

**Carlyle Marques Barral**

**ESVAZIAMENTO GÁSTRICO E GASTRINEMIA EM  
GERBIS INFECTADOS COM CEPAS DE *Helicobacter  
pylori* DE DIFERENTES EXPRESSÕES GÊNICAS PARA O  
FRAGMENTO EPYIA**

Belo Horizonte  
2013

**CARLYLE MARQUES BARRAL**

**ESVAZIAMENTO GÁSTRICO E GASTRINEMIA EM GERBIS  
INFECTADOS COM CEPAS DE *Helicobacter pylori* DE DIFERENTES  
EXPRESSÕES GÊNICAS PARA O FRAGMENTO EPYIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Duval de Araújo

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Anatomofisiopatogenia cirúrgica

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
Minas Gerais – Brasil  
2013

B268e Barral, Carlyle Marques.  
Esvaziamento gástrico gastrinemia em gerbis infectados com cepas de Helicobacter Pylori de diferentes expressões gênicas para o fragmento epyia [manuscrito]. / Carlyle Marques Barral. -- Belo Horizonte: 2013.  
60f.: il.  
Orientador: Ivana Duval de Araújo.  
Co-Orientador: Rafael Calvão Babuto.  
Área de concentração: Anatomofisiopatogenia Cirúrgica.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Esvaziamento Gástrico. 2. Cintilografia. 3. Motilidade Gastrointestinal. 4. Helicobacter Pylori. 5. Infecções por Helicobacter. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Araújo, Ivana Duval. II. Babuto, Rafael Calvão. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM : WC 200

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**REITOR:** Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

**VICE-REITORA:** Profa. Dra. Rocksane de Carvalho Norton

**PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

**PRÓ-REITOR DE PESQUISA:** Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETOR:