R., CLAUDINÉIA R. O., FERREIRA A. V., PRESTES C, V. *et al.* Síntese e controle de qualidade da ureia enriquecida em ¹³C para diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP). **Quim. Nova**; v. 36, p. 107–113, 2013.

SAVARINO, V. *et al.* Comparison of isotope ratio mass spectrometry and nondispersive isotope-selective infrared spectroscopy for ¹³C-urea breath test. **American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 5, p. 1203–1208, 1999.

SAVARINO, V. *et al.* Isotope ratio mass spectrometry (IRMS) versus laser-assisted ratio analyzer (LARA): A comparative study using two doses of [¹³C]urea and two test meals for pre- and posttreatment diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 45, n. 11, p. 2168–2174, 2000.

SCHOEP, T. D. *et al.* Surface Properties of *Helicobacter pylori* Urease Complex Are Essential for Persistence. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e15042, 29 nov. 2010.

SELGRAD, M.; KANDULSKI, A.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori*: diagnosis and treatment. **Current opinion in gastroenterology**, v. 25, n. 6, p. 549–56, nov. 2009.

SHIRIN, H. *et al.* Effect of proton pump inhibitors on the continuous real time (¹³C)-urea breath test. **The American journal of gastroenterology**, v. 98, n. 1, p. 46–50, 2003.

SIQUEIRA, J. S. *et al.* Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter Pylori*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 1, p. 9–13, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS *et al.* **Consenso Brasileiro para a Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico** Normatização da Determinação Laboratorial do Perfil Lipídico, 2016. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/?C=2869>>

SOM, S. *et al.* Excretion kinetics of ¹³C-urea breath test: influences of endogenous CO₂ production and dose recovery on the diagnostic accuracy of *Helicobacter pylori* infection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 22, p. 5405–5412, 18 set. 2014.

STUBBS, J. B.; MARSHALL, B. J. Radiation dose estimates for the carbon 14-labelled urea breath test". **Journal of Nuclear Medicine**, v. 34, n. 5, p. 821–825, 1993.

SUERBAUM, S. *et al.* Free recombination within *Helicobacter pylori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 12619–12624, 1998.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175–1186, 10 out. 2002.

SUN, J. *et al.* A Meta-Analysis of the Association between *Helicobacter pylori* Infection and Risk of Coronary Heart Disease from Published Prospective Studies. **Helicobacter**, v. 21, n. 1, p. 11–23, fev. 2016.

SZARKA, L. A. *et al.* A Stable Isotope Breath Test With a Standard Meal for Abnormal Gastric Emptying of Solids in the Clinic and in Research. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 6, p. 635–643, 2008.

TOMB, J.-F. *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.

Nature, v. 388, n. 6642, p. 539–547, 7 ago. 1997.

TONKIC, A. *et al.* Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 17, n. SUPPL.1, p. 1–8, set. 2012.

UOTANI, T.; GRAHAM, D. Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2015.

WANG, F. *et al.* *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 196–202, 10 abr. 2014.

WIESER, M. E.; BRAND, W. A. Isotope Ratio Studies Using Mass Spectrometry. In: **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 1999. v. 2p. 1224–1236.

YAMASAKI, A. *et al.* Structural Basis for Receptor-Mediated Selective Autophagy of Aminopeptidase I Aggregates. **Cell Reports**, v. 16, n. 1, p. 19–27, 2016.

ZANASI, R. *et al.* Determinations of ¹³C/¹²C Carbon Isotope Ratio. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 78, n. 9, p. 3080–3083, 2006.