



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina

Leandro Cacure

**Padrão de colonização da mucosa gástrica por
Helicobacter pylori em crianças e adolescentes com
dor abdominal crônica e dispepsia não ulcerosa.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu Unesp

Orientador Prof^a. Titular Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

**Botucatu
2018**

Leandro Cacure

**Padrão de colonização da mucosa gástrica
por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes
com dor abdominal e dispepsia não ulcerosa**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu Unesp

Orientadora: Profa Titular Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Botucatu-SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Cacure, Leandro.

Padrão de colonização da mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes com dor abdominal e dispepsia não ulcerosa / Leandro Cacure. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Coorientador: Nilton Carlos Machado

Coorientador: Mary de Assis Carvalho

Capes: 40105008

1. Estômago - Inflamação. 2. *Helicobacter pylori*. 3. Imunohistoquímica. 4. Mucosa gástrica.

Palavras-chave: Colonização; Criança; Gastrite; *Helicobacter pylori*; Imuno-histoquímica.

Agradecimentos

Aos meus pais, cujos esforços e abdições permitiram que eu chegasse até aqui;

A minha amada avó que sempre acreditou e encorajou com palavras e atitudes as realizações de meus sonhos mesmo não estando mais presente;

Aos meus amigos e familiares de São Paulo, que mesmo longe ao longo dos anos, permaneceram presentes em pensamentos, sentimentos e ações. Agradecimentos especiais às minhas irmãs; Fabíola e Giselle, minhas melhores amigas e representação do melhor de mim;

Aos meus amigos de Botucatu, minha segunda família, que desde 2008 juntamente com nossa amada cidade, tornou aqui meu segundo lar e um porto seguro;

Aos meus mestres de Botucatu que ao longo de minha graduação, residência médica e pós-graduação muito contribuiu ao meu crescimento pessoal. Agradecimento especial aos meus preceptores da Residência de Gastroenterologia Infantil: Dr Nilton e Dra Mary, que além de despertar o desejo em ser especialista pelo exemplo de profissionais que são, permitiram o desenvolvimento desse estudo de pós-graduação;

À minha orientadora, Dra Maria Aparecida (Dra Tuca), a gratidão por ter me concedido a oportunidade desse estudo, acreditando em minha capacidade de desenvolvê-lo, e por ser um exemplo de ser humano e de profissional e inspiração para a vida acadêmica;

Por fim, agradeço à Medicina, aos pacientes, sobretudo às crianças, que são a minha fonte diária de ânimo ao trabalho e a certeza da escolha profissional certa.

Epígrafe

“ Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

Sumário

Capítulo I

Revisão da Literatura

1. Introdução.....	4
2. <i>H. pylori</i> e epidemiologia.....	5
3. <i>H. pylori</i> e patogênese.....	5
4. <i>H. pylori</i> e evolução da infecção.....	8
5. Classificação da Gastrite.....	9
6. <i>H. pylori</i> e Invasão da mucosa gástrica.....	10
7. Objetivos.....	11
8. Referências bibliográficas.....	12

Capítulo II

Artigo

Resumo.....	19
Abstract.....	20
1. Introdução.....	21
2. Pacientes e Métodos.....	23
3. Análise estatística.....	26
4. Resultados.....	27
5. Discussão.....	33
6. Referências bibliográficas.....	38
7. Figuras e Tabelas.....	43

Capítulo I

Revisão de Literatura

1. Introdução

A dor abdominal crônica (DAC) ocorre em 10 a 15% das crianças entre 4 e 14 anos, sendo responsável por 2 a 4% de todas as consultas pediátricas e 25% em consultas especializadas de Gastroenterologia pediátrica. Está associada a alto custo econômico e à redução substancial na qualidade de vida da população infantil (Di Lorenzo et al., 2005).

A DAC é classificada como orgânica ou funcional. É considerada funcional quando não há evidências demonstráveis de condições patológicas anatômicas, inflamatórias, infecciosas, metabólicas ou neoplásicas associadas. É designada como orgânica, quando tais doenças estão implicadas nas manifestações clínicas da DAC (Di Lorenzo et al., 2005).

A DAC orgânica pode apresentar-se, em um subgrupo de crianças, como síndrome dispéptica caracterizada por sintomas abdominais inespecíficos, contínuos ou intermitentes, geralmente associados à alimentação, relacionados a distúrbios do trato digestivo proximal e de duração superior a 2 meses (Appley and Naish 1958; Barbara et al., 1989). Os sinais e sintomas de dispepsia que ocorrem em crianças não são específicos e podem ser identificados em diferentes doenças como: esofagite, gastroenteropatia eosinofílica, doença hepática, pancreatite, doença biliar, intolerância à lactose e na infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

A infecção por *H. pylori* está associada a processos inflamatórios no aparelho digestório alto, tais como: gastrite crônica (assintomática ou sintomática), úlcera péptica (gástrica ou duodenal), carcinoma gástrico ou linfoma MALT (Drumm et al., 2000; Carvalho et al., 2012; Sugano et al., 2015; Correa Silva et al 2016).

Dentre as causas de dispepsia orgânica na infância, a infecção pelo *H. pylori* destaca-se, em nosso meio, por sua alta frequência e pode manifestar-se como DAC

orgânica de padrão dispéptico (Nogueira et al., 2000; Carvalho et al., 2012;Correa Silva et al., 2016).

2. *H. pylori* e epidemiologia

O *Helicobacter pylori* é uma das bactérias patogênicas mais prevalentes na população mundial. Os seres humanos constituem o principal reservatório desse patógeno. Estudos epidemiológicos demonstram alta prevalência de infecção por *H. pylori* em países subdesenvolvidos (70-90%) em relação aos países desenvolvidos (25-50%) (Malaty 2007; Kenneth and McColl 2010; Hooi et al 2017).

O principal modo de transmissão do *H. pylori* é ainda desconhecido, embora tenham sido propostas as rotas oral-oral, gastro-oral e fecal-oral (Malaty2007; Eusebi et al., 2014)sendo a transmissão dos pais à criança o modo mais provável de infecção na infância (Rotherbacher et al., 1999; Hasosah M et al 2015; Mamishi et al., 2016).Quanto mais íntimo o contato, maior é o risco de transmissão. Como muitas outras infecções bacterianas da infância, o *H. pylori* é adquirido mais frequentemente por crianças pré-escolares, de famílias numerosas, de baixa condição socioeconômica e de nível precário de instrução. (Malaty 2007; Kenneth and McColl 2010). Em locais de alto-risco a maioria das crianças já está infectada antes dos 5 anos de idade (Mamishi et al., 2016; Kalach et al., 2017).

3. *H. pylori* e patogênese

Uma vez no interior da luz gástrica, o *H. pylori* utiliza-se da atividade da urease para metabolizar ureia em dióxido de carbono e amônia, tamponando a acidez gástrica, e de respostas adaptativas ao estresse para tolerar temporariamente a acidez (de Bernard &Josenhans, 2014; Kao et al 2016).A seguir movimenta-se ativamente através dos seus flagelos, penetra no muco gástrico viscoso na superfície da mucosa e alcança o pH mais

neutro abaixo do muco, estabelecendo um contato íntimo com as células epiteliais (Eaton & Krakowka, 1994; Eaton et al., 1996). Uma vez abaixo do muco, o *H. pylori* adere-se firmemente à membrana das células epiteliais gástricas utilizando-se de adesinas, (Clyne & Drumm, 1993; de Bernard & Josenhans, 2014). Assim, o *H. pylori* evita seu clareamento mecânico pelo peristaltismo, utiliza a superfície celular como um sítio de replicação, transfere seus fatores de virulência pela indução de poros e proteínas do Sistema de Secreção do Tipo IV (TFSS), facilitando sua adesão e as vias de sinalização para a cascata imune, induzindo ao dano celular (Amieva & El-Omar, 2008; Kao et al 2016).

A infecção por *H. pylori* é consistentemente associada à resposta inflamatória celular, que é iniciada pelo sistema imune inato e adaptativo e é caracterizada por um influxo de neutrófilos, células mononucleares e células T-helper 1 (Carvalho et al 2012; Freire de Melo et al 2014). Embora essa resposta seja tipicamente voltada para a eliminação de infecções intracelulares, a bactéria não é considerada uma bactéria invasiva e estudos anteriores não relataram a presença intracelular da bactéria (Hazell et al., 1986; Hessey et al, 1990; Morris et al, 1990; Thomsen et al., 1990) pois o *H. pylori* adere-se intimamente às células epiteliais gástricas com tropismo específico (Clyne & Drumm, 1993).

O *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa espiralada, móvel (flagelada) e microaerófila que coloniza as células epiteliais gástricas do ser humano (Marshall & Warren, 1984; Cave, 1996; Blaser and Atherton 2004; Kao et al 2016). Esta bactéria apresenta capacidade de estabelecer infecção da mucosa gástrica de hospedeiros humanos por décadas ou a vida toda (Marshall & Warren, 1984; Covacci et al., 1999; Chen et al., 2007; Lina et al., 2014). O *H. pylori* foi classificado como carcinógeno do grupo I pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC), sendo considerado como um fator de risco primário para câncer gástrico (NIH, 1994; Sipponem & Hyvarinen, 1993; Wang et al., 2014).

O *H.pylori* possui múltiplos fatores de virulência que o fazem único em sobreviver indefinidamente no ambiente hostil gástrico, mediante indução de efeitos tanto pró-inflamatórios quanto imunossupressores, resultando em ineficácia da resposta imune do hospedeiro (Crabtree et al., 1995a; b; Segal et al., 1997; Peek et al., 1999; Robinson et al., 2007; Wilson & Crabtree, 2007; Amieva & El-Omar, 2008; Basso et al., 2010, Aebischer et al., 2010; Tohidpour, 2016). Os fatores de virulência compreendem:

- Urease, enzima no citoplasma e na superfície bacteriana, presente em todas as cepas de *H. pylori*, capaz de tamponar transitoriamente o ambiente ácido pela degradação da ureia em amônia e dióxido de carbono (Kao et al 2016).
- Flagelos para a motilidade e capacidade de controle da direção deste movimento por respostas quimiotáticas, essenciais para o *H. pylori* alcançar a região menos ácida do lago mucoso justaposto à superfície epitelial (Blaser and Atherton 2004)
- Expressão de várias proteínas da membrana externa (OMPs) denominadas adesinas, especialmente BabA e CagA, que conferem múltiplas possibilidades de ligação à superfície das células epiteliais da mucosa gástrica (Ladeira et al 2003).
- Produção de várias citocinas que ao alcançarem o citosol da célula epitelial gástrica, via TFSS, ou via formação de poros, passam a controlar aspectos diversos da sua função (Kao et al 2016).
- CagA – citotoxina altamente imunogênica codificada pelo gene *cagA* (gene associado a citotoxina) localizado na ilha de patogenicidade (*cag PAI*) do *H. pylori*, estando presente em aproximadamente 60% das cepas de *H. pylori*. É responsável pela indução de várias vias de sinalização a jusante na célula epitelial, resultando em dissociação das células, perda da polaridade celular, reorganização do citoesqueleto, alongamento das células e progressão do ciclo celular, com efeitos pró-inflamatórios e mitogênicos, aumentando o risco de desenvolvimento neoplásico (Cabral et al 2006; 2007).

- VacA (citotoxina vacuolizante) - produto da expressão do gene *vacA*, que induz a vacuolização citoplasmática por alterar a maturação endossomal, aumenta a permeabilidade das células epiteliais formando poros na membrana celular, induz a liberação de citocromo C mitocondrial e apoptose celular, interfere com a fagocitose e a apresentação de antígenos e inibe a proliferação de células T, o que resulta em dano celular e inflamação (Atherton et al 1997; Ladeira et al 2003).

4. *H. pylori* e evolução da infecção

Há três possibilidades de evolução da gastrite aguda associada ao *H. pylori*. A primeira, que corresponde à resolução espontânea, é descrita como de ocorrência rara, (Ganga-Zandzou et al., 1999; Warren 2000). A segunda possibilidade é a evolução para gastrite crônica predominante no antro e, em muitos casos, no antro e corpo gástrico (Marshall and Warren, 1984; Sonnenberg et al 2010), sendo que 15% dos pacientes com gastrite antral difusa desenvolvem subseqüentemente úlcera péptica duodenal (Peek and Blaser 1997; Buck et al 1986). A gastrite contribui na história natural do desenvolvimento de úlcera gástrica e duodenal, devido à diminuição da proteção do revestimento da barreira mucosa do estômago e do duodeno, associada a aumento da exposição das células epiteliais à hipercloridria ácida (Peek and Blaser 1997; Buck et al 1986). A terceira possibilidade é a evolução para atrofia gástrica, também denominada gastrite atrófica multifocal, que se caracteriza por perda de glândulas da mucosa gástrica e conseqüente diminuição da secreção de ácido (Ganga-Zandzou et al., 1999; Warren, 2000). Assim, se uma criança com dispepsia requer exame de endoscopia digestiva, deve-se realizar biópsias gástricas para avaliar a presença de infecção pelo *H. pylori* (Chelimsky & Czinn, 2001; Drumm et al., 2000).

Em países em desenvolvimento a infecção geralmente tem início na infância e pode persistir por toda a vida (Neale & Logan, 1995; Chong et al., 1995; Rothenbacher et al., 1999; Miyaji et al., 2000; Queiroz et al 2012). A gastrite crônica é o resultado mais comum da infecção, mas alguns indivíduos podem desenvolver úlceras pépticas e duodenais e 1% dos indivíduos infectados desenvolverão câncer gástrico (Buck et al 1986; Wang et al., 2014).

5. Classificação da Gastrite

A gastrite por *H. pylori* pode ser graduada por exame histopatológico de biópsias de mucosa gástrica, mediante avaliação de escala visual analógica (Figura 1) de acordo com o Sistema de Sydney atualizado (Dixon et al., 1996). A classificação representa uma avaliação semi-quantitativa da combinação da intensidade da inflamação mononuclear e granulocítica, avaliada em biópsias da mucosa do corpo e do antro. A classificação é uma medida da gravidade das lesões inflamatórias e expressa a intensidade do acúmulo de células inflamatórias (linfócitos e granulócitos) dentro da lâmina própria, graduada de acordo com a escala analógica visual do Sistema de Sydney atualizado. O grau final de inflamação resultante da combinação de graus de lesões inflamatórias na mucosa do antro e do corpo podem ser definidos de acordo com Ruge & Genta (2005) em escores que variam de 0 (falta de inflamação em algum dos fragmentos) a IV (infiltrado inflamatório muito denso em fragmentos de biópsia).

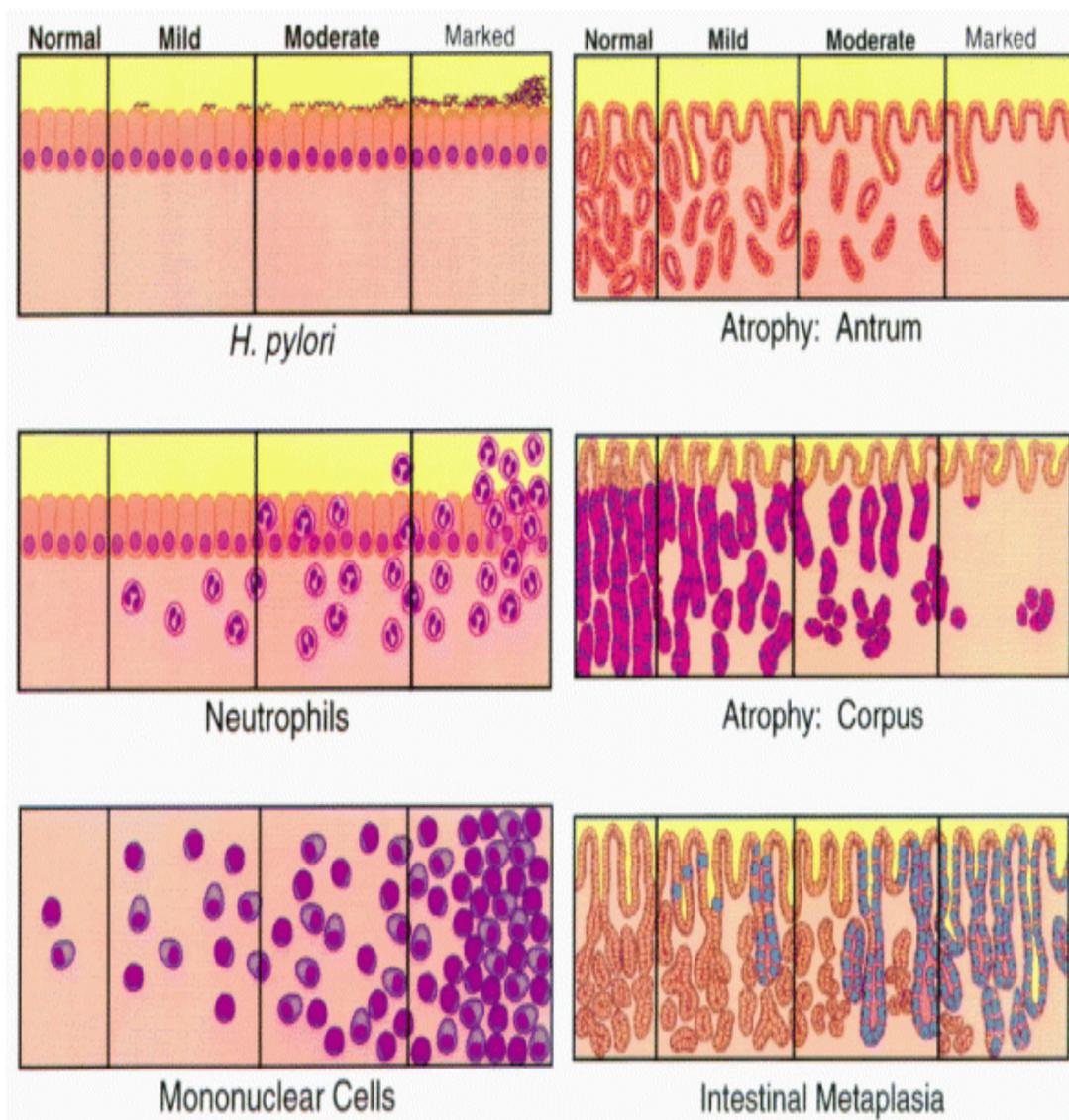


Figura 1 – Escala visual analógica para análise histopatológica gástrica.

Sistema de Sydney (Dixon et al., 1996)

6. *H. pylori* e Invasão da mucosa gástrica

Para muitas bactérias entéricas e infecções bacterianas crônicas, a invasão de células epiteliais é de grande importância para a sobrevivência e multiplicação dos microorganismos. Como se acredita que a capacidade de invasão de muitos patógenos desempenha um papel em sua virulência e patogenicidade é possível que a invasão intra-epitelial desempenhe um papel na patogenicidade do *H. pylori*, assim como sua localização mais profunda na mucosa do estômago. Embora esteja geralmente confinado à superfície da mucosa, em um subgrupo de pacientes o *H. pylori* pode ser observado na profundidade das fovéolas gástricas, nos espaços intercelulares e na lâmina própria (Noach et al 1994; Jhala et al., 2003; Necchi et al., 2007; Dudley et al., 2017) e até dentro de vacúolos nas células epiteliais e inflamatórias (Papadogiannakis et al., 2000; Petersen & Krogfelt, 2003; Dubois & Boren, 2007; Dubois, 2007). Alguns investigadores argumentam que tais organismos, aqui designados “*H. pylori* invasivos”, são mais resistentes ao tratamento e aumentam significativamente a probabilidade de doença futura (Engstrand et al., 1997).

Recentemente, Dudley et al (2017) investigaram o potencial de invasão do *H. pylori* na mucosa gástrica de indivíduos adultos. Demonstraram por microscopia eletrônica que o *H. pylori* pode se localizar profundamente nos recessos foveolares e nos espaços intercelulares, com características de invasividade, mas não conseguiram demonstrar caráter de invasão intra-celular.

Apesar da infecção por *H. pylori* ter início na infância, pouco se conhece sobre o padrão de colonização da mucosa gástrica por *H. pylori* em crianças e sua possível correlação com as repercussões clínicas da infecção. Como em nosso meio a prevalência de infecção por *H. pylori* em crianças e adolescentes é alta (Nogueira et al 2000; Carvalho et al 2012, Correa Silva et al 2016), optamos por investigar o padrão de colonização da mucosa gástrica pelo *H. Pylori*, superficial versus profundo, em biópsias de mucosa

gástrica de crianças e adolescentes com dispepsia não ulcerosa e suas possíveis correlações com a densidade de colonização, alta ou baixa, a intensidade da inflamação e os sinais e sintomas clínicos.

7. Objetivos

Assim, os objetivos deste estudo foram o de investigar biópsias endoscópicas da mucosa gástrica de crianças e adolescentes com pangastrite associada à infecção por *H. pylori*, clinicamente expressa com dor abdominal crônica do tipo dispepsia não ulcerosa:

- As características da resposta inflamatória na mucosa do antro e do corpo por exame histopatológico convencional.
- A densidade de colonização do *H. Pylori*, alta *versus* baixa, na mucosa do antro e do corpo, por método imunohistoquímico.
- O padrão de colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*, superficial *versus* profundo, mediante método imunohistoquímico
- Investigar se existe correlação entre o padrão de colonização da mucosa com a intensidade da inflamação na mucosa do antro e do corpo gástrico.
- Investigar se existe correlação entre o padrão de colonização da mucosa com a densidade de colonização na mucosa do antro e do corpo.

8. Referências Bibliográficas

1. Aebischer T, Meyer TF, Andersen LP. Inflammation, Immunity, and Vaccines for *Helicobacter*. *Helicobacter* 2010; 15 Suppl 1:21-8.
2. Amieva MR, El-Omar EM. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology* 2008; 134:306-23.
3. Apley J, Naish N. Recurrent abdominal pain: a field survey of 1.000 school children. *Arch Dis Child*. 1958; 33:165-70.
4. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. The clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, encoding the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997;112:92–99.
5. Barbara L, Camilleri M, Corinaldesi R, Crean GP, Heading RC, Johnson AG, et al. Definition and investigation of dyspepsia. Consensus of an international ad hoc working party. *Dig Dis Sci*.1989; 34:1272-6.
6. Basso D, Plebani M, Kusters JG. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2010; 15 Suppl 1:14-20.
7. Blaser MJ, Atherton J. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004;113:321–333.
8. Buck, G.E., Gourley, W.K., Lee, W.K., Subramanyam, K., Latimer, J.M., and DiNuzzo, A.R. Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer. *J Infect Dis* 1986; 153: 664–669.
9. Cabral MM, Mendes CM, Castro LP, Cartelle CT, Guerra J, Queiroz DM, Nogueira AM. Apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis is related to *cagA* status. *Helicobacter* 2006;11(5):469-7.
10. Cabral MM, Oliveira CA, Mendes CM, Guerra J, Queiroz DM, Rocha GA, Rocha AM, Nogueira AM. Gastric epithelial cell proliferation and *cagA* status in *Helicobacter pylori* gastritis at different gastric sites. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42(5):545-54.
11. Carvalho MA, Machado NC, Ortolan EVP, Rodrigues, MAM. Upper gastrointestinal histopathological findings in children and adolescents with nonulcer dyspepsia with *Helicobacter pylori* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55: 523–9.
12. Cave DR. Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Am J Med*. 1996; 100:12S-7.
13. Chelimsky G, Czinn SJ. Techniques for the evaluation of dyspepsia in children. *J Clin Gastroenterol*. 2001; 33:11-3.

14. Chen MJ, Wang TE, Chang WH, Liao TC, Lin CC, Shih SC. Nodular gastritis: an endoscopic indicator of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci*. 2007; 52:2662-6.
15. Chen, X.G., Correa, P., Offerhaus, J., Rodriguez, E., Janney, F., Hoffmann, E., et al. (1986) Ultrastructure of the gastric mucosa harboring *Campylobacter*-like organisms. *Am J Clin Pathol* 86: 575–582.
16. Chong SK, Lou Q, Asnicar MA, et al. *Helicobacter pylori* infection in recurrent abdominal pain in childhood: comparison of diagnostic tests and therapy. *Pediatrics* 1995;96(2 Pt 1):211–5.
17. Clyne M, Drumm B. Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. *Infect Immun*. 1993; 61:4051-7.
18. Correa Silva RG, Machado NC, Carvalho MA, Rodrigues MA. *Helicobacter pylori* infection is high in paediatric nonulcer dyspepsia but not associated with specific gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr* 2016;105(5):e228-31.
19. Covacci A, Telford JL, Giudice GD, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999; 284:1328-33.
20. Crabtree, J.E., Covacci, A., Farmery, S.M., Xiang, Z., Tompkins, D.S., Perry, S. et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995 a; 48: 41–45.
21. Crabtree, J.E., Xiang, Z., Lindley, I.J., Tompkins, D.S., Rappuoli, R., and Covacci, A. Induction of interleukin- 8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995 b; 48: 967–969.
22. de Bernard M, Josenhans C. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2014;19 Suppl 1:11-8.
23. Di Lorenzo C, Colletti RB, Lehmann HP, Boyle JT, Gerson WT, Hyams JS, Squires RH Jr, Walker LS, Kanda PT; AAP Subcommittee on Chronic Abdominal Pain; NASPGHAN Committee on Abdominal Pain. Chronic abdominal pain in children: a clinical report of the American Academy of Pediatrics and the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005 Mar; 40:245-8.
24. Dimmick JE, Jevon GP, Hassall E. Pediatric gastritis. *Perspect Pediatr Pathol* 1997; 20: 35-76.
25. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1161-81.

26. Drumm B, Koletzko S, Oderda G. *Helicobacter pylori* Infection in children: a consensus statement [Medical Position Paper]. European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30:207-13.
27. Dubois A, Boren T. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol* 2007; 9:1108-16.
28. Dubois A. Intracellular *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis: an "old" frontier worth revisiting. *Gastroenterology* 2007; 132, 1177-1180.
29. Dudley J, Wiczorek T, Selig M, Cheung H, Shen J, Odze R, Deshpande V, Zukerberg L. Clinicopathological characteristics of invasive gastric *Helicobacter pylori*. *Hum Pathol*. 2017; 61:19-25.
30. Eaton KA, Krakowka S. Effect of gastric Ph on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1994; 62:3604-7.
31. Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun*. 1996; 64:2445-8.
32. Engstrand L, Graham D, Scheynius A, Genta RM, El-Zaatari F. Is the sanctuary where *Helicobacter pylori* avoids antibacterial treatment intracellular? *Am J Clin Pathol*. 1997;108(5):504-9.
33. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014;19 Suppl 1:1-5.
34. Freire de Melo F, Rocha GA, Rocha AM, Teixeira KN, Pedroso SH, Pereira Junior JB, Fonseca de Castro LP, Cabral MM, Carvalho SD, Bittencourt PF, de Oliveira CA, Queiroz DM. Th1 immune response to *H. pylori* infection varies according to the age of the patients and influences the gastric inflammatory patterns. *Int J Med Microbiol* 2014;304(3-4):300-6.
35. Ganga-Zandzou PS1, Michaud L, Vincent P, Husson MO, Wizla-Derambure N, Delassalle EM, Turck D, Gottrand F. Natural outcome of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children: a two-year follow-up study. *Pediatrics*. 1999;104:216-21.
36. Hasosah M, Satti M, Shehzad A, Alshafi A, Sukkar G, Alzaben A, Sunaid A, Ahmed A, AlThubiti S, Mufti A, Jacobson K. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Saudi children: a three-year prospective controlled study. *Helicobacter*. 2015;20(1):56-63.
37. Hazell, S.L., Lee, A., Brady, L., and Hennessy, W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis*. 1986; 153: 658-663.

38. Hesse, S.J., Spencer, J., Wyatt, J.I., Sobala, G., Rathbone, B.J., Axon, A.T., et al. Bacterial adhesion and disease activity in Helicobacter associated chronic gastritis. *Gut*. 1990; 31:134–138.
39. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2017;153(2):420-429.
40. Jhala NC, Siegal GP, Klemm K, Atkinson BF, Jhala DN. Infiltration of Helicobacter pylori in the gastric mucosa. *American journal of clinical pathology* 2003; 119, 101-107.
41. Kalach N, Bontems P, Raymond J. Helicobacter pylori infection in children. *Helicobacter*. 2017;22(Suppl 1): e12414.
42. Kazi, J.L., Sinniah, R., Zaman, V., Ng, M.L., Jafarey, N.A., Alam, S.M., et al. Ultrastructural study of Helicobacter pylori-associated gastritis. *J Pathol*. 1990; 161:65-70.
43. Kenneth El McColl. Clinical practice: Helicobacter pylori Infection. *N Engl J Med*. 2010;362:1597-1604.
44. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Biomed J*. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. 2016;39(1):14-23.
45. Lacy BE, Rosemore J. Helicobacter pylori: ulcers and more: the beginning of an era. *J Nutr*. 2001; 131:2789S-93S.
46. Ladeira, MSP; Salvadori, DMF; Rodrigues, MAM. Biopathology of Helicobacter pylori. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39 (4): 335-42.
47. Lina TT, Alzahrani S, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Immune evasion strategies used by Helicobacter pylori. *World J Gastroenterol*. 2014; 28;20(36):12753-66.
48. Malaty HM. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:205–14.
49. Mamishi S, Eshaghi H, Mahmoudi S, et al. Intra-familial transmission of Helicobacter pylori: genotyping of faecal samples. *Br J Biomed Sci*. 2016;73:38-43.
50. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984; 1:1311-5.
51. Miyaji, H., Azuma, T., Ito, S., Abe, Y., Gejyo, F., Hashimoto, N. et al. Helicobacter pylori infection occurs via close contact with infected individuals in early childhood. *J Gastroenterol Hepatol* 2000,15: 257–262.

52. Morris, A., Ali, M.R., Thomsen, L., and Hollis, B. Tightly spiral shaped bacteria in the human stomach: another cause of active chronic gastritis? *Gut*. 1990; 31: 139–143.
53. Neale, K.R., and Logan, R.P. The epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. *Alimentary Pharmacol Ther*. 1995 ; 9 (Suppl. 2): 77–84.
54. Necchi V, Candusso ME, Tava F, et al. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 132:1009-23.
55. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, Ricci V, Solcia E. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 132, 1009-1023.
56. NIH. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *JAMA*. 1994; 272:65-9.
57. Noach LA, Rolf TM, Tytgat GN. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* 1994; 47:699-704.
58. Nogueira, AMF.; Guimarães, AC ; Paturle, P ; Cabral, MDA ; Oliveira, CA ; Carvalho, AST; Queiroz, DMM; Oliveira, AMR; Rocha, GA . Gastrite associada ao *H pylori* em adultos e crianças: estudo comparativo. *J Bras Patol Med Lab*, 2000; 36 (2): 110-117.
59. Papadogiannakis N1, Willén R, Carlén B, Sjöstedt S, Wadström T, Gad A. Modes of adherence of *Helicobacter pylori* to gastric surface epithelium in gastroduodenal disease: a possible sequence of events leading to internalisation. *APMIS*. 2000;108(6):439-47.
60. Peek RM, Blaser, MJ. Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-induced gastritis and peptic ulcer disease. *Am J Med*, v. 102, p. 200-5, 1997.
61. Peek, R.M. Jr, Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y. et al. *Helicobacter pylori* strain specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 1999, 59: 6124–6131.
62. Petersen AM, Krogfelt KA. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 36:117-26.
63. Queiroz, DMM; Carneiro, JG ; Braga-Neto, MB; Fialho, ABC; Fialho, AM; Goncalves, MHB; Rocha, GA; Rocha, Andreia MC; Braga, LLB. Natural History of *Helicobacter pylori* Infection in Childhood: Eight-Year Follow-Up Cohort Study in an Urban Community in Northeast of Brazil. *Helicobacter* 2012; 17: 23-29.
64. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007; 21:237-59.

65. Rotherbacher D, Bode G, Berg G, et al. Helicobacter pylori among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J Infect Dis* 1999; 179:398-402.
66. Rugge M, Genta RM. Staging and grading of chronic gastritis. *Human Pathology* 2005, 36, 228-233
67. Segal, E.D. Consequences of attachment of Helicobacter pylori to gastric cells. *Biomed. Pharmacother.* 1997, 51, 5-12.
68. Semino-Mora, C., Doi, S.Q., Marty, A., Simko, V., Carlstedt, I., and Dubois, A. Intracellular and interstitial expression of H. pylori virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *J Infect Dis* 2003;187: 1165–1177.
69. Sipponem P, Hyvarinen H. Role of Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol.* 1993; 28:3-6.
70. Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. A national study of Helicobacter pylori infection in gastric biopsy specimens. *Gastroenterology* 2010;139(6):1894-1901
71. Sugano K, et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis. *Gut* 2015;64:1353–1367.
72. Thomsen LL, Gavin JB, Tasman-Jones C. Relation of Helicobacter pylori to the human gastric mucosa in chronic gastritis of the antrum. *Gut.* 1990; 31: 1230–1236.
73. Tohidpour A. CagA-mediated pathogenesis of Helicobacter pylori. *Microb Pathog.* 2016; 93:44-55.
74. Tricottet, V., Bruneval, P., Vire, O., Camilleri, J.P., Bloch, F., Bonte, N., et al. Campylobacter-like organisms and surface epithelium abnormalities in active, chronic gastritis in humans: an ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol.* 1986; 10:113–122..
75. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 2014;345(2):196-202.
76. Warren JR. Gastric pathology associated with Helicobacter pylori, *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2000; 29:705–751.
77. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of Helicobacter pylori: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology.* 2007; 133:288-308.

Capítulo II

Artigo

**Padrão de colonização da mucosa gástrica
por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes
com dor abdominal e dispepsia não ulcerosa**

Resumo

Introdução: A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é o principal fator etiológico da gastrite e úlcera péptica. O diagnóstico e tratamento adequados são importantes para prevenir essa evolução.

Objetivo: Investigar o padrão de colonização da mucosa gástrica por *H. pylori* em crianças e adolescentes com dor abdominal crônica e dispepsia não ulcerosa.

Casuística e Métodos: Foram analisadas retrospectivamente 94 biópsias endoscópicas de mucosa gástrica, 47 do antro e 47 do corpo gástrico, de crianças e adolescentes com diagnóstico de pan-gastrite associada à infecção por *H. pylori*. Foram avaliados o padrão de colonização da mucosa por *H. pylori* e a densidade de colonização, por análise imunohistoquímica. A intensidade da resposta inflamatória e a frequência de folículos linfóides também foram investigados.

Resultados: A frequência de colonização profunda do *H. pylori* na mucosa do corpo foi de 72,3%, em contraste com a colonização predominantemente superficial no antro gástrico (95,7%). A densidade de colonização por *H. pylori* foi alta no antro (83%) e no corpo gástrico (68,1%). A frequência de agregados linfóides foi significativamente maior na mucosa do antro (68,1%), quando comparada à do corpo gástrico (34%) e apresentou boa correlação com a intensidade da inflamação e a densidade de colonização por *H. pylori* no antro gástrico.

Conclusão: O padrão de colonização por *H. pylori* diferiu entre as regiões do estômago, sendo predominantemente superficial no antro e profundo no corpo. Este padrão diferencial de colonização ocorre desde o início da infecção por *H. pylori*, na infância.

Palavras Chave: *Helicobacter pylori*; gastrite; crianças; padrão de colonização; imunohistoquímica.

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is the main cause of gastric inflammation and peptic ulcer disease. Diagnosis and treatment are important to prevent these outcomes.

Aim: To investigate colonization pattern of *H. pylori* in gastric mucosa of children and adolescents with chronic nonulcer dyspepsia.

Methods: Gastric endoscopic biopsies, 47 from antrum and 47 from corpus, were retrospectively analysed to determine *H. pylori* colonization pattern and density by immunohistochemistry. Inflammation grade and presence of lymphoid aggregates were also evaluated.

Results: High frequency of deep *H. pylori* colonization was found in gastric corpus (72,3%), in contrast to the superficial colonization identified in the antral mucosa (95,7%). *H. pylori* density was high in the antrum (83%) and corpus (68,1%). High grades of gastric inflammation were detected in both antrum (89,4%) and corpus (76,6%). The frequency of lymphoid aggregates was significantly higher in the antral mucosa (68,1%) than in the corpus (34%) and presented a good correlation with *H. pylori* density and grade of inflammation.

Conclusion: *H. pylori* colonization pattern is predominantly superficial in both antrum and corpus mucosa, but deep *H. pylori* colonization can be found in gastric corpus.

Keywords: *Helicobacter pylori*; gastritis; children; colonization pattern; immunohistochemistry.

1. Introdução

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma das mais prevalentes na população mundial. A frequência varia entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento (Malaty 2007; Calvet et al 2013; Hooi et al 2017). Por exemplo, a prevalência de infecção é alta nos países da América Latina (75- 83%), em contraste com o Japão (39,6%) e Estados Unidos (17,1%).

A infecção tem início na infância e persiste ao longo da vida do hospedeiro (Malaty 2007; Queiroz et al 2012; Calvet et al 2013). É associada a várias doenças do trato gastrointestinal, tais como, gastrite, úlcera péptica gástrica e duodenal, câncer gástrico e linfoma (Sonnenberg et al 2010; Kao et al 2016)

O *H pylori* é uma bactéria móvel, Gram negativa, essencialmente extracelular, que não invade a mucosa gástrica (Warren and Marshall 1984; Ladeira et al 2003; Blaser and Atherton 2004; Kao et al 2016). Entretanto, esta bactéria interage com as células epiteliais que revestem a mucosa gástrica, através de seus fatores de virulência, sendo a citotoxina associada ao gene A (Cag A), o principal fator de virulência, que atua como antígeno altamente imunogênico (Peek et al 1995; Queiroz et al 2000; Leite et al 2005; Cabral et al 2007; Kao et al 2016).

Os fatores de virulência do *H pylori* induzem ativação e migração de células inflamatórias para a mucosa por vários mecanismos que compreendem tanto a resposta inata, como a inflamação mediada por mecanismos imunológicos (Cabral et al 2006; Freire de Melo et al 2014). Ocorre liberação de interleucinas (IL) tais como, IL-8, IL -1 α , TNF- α e IL-6, que ativam e atraem neutrófilos e células mononucleares para a mucosa (Peek and Blaser 1997; Freire de Melo et al 2014).

Apesar da infecção ter início na infância, a maioria dos estudos sobre a intensidade e as características da resposta inflamatória foram desenvolvidos em adultos (Nai et al 2007; Sonnenberg et al 2010). Os estudos em crianças demonstraram resultados

contrastantes. Alguns relataram pouca resposta inflamatória (Carmolingo et al 2003). Outros identificaram inflamação intensa associada à infecção por *H pylori* (Nogueira et al 2000; Langner et al 2009; Carvalho et al 2012).

O *H pylori* é usualmente identificado no exame histopatológico convencional (corado por Hematoxilina & Eosina) das biópsias gástricas. Métodos histoquímicos como o Giemsa e a análise imuno-histoquímica tem sido utilizados para melhorar a acurácia diagnóstica (Wang et al 2010; Batts et al 2013; Panarelli et al 2015; Lash and Genta 2016). Apesar dos avanços nos métodos diagnósticos, pouco se conhece sobre o padrão de colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* e suas possíveis correlações com os demais parâmetros da inflamação da mucosa e outras repercussões clínicas.

Como a prevalência de infecção por *H. pylori* na infância é alta em nosso meio (Carvalho et al 2012, Correa Silva et al 2016), optamos por investigar o padrão de colonização, superficial versus profundo, da mucosa gástrica pelo *H. pylori*, em biópsias de mucosa gástrica de crianças e adolescentes com dispepsia não ulcerosa e suas possíveis correlações com a densidade de colonização, alta ou baixa, a intensidade da inflamação e os sinais e sintomas clínicos.

2. Pacientes e métodos

2.1 Pacientes

Trata-se de estudo observacional, retrospectivo desenvolvido com crianças e adolescentes atendidas ambulatorialmente no serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu- São Paulo, Brasil, que foram investigadas devido à dor abdominal crônica com mais de três meses de duração, de acordo com os critérios de Apley (Apley & Naish, 1958), num período de 5 anos, de janeiro de 2012 a dezembro de 2017, cuja investigação resultou no diagnóstico de pangastrite por *H. pylori*.

Assim, este estudo incluiu um subconjunto de pacientes, com dispepsia crônica associada à pangastrite por *H. pylori*, submetidos à endoscopia gastrointestinal alta com biópsias de estômago das regiões do corpo/fundo e antro gástrico. A presente investigação faz parte do projeto de pesquisa sobre infecção por *H. pylori* na infância, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (CAAE: 03035018.7.0000.5411).

2.1.1 Critérios de inclusão

- Idade entre 4 e 17 anos ao diagnóstico
- Dor abdominal crônica segundo critérios clínicos de Apley (Apley & Naish, 1958), acompanhada de sinais de alerta, por exemplo: dor noturna, submetidas a endoscopia digestiva alta para investigação diagnóstica
- Diagnóstico de gastrite por *H. pylori* baseado em positividade de dois métodos: teste da urease positivo e presença de agente etiológico ao exame histopatológico
- Presença de pangastrite (infiltrado inflamatório em amostras de corpo e de antro gástrico)

- Padrão de exames hematológico, exame de sedimento urinário e cultura de urina sem alterações, exames de fezes dos últimos três meses sem ovos ou cistos e radiografia de abdome normal. Estes são os exames iniciais padronizados pelo serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu para avaliação de crianças dispépticas

2.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com histórico de comorbidades tais como cirurgia gastrointestinal, sangramento gastrointestinal ativo, úlcera duodenal, úlcera gástrica.
- Nenhum dos pacientes recebeu drogas anti-secretoras (bloqueadores de receptores H2 e inibidores de bomba de prótons), compostos de bismutos, anti-inflamatórios não hormonais (AINHs), antibióticos ou drogas imunossupressoras, nas últimas quatro semanas precedendo a endoscopia gastrointestinal alta.

2.2 Análise histopatológica convencional

Biópsias da mucosa do corpo e do antro gástrico foram fixadas em solução de formalina tamponada neutra a 10%, processadas para obtenção de cortes histológicos de 4- μ m e coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) para análise histológica convencional. As lâminas foram analisadas por dois autores, sem conhecimento das informações clínicas dos pacientes.

A análise histopatológica das biópsias gástricas foi realizada com auxílio da escala visual analógica de acordo com o Sistema de Sydney atualizado (Dixon et al., 1996) (Figura 1). Foram avaliados a intensidade e a atividade da resposta inflamatória.

A inflamação crônica foi caracterizada por infiltrado mononuclear, constituído por plasmócitos, linfócitos e macrófagos. A atividade da inflamação foi caracterizada pela presença de neutrófilos. Ambas foram classificadas em graus: 1 (leve) e 2 (intensa).

Foram também avaliadas a presença de folículos linfóides, metaplasia intestinal e atrofia da mucosa.

O padrão de pangastrite foi considerado quando a inflamação estava presente em ambas as biópsias do corpo e antro gástrico.

2.3 Análise Imunohistoquímica

Após exame histopatológico convencional (H&E) foi feita análise imunohistoquímica para identificar o padrão e a densidade de colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*.

Foi utilizado anticorpo policlonal anti-*Helicobacter pylori* (Cell Marque®) no protocolo Avidina Biotina Peroxidase (ABC staining system Dako®). A atividade da peroxidase foi detectada com diaminobenzidina (DAB) como substrato. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris. Os procedimentos foram conduzidos em sistema automático de processamento de lâminas (Dako auto stainer®).

O padrão de colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* foi considerado como superficial ou profundo. A colonização foi considerada superficial quando as bactérias estavam localizadas junto à superfície do epitélio foveolar da mucosa do corpo ou antro gástrico. A colonização foi considerada profunda quando as bactérias estavam situadas na camada glandular da mucosa, junto às células parietais da mucosa do corpo gástrico ou às células secretoras de muco das glândulas do antro.

A densidade de colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* foi considerada como alta ou baixa. Quando foram identificadas bactérias isoladas, em pequena quantidade junto à superfície do epitélio foveolar da mucosa do corpo ou antro, a densidade de colonização foi considerada baixa. Quando incontáveis colônias de bactérias estavam localizadas junto à superfície do epitélio foveolar da mucosa do corpo ou antro a densidade de colonização foi considerada alta.

2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico para Windows GraphPad Prism, versão 7.0 (La Jolla, Califórnia, EUA, www.graphpad.com). Cálculos da média, desvio-padrão, mediana e 95% do intervalo de confiança da média ou da mediana foram realizados para todas as variáveis quantitativas. Variáveis qualitativas foram descritas por número absoluto (N) e porcentagens (%). o teste exato de Fisher foi utilizado para comparações estatísticas entre variáveis categóricas. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados

3.1 Casuística

Foram analisadas 94 biópsias endoscópicas de mucosa gástrica, sendo 47 da região do antro e 47 do corpo gástrico, de crianças e adolescentes com dor abdominal e sinais de alerta, submetidas a endoscopia digestiva alta para investigação diagnóstica. A mediana de idade dos pacientes foi de 10 anos e 11 meses. A idade dos pacientes variou de 4 anos a 15 anos e 9 meses. Vinte e seis pacientes eram do sexo masculino (55,3%) e 21 pacientes do sexo feminino (44,7%). A Tabela 1 apresenta os dados clínicos, laboratoriais e antropométricos da população estudada (página 42)

3.2 Análise histopatológica das biópsias gástricas

A análise histológica pela Hematoxilina-Eosina (H&E) demonstrou infiltrado inflamatório em intensa atividade em 78/94 (83%) das biópsias analisadas. A Figura 2 apresenta exemplos de inflamação da mucosa gástrica na análise histopatológica convencional (página 47)

Na análise das diferentes regiões do estômago, inflamação em intensa atividade foi identificada em 42/47 (89,4%) biópsias do antro e em 36/47 (76,6%) biópsias do corpo,

não sendo identificada diferença significativa quanto à atividade inflamatória entre a mucosa do antro e do corpo gástrico. Os resultados da análise histopatológica são apresentados na Tabela 2 (página 43)

3.3 Análise da presença de agregados linfóides na mucosa do antro e do corpo gástrico.

Agregados linfóides foram observados em 32/47 (68,1%) biópsias do antro e em 16/47 (34%) biópsias da mucosa do corpo gástrico. A diferença foi significativa entre as regiões ($p < 0.002$). Os resultados da análise da frequência de agregados linfóides são demonstrados na Tabela 3 (página 44).

A Figura 3 demonstra exemplo de folículo linfóide identificado tanto na mucosa do antro como do corpo gástrico (página 48) .

3.4 Análise do Padrão de colonização por *H. pylori* (superficial versus profundo) na mucosa do antro e do corpo gástrico

A análise do padrão de colonização por *H. pylori* (superficial X profundo) evidenciou que 58/94 biópsias analisadas (61,7%) apresentaram colonização superficial da mucosa. Quando comparamos as regiões biopsiadas, colonização superficial foi observada em 45/47 (95,7%) biópsias do antro e em 13/47 (27,7%) biópsias do corpo.

Colonização profunda da mucosa foi identificada em 34/47 (72,3%) biópsias da mucosa do corpo e em 2/47 (4,3%) biópsias do antro gástrico, sendo a diferença significativa entre as regiões ($p < 0.0001$) quanto ao padrão de colonização por *H.pylori* (Tabela 4, página 45).

A Figura 4 apresenta exemplos de colonização superficial ou profunda do *H pylori* na mucosa gástrica, identificados na análise imuno-histoquímica (página 49)

3.5 Análise da densidade de colonização por *H.pylori* na mucosa do antro e do corpo gástrico

A análise imunohistoquímica demonstrou alta densidade de colonização em 71/94 (75,5%) das biópsias analisadas.

Na análise das diferentes regiões do estômago, alta densidade de colonização foi identificada em 39/47 (83%) biópsias do antro e 32/47 (68,1%) biópsias da mucosa do corpo gástrico. Quanto à densidade de colonização por *H.pylori* não houve diferença estatística entre corpo e antro. Os resultados da análise imunohistoquímica da densidade de colonização por *H.pylori* são apresentados na Tabela 5 (página 46).

A Figura 5 apresenta exemplos da densidade de colonização da mucosa gástrica pelo *H pylori* identificados na análise imuno-histoquímica (página 50).

4. Discussão

O presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de investigar o padrão de colonização do *Helicobacter pylori* (*H pylori*) na mucosa gástrica de crianças e adolescentes com dispepsia não ulcerosa. A análise foi retrospectiva em amostras do antro e do corpo gástrico, por exame histopatológico convencional e por método imuno-histoquímico.

Nossos resultados demonstraram alta frequência de colonização profunda do *H pylori* na mucosa do corpo em contraste com a colonização predominantemente superficial da mucosa do antro gástrico. Estes dados constituem uma alteração ainda não conhecida da infecção por *H pylori* na infância.

Identificamos na análise histopatológica convencional pela Hematoxilina & Eosina predomínio de inflamação em intensa atividade, tanto na mucosa do antro (89,4%), como

no corpo gástrico (76,6%). Nossos resultados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores em nosso país (Nogueira et al 2000; Langner et al 2009; Carvalho et al 2012), confirmando as características da infecção por *H pylori* na infância nos países em desenvolvimento.

A resposta inflamatória da mucosa gástrica à infecção por *H pylori* costuma apresentar proeminência de folículos linfóides (Genta and Hamner 1994; Zaitoun 1995; Kara et al 2014). A participação do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) corresponde à resposta imunológica do hospedeiro à infecção por *H pylori* (Genta and Hamner 1994). Endoscopicamente esta alteração é identificada como aspecto nodular da mucosa, que pode ser observado tanto na região do antro, como no corpo gástrico (Luzza et al 2002; Bahu et al 2003; Kara et al 2014). A proeminência de folículos linfóides está associada a inflamação de alto grau e à infecção por cepas patogênicas do *H pylori* (Luzza et al 2002; Bahu et al 2003; Kara et al 2014). Em nosso estudo a presença de agregados linfóides foi significativamente maior no antro (68,1%) quando comparada à do corpo gástrico (34%) e apresentou boa correlação com a intensidade da inflamação e com a densidade de colonização pelo *H pylori* na mucosa do antro gástrico.

Os avanços nos métodos imuno-histoquímicos têm sido fundamentais para melhor caracterizar os processos patológicos e identificar os agentes infecciosos nas lesões. Apesar do *H pylori* ser usualmente identificado no exame histopatológico convencional, métodos ancilares como a coloração de Giemsa e a análise imuno-histoquímica tem sido utilizados para melhorar a acurácia diagnóstica (Wang et al 2010; Batts et al 2013; Panarelli et al 2015; Lash and Genta 2016).

Em nosso estudo a análise imuno-histoquímica permitiu identificar com precisão tanto o padrão de colonização, superficial versus profundo, do *H pylori*, como a densidade de colonização, baixa versus alta, na mucosa do corpo e do antro gástrico. Nossos resultados demonstraram alta densidade de colonização tanto no antro (83%), como no

corpo gástrico (68,1 %). Estes resultados estão relacionados à intensidade da resposta inflamatória identificada na análise histológica convencional das amostras de mucosa gástrica de nosso estudo.

Outra vantagem da análise imuno-histoquímica em nosso estudo foi a possibilidade de identificar o padrão de colonização do *H pylori*, superficial versus profundo, nas biópsias gástricas. Observamos colonização no ápice das células epiteliais, que designamos como superficial, predominantemente na mucosa do antro (95,7%), quando comparada à mucosa do corpo gástrico, que apresentou padrão exclusivo de colonização superficial somente em 27,7% das amostras analisadas.

Um achado surpreendente na mucosa do corpo gástrico foi a identificação de bactérias situadas profundamente na camada glandular, nos espaços intercelulares, junto às células parietais. Este padrão de colonização profunda foi observado predominantemente na mucosa do corpo (72,3%), quando comparado à mucosa do antro gástrico, que apresentou bactérias na porção glandular da mucosa somente em 4,3% dos casos. Nosso estudo é o primeiro que demonstra colonização profunda do *H pylori* na mucosa gástrica na infância.

Esta localização peculiar do *H pylori* na profundidade da mucosa gástrica foi interpretada em estudos anteriores como indicativa de invasividade da bactéria na mucosa (Petersen and Kroghfelt 2003; Dubois 2007 a; b). Alguns autores sugeriram a possibilidade da localização intracelular do *H pylori*, em vacúolos no interior das células epiteliais e das células inflamatórias (Noach et al 1994; Jahla et al 2003; Necchi et al 2007). Entretanto, Dudley et al 2017 esclareceram esta controvérsia em estudo com biópsias de mucosa gástrica de indivíduos adultos que apresentavam *H pylori* localizado profundamente na mucosa. Este estudo demonstrou por microscopia eletrônica que os microorganismos estavam situados em vacúolos nos espaços intercelulares, apesar do

aspecto sugestivo de localização intracelular observado na microscopia óptica (Duddley et al 2017).

Nossos resultados demonstraram boa correlação entre a colonização profunda do *H pylori* e a intensidade da resposta inflamatória na mucosa do corpo, visto que 28 das 34 amostras do corpo gástrico (82,3%) apresentaram inflamação em intensa atividade. Além do grau de inflamação, a densidade de colonização bacteriana também apresentou boa correlação com a localização profunda do *H pylori* na mucosa, visto que 22 das 34 amostras do corpo gástrico (64.7%) com colonização profunda apresentaram alta densidade de colonização da mucosa.

O padrão de colonização profunda do *H pylori* observado na mucosa do corpo gástrico pode ser relacionado a vários fatores. A mobilidade da bactéria conferida pelos flagelos e pela morfologia em espiral, pode permitir à bactéria atingir regiões mais profundas da mucosa abaixo dos recessos foveolares (Jenks and Kusters 2000). Outra possibilidade poderia ser a afinidade da bactéria pela uréia que exsuda nas porções laterais das células epiteliais, através dos canais seletivos de ânions induzidos pela citotoxina Vac A, liberada pela bactéria (Atherton et al 1995; 1997).

A importância biológica da localização profunda do *H pylori* no compartimento glandular da mucosa gástrica deve ser melhor investigada. Por exemplo, a associação com cepas patogênicas da bactéria ainda não é conhecida. Outra possibilidade poderia ser a possível correlação com a resistência da bactéria à terapia convencional com antibióticos. A localização profunda da bactéria no interior de vacúolos poderia servir como reservatório para recolonização da bactéria após tratamento antibiótico.

Outra possibilidade poderia ser a associação com o risco para desenvolvimento de câncer gástrico. Em estudo anterior de nosso grupo identificamos a presença de DNA de *H pylori* em mais de 90% de um grupo de pacientes portadores de câncer gástrico (Thomazini et al 2006). Naquele estudo a análise morfológica convencional da mucosa

gástrica adjacente ao câncer avaliou a intensidade da inflamação e a presença de metaplasia intestinal. Não foram consideradas as características da colonização da mucosa pelo *H pylori*.

Em síntese, os resultados do presente estudo demonstraram predomínio de inflamação em intensa atividade e de alta densidade de colonização em ambas as regiões do estômago. Entretanto, o padrão de colonização da mucosa gástrica pelo *H pylori* diferiu entre as regiões investigadas. A colonização foi predominantemente superficial no antro e profunda na mucosa do corpo. Portanto, nosso estudo demonstrou que este padrão diferencial de colonização ocorre desde a infância, que constitui a etapa inicial da infecção por *H pylori* em humanos. A importância biológica deste padrão diferencial de colonização deve ser melhor investigada.

5. Referências

1. Apley J, Naish N. Recurrent abdominal pain: a field survey of 1.000 school children. *Arch Dis Child*. 1958; 33:165-70.
2. Atherton J, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TC. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771–77.
3. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. The clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, encoding the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997;112:92–99.
4. Bahú Mda G, da Silveira TR, Maguilnick I, Ulbrich-Kulczynski J. Endoscopic nodular gastritis: an endoscopic indicator of high-grade bacterial colonization and severe gastritis in children with *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36(2):217-22.
5. Batts KP, Ketover S, Kakar S, Krasinskas AM, Mitchell KA, Wilcox R, Westerhoff M, Rank J, Gibson J, Mattia AR, Cummings OW, Davison JM, Naini BV, Dry SM, Yantiss RK; Rodger C Haggitt Gastrointestinal Pathology Society. Appropriate use of special stains for identifying *Helicobacter pylori*: Recommendations from the Rodger C Haggitt Gastrointestinal Pathology Society. *Am J Surg Pathol* 2013;37(11):e12-22.
6. Blaser MJ, Atherton J. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004;113:321–333.
7. Cabral MM, Mendes CM, Castro LP, Cartelle CT, Guerra J, Queiroz DM, Nogueira AM. Apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis is related to cagA status. *Helicobacter* 2006;11(5):469-7.
8. Cabral MM, Oliveira CA, Mendes CM, Guerra J, Queiroz DM, Rocha GA, Rocha AM, Nogueira AM. Gastric epithelial cell proliferation and cagA status in *Helicobacter pylori* gastritis at different gastric sites. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42(5):545-54.
9. Calvet X, Ramirez Lazaro MJ, Lehours P, Megraud F. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2013;18(Suppl. 1):5e11.
10. Carvalho MA, Machado NC, Ortolan EVP, Rodrigues, MAM. Upper gastrointestinal histopathological findings in children and adolescents with nonulcer dyspepsia with *Helicobacter pylori* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55: 523–9.

11. Camorlinga-Ponce M, Aviles-Jimenez F, Cabrera L, Hernández-Pando R, Muñoz O, Soza J, Torres J. Intensity of inflammation, density of colonization and interleukin-8 response in the gastric mucosa of children infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2003; 8: 554-60.
12. Correa Silva RG, Machado NC, Carvalho MA, Rodrigues MA. *Helicobacter pylori* infection is high in paediatric nonulcer dyspepsia but not associated with specific gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr.* 2016;105(5):e228-31.
13. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1161-81.
14. Dubois A, Boren T. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol* 2007; 9:1108-16.
15. Dubois A. Intracellular *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis: an “old” frontier worth revisiting. *Gastroenterology* 2007; 132:1177-80.
16. Dudley J, Wieczorek T, Selig M, Cheung H, Shen J, Odze R, Deshpande V, Zukerberg L. Clinicopathological characteristics of invasive gastric *Helicobacter pylori*. *Hum Pathol.* 2017; 61:19-25.
17. Freire de Melo F, Rocha GA, Rocha AM, Teixeira KN, Pedrosa SH, Pereira Junior JB, Fonseca de Castro LP, Cabral MM, Carvalho SD, Bittencourt PF, de Oliveira CA, Queiroz DM. Th1 immune response to *H. pylori* infection varies according to the age of the patients and influences the gastric inflammatory patterns. *Int J Med Microbiol* 2014;304(3-4):300-6.
18. Genta RM, Hamner HW. The significance of lymphoid follicles in the interpretation of gastric biopsy specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 1994;118(7):740-3.
19. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2017 ;153(2):420-429.
20. Jenks, P.J. & Kusters, J.G. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 16 (suppl. 1): S11-8, 2000.
21. Jhala NC, Siegal GP, Klemm K, Atkinson BF, Jhala DN. Infiltration of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa. *Am J Clin Pathol* 2003; 119, 101-107.

22. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Biomed J. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis.* 2016;39(1):14-23.
23. Kara N, Urganci N, Kalyoncu D, Yilmaz B. The association between *Helicobacter pylori* gastritis and lymphoid aggregates, lymphoid follicles and intestinal metaplasia in gastric mucosa of children. *J Paediatr Child Health* 2014;50(8):605-9.
24. Ladeira, MSP; Salvadori, DMF; Rodrigues, MAM. Biopathology of *Helicobacter pylori*. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39 (4): 335-42.
25. Lash RH, Genta RM. Routine Anti-*Helicobacter* Immunohistochemical Staining is Significantly Superior to Reflex Staining Protocols for the Detection of *Helicobacter* in Gastric Biopsy Specimens. *Helicobacter* 2016;21(6):581-585.
26. Leite, KRM; Darini, E; Canavez, FC; Carvalho, CM; Mitteldorf, CATS; Camara-Lopes, L H. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med. J.* 2005; 123 (3): 113-18.
27. Langner M, Machado RS, Patrício FR, Kawakami E. Evaluation of gastric histology in children and adolescents with *Helicobacter pylori* gastritis using the Update Sydney System. *Arq Gastroenterol.* 2009;46(4):328-32.
28. Lizza F, Pensabene L, Imeneo M, Mancuso M, Giancotti L, La Vecchia AM, Costa MC, Strisciuglio P, Pallone F. Antral nodularity and positive CagA serology are distinct and relevant markers of severe gastric inflammation in children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002;7(1):46-52.
29. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007;21:205–14.
30. Nai, GA; Parizi, ACG; Barbosa, RL. Association between *Helicobacter pylori* concentration and the combining frequency of histopathological findings in gastric biopsies specimens. *Arq Gastroenterol* 2007; 44 (3): 240-43.
31. Necchi V, Candusso ME, Tava F, Luinetti O, Ventura U, Fiocca R, Ricci V, Solcia E. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 132, 1009-1023.
32. Noach LA, Rolf TM, Tytgat GN. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* 1994; 47:699-704.

33. Nogueira, AMF.; Guimarães, AC ; Paturle, P ; Cabral, MDA ; Oliveira, CA ; Carvalho, AST; Queiroz, DMM; Oliveira, AMR; Rocha, GA . Gastrite associada ao *H pylori* em adultos e crianças: estudo comparativo. J Bras Patol Med Lab, 2000; 36 (2): 110-117.
34. Panarelli NC, Ross DS, Bernheim OE, Landzberg ZB, Schuetz AN, Jenkins SG, Landzberg BR, Jessurun J, Yantiss RK. Utility of ancillary stains for *Helicobacter pylori* in near-normal gastric biopsies. Hum Pathol 2015;46(3):397-403.
35. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Pe´rez-Pe´rez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression to *cagA* *Helicobacter pylori* strains. Laboratory Investigation 1995;73:760–770.
36. Peek RM, Blaser, MJ. Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-induced gastritis and peptic ulcer disease. Am J Med, v. 102, p. 200-5, 1997.
37. Petersen AM, Krogfelt KA. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 36:117-26.
38. Queiroz DM, Mendes EN, Carvalho AS, Rocha GA, Oliveira AM, Soares TF, Santos A, Cabral MM, Nogueira AM. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. J Infect Dis 2000;181(2):626-30.
39. Queiroz, DMM; Carneiro, JG; Braga-Neto, MB; Fialho, ABC; Fialho, AM; Goncalves, MHB; Rocha, GA; Rocha, Andreia MC; Braga, LLB. Natural History of *Helicobacter pylori* Infection in Childhood: Eight-Year Follow-Up Cohort Study in an Urban Community in Northeast of Brazil. Helicobacter 2012; 17: 23-29.
40. Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens. Gastroenterology 2010;139(6):1894-1901.
41. Thomazini, CM; Pinheiro, NA; Pardini, MI; Naresse, LE; Rodrigues, MAM. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: distribution of *cagA* and *vacA* genotypes in patients with gastric carcinoma. J Bras Patol Med Lab 2006; 42 (1): 25-30.
42. Wang XI, Zhang S, Abreo F, Thomas J. The role of routine immunohistochemistry for *Helicobacter pylori* in gastric biopsy. Ann Diagn Pathol 2010;14(4):256-9.
43. Warren, JR & Marshall, BJ. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, 16 1(8390): 1311-5, 1984.

44. Zaitoun AM. The prevalence of lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* associated gastritis in patients with ulcers and non-ulcer dyspepsia. *J Clin Pathol* 1995; 48(4):325-9.

Tabela 01. Variáveis clínicas e antropométricas de crianças e adolescentes com dor abdominal crônica e dispepsia não ulcerosa associada à infecção por *H. pylori*.

	Masculino	Feminino
Gênero (%)	26 (55,4)	21 (44,6)
Idade na primeira consulta* (meses)	109	128
Tempo de sintomas* (meses)	26,1	17
Dor epigástrica %	46,6	30,7
Dor Peri umbilical %	20	0
Dor Noturna %	13,3	30,7
Hemoglobina (g/dL)	12,35	13,29
Volume Corpuscular Médio (fL)	79,4	82,16
Leucócitos (células/mm ³)	7,28mil	6,95mil
Plaquetas (células/mm ³ *10 ³)	313,15	340,5
Escore z IMC para idade	-0,19	-0,08

* Mediana

Tabela 2 Intensidade da inflamação na mucosa do antro e do corpo gástrico nos casos de pangastrite por *H. pylori*

Teste Exato de Fisher p=0.17

Inflamação	Estomago		
	Corpo (%)	Antro (%)	Total (%)
Leve	11 (23,4)	5 (10,6)	16 (17)
Intensa	36 (76,6)	42 (89,4)	78 (83)
Total	47 (100)	47 (100)	94 (100)

Tabela 3 Frequência de agregados linfóides na mucosa do antro e do corpo gástrico nos casos de pangastrite por *H. pylori*.

Agregados Linfóides	Estomago		
	Corpo (%)	Antro (%)	Total (%)
Ausente	31 (66)	15 (31,9)	46 (48,9)
Presente	16 (34)	32 (68,1)	48 (51,1)
Total	47 (100)	47 (100)	94 (100)

Teste Exato de Fisher $p < 0.002$

Tabela 4 Padrão de colonização por *H. pylori* (superficial versus profunda) na mucosa do antro e do corpo gástrico nos casos de pangastrite.

Padrão Clonização	Estômago		
	Corpo (%)	Antro (%)	Total (%)
Superficial	13 (27,7)	45 (95,7)	58 (61,7)
Profunda	34 (72,3)	2 (4,3)	36 (38,3)
Total	47 (100)	47 (100)	94 (100)

Teste Exato de Fisher $p < 0.0001$

Tabela 5 Densidade de colonização por *H. pylori* na mucosa do antro e do corpo gástrico nos casos de pangastrite.

Densidade colonização	Estômago		
	Corpo	Antro	Total
Baixa	15 (31,9)	8 (17)	23 (24,5)
Alta	32 (68,1)	39 (83)	71 (75,5)
Total	47 (100)	47 (100)	94 (100)

Teste Exato de Fisher $p < 0.15$

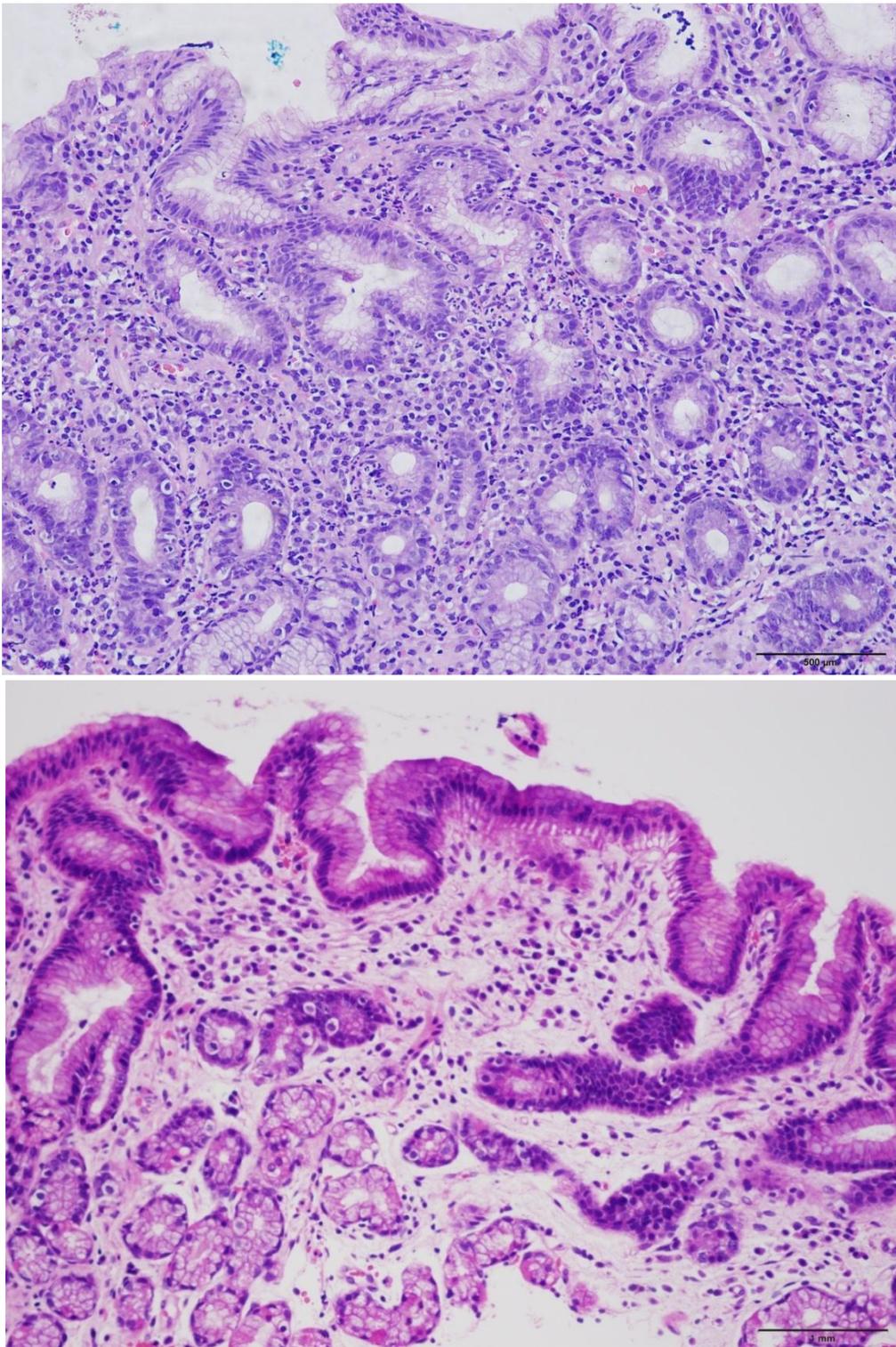


Figura 2 Mucosa gástrica com inflamação em intensa atividade (A) (400X). Mucosa gástrica com inflamação leve (B) 200X) (H&E).

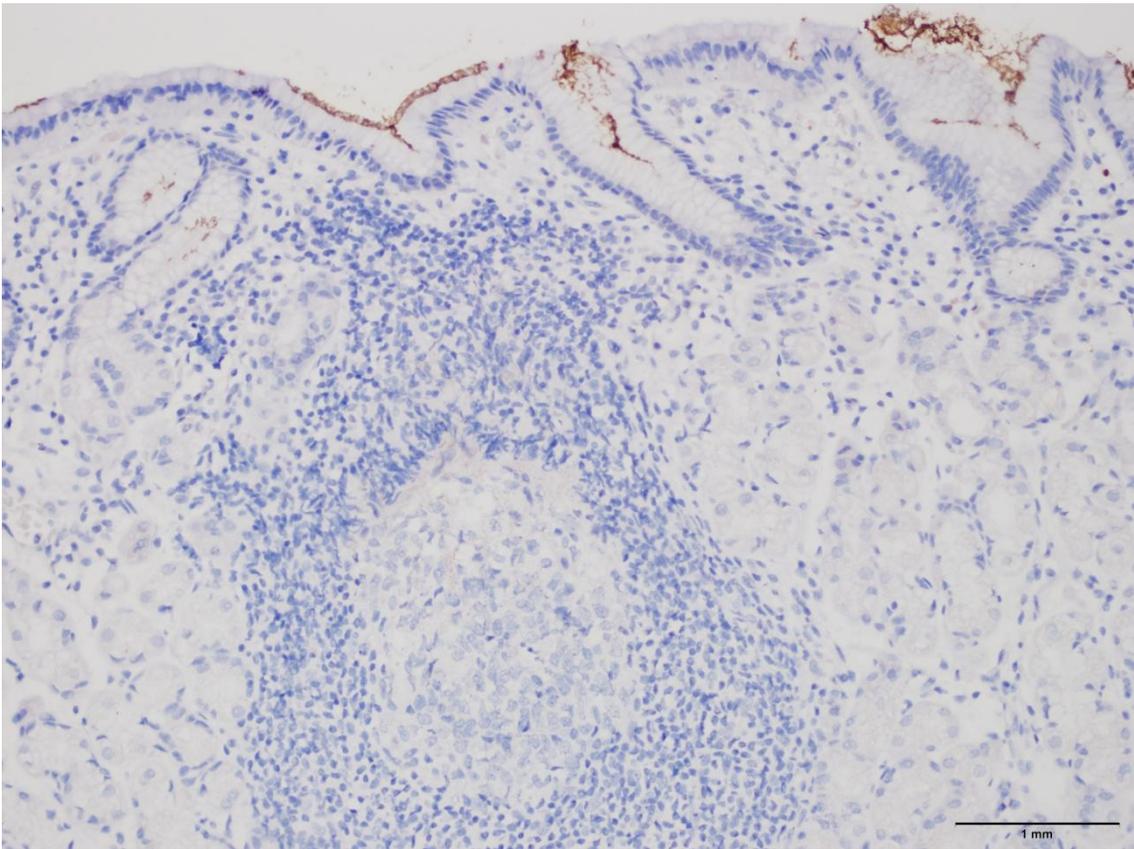


Figura 3 Mucosa gástrica com proeminência de folículo linfóide. Padrão superficial de colonização. Alta densidade de colonização por *H pylori*.(IHQ anti *Hp ylori*200X).

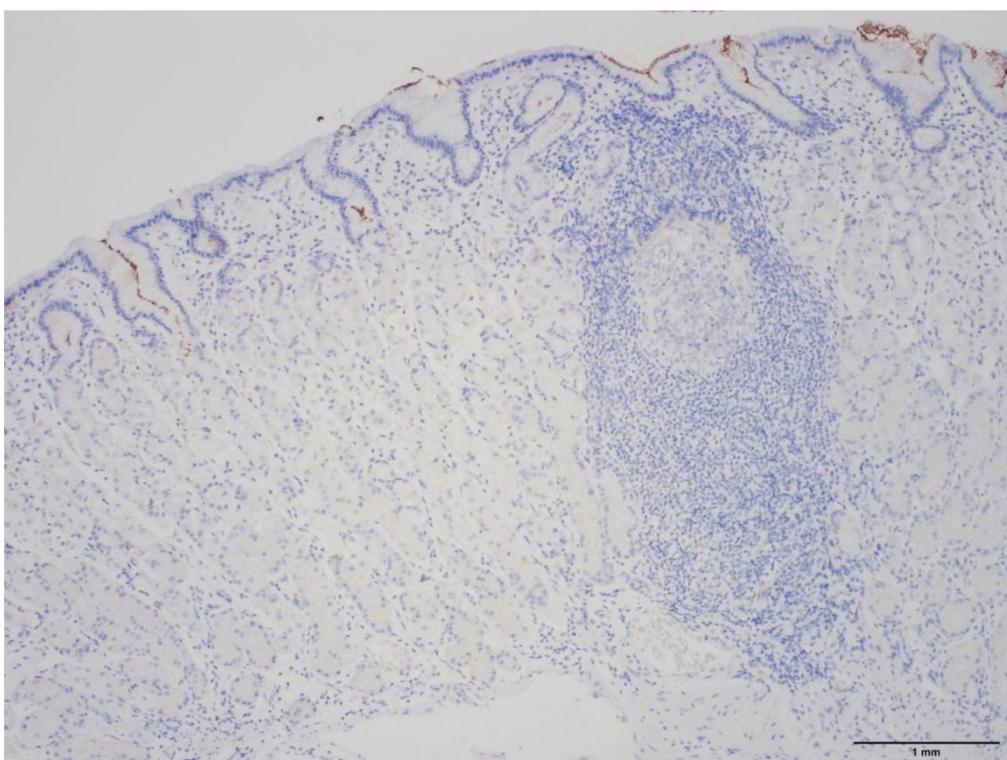
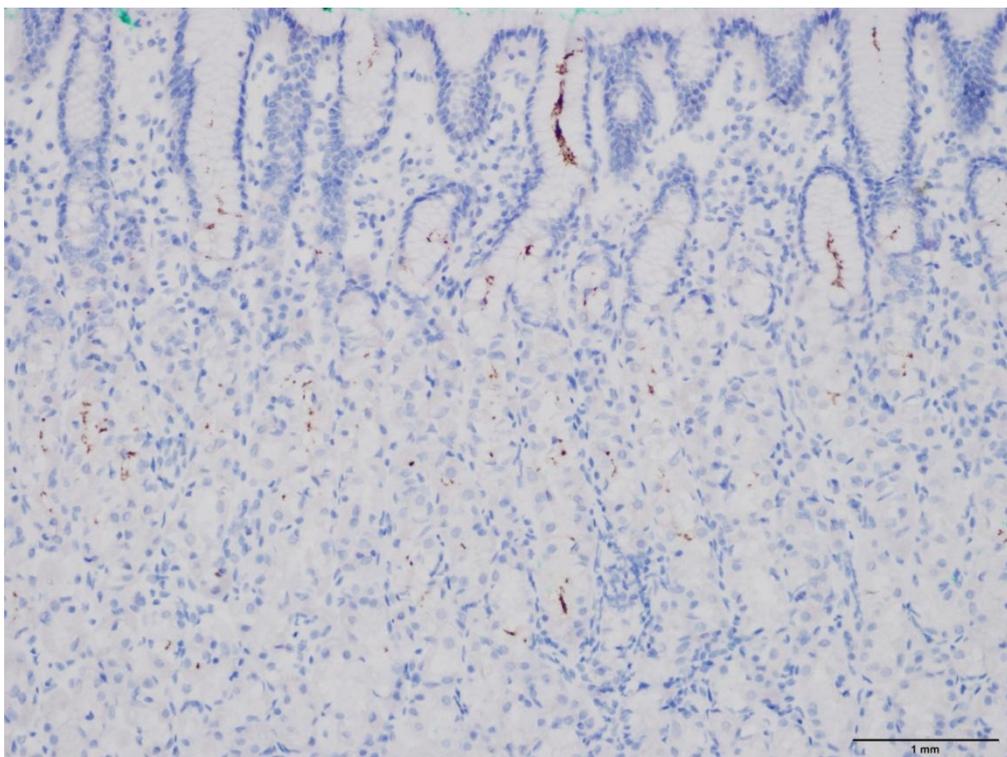


Figura 4 Mucosa gástrica com colonização profunda por *H pylori* (A) (200X). Mucosa com colonização superficial por *H pylori* (B) 100X) (IHQ anti-*H pylori*).

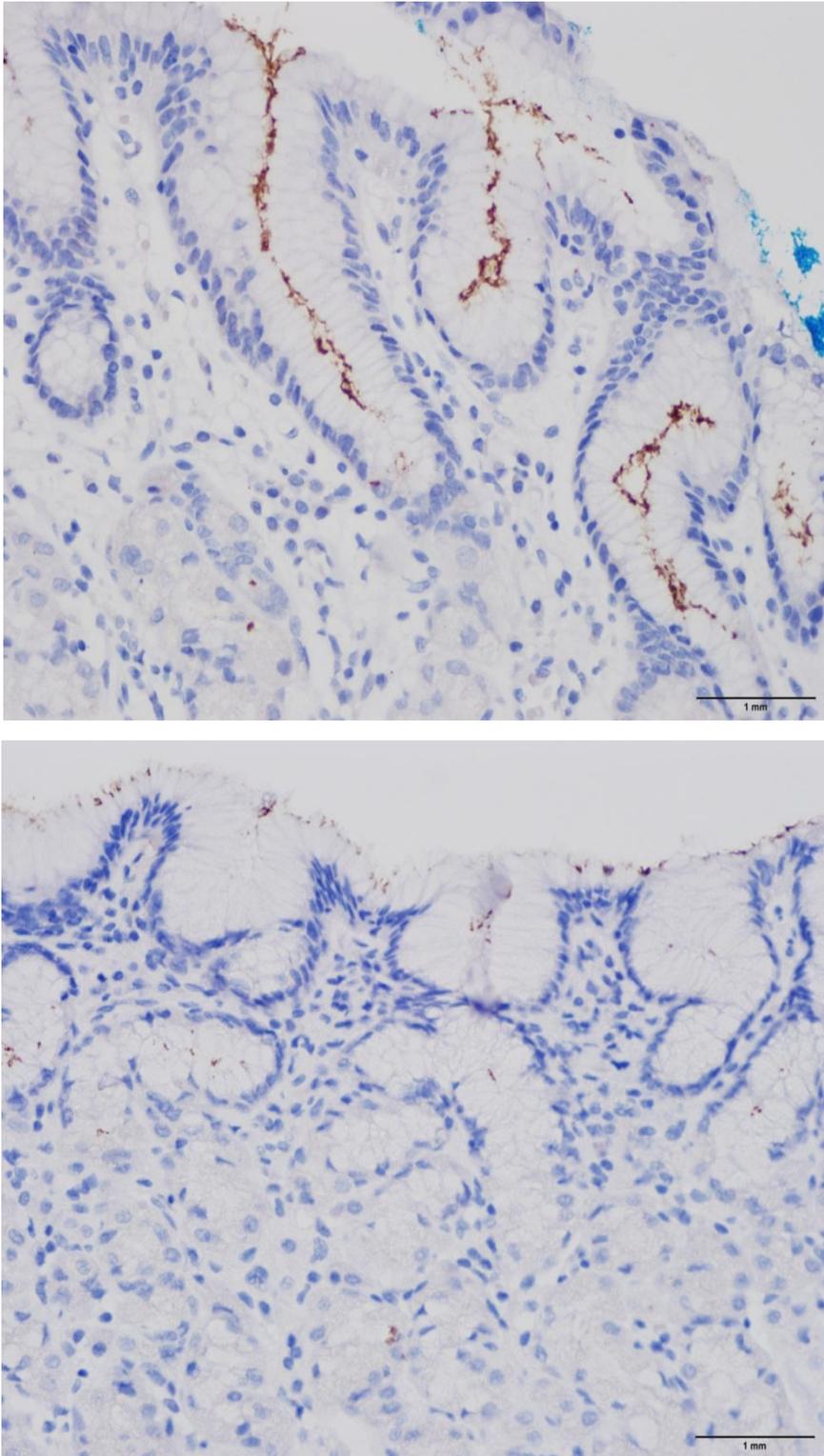


Figura 5 Mucosa gástrica com alta densidade de colonização por *H pylori* (A) (400X).

Mucosa com baixa densidade colonização por *H pylori* (B) 200X). (IHQ anti-*H pylori*).

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Padrão de colonização da mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* e sua correlação com dor abdominal crônica e dispepsia não ulcerosa em crianças e adolescentes.

Pesquisador: LEANDRO CACURE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03035018.7.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.055.272

Apresentação do Projeto:

Estudo observacional e retrospectivo em crianças e adolescentes atendidos ambulatorialmente no serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu, que foram investigadas devido à dor abdominal crônica com mais de três meses de duração, de acordo com os critérios de Apley (Apley & Naish, 1958), num período de 5 anos, de janeiro de 2012 a dezembro de 2017 e cuja investigação resultou em diagnóstico de pangastrite por *H. pylori*. O estudo incluirá um subconjunto de pacientes, com dispepsia crônica associada à gastrite por *H. pylori*, que foram submetidos à Endoscopia Gastrointestinal Alta e biópsia de estômago. Serão avaliadas as características clínicas mediante dados que constam em prontuário e as características histopatológicas em biópsias gástricas que constam dos arquivos do serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar em crianças e adolescentes com Dor Abdominal Crônica do tipo dispepsia não ulcerosa, associada à infecção pelo *H. pylori* o padrão de colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*, superficial versus profundo, mediante método imunohistoquímico; **Objetivo Secundário:** Descrever as características clínicas e histopatológicas das biópsias gástricas utilizando o Sistema de Sydney atualizado para a classificação da gastrite de *H. pylori*; investigar se existe correlação entre o padrão de colonização da mucosa com a intensidade da inflamação no

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.055.272

antro e no corpo gástrico; investigar se existe correlação entre o padrão de colonização da mucosa com a densidade de colonização, alta densidade versus baixa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores afirmam que não haverá riscos para os pacientes, pois se trata de estudo do tipo caso-controle, retrospectivo e não intervencionista, em pacientes que já foram investigados para a presença de gastrite por *Helicobacter pylori* mediante biópsia gástrica, baseado em critérios definidos internacionalmente pela literatura. Afirmam ainda que a avaliação de dados de prontuários e das biópsias gástricas não implicarão em quaisquer interferências no plano terapêutico ou de seguimento das crianças.

Não há benefícios diretos para os pacientes, mas sim para o conhecimento científico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Segundo a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde foram apresentados os documentos obrigatórios conforme seguem: folha de rosto adequadamente preenchida e assinada pelo diretor da instituição proponente, termo de anuência institucional (HC-FMB, Departamento de Pediatria e Departamento de Patologia), informações básicas e projeto de pesquisa.

Os autores solicitam dispensa do TCLE justificando tratar-se de estudo retrospectivo e não intervencionista, em pacientes que já foram investigados anteriormente para a presença de gastrite por *Helicobacter pylori* mediante biópsia gástrica, sendo o foco principal deste estudo a re-análise de lâminas de biópsias gástricas que constam dos arquivos do serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Também serão avaliados dados clínicos e demográficos de prontuários, mas a maioria dos pacientes deste estudo foram atendidos há muito tempo e já obtiveram alta do serviço após tratamento da infecção gástrica e não se encontram mais em seguimento, sendo difícil a localização dos familiares por não frequentarem regularmente o hospital. Considera-se a justificativa válida.

Recomendações:

Recomenda-se apresentação dos resultados finais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em reunião ordinária, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.055.272

apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 03 de dezembro de 2018, o projeto analisado encontra-se APROVADO, sem (com) necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "NOTIFICAÇÃO".

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1194024.pdf	09/11/2018 10:54:33		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaPediatria.pdf	09/11/2018 10:52:14	Mary de Assis Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisaEnviadoSipe.pdf	09/11/2018 10:49:07	Mary de Assis Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	SolicitacaoDispensaDoTCLE_LeandroCacure.pdf	09/11/2018 10:46:02	Mary de Assis Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaPatologia.pdf	09/11/2018 10:40:14	Mary de Assis Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaHcFmb.pdf	09/11/2018 10:39:10	Mary de Assis Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf	09/11/2018 10:31:52	Mary de Assis Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	09/11/2018 10:30:55	Mary de Assis Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 3.055.272

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 04 de Dezembro de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br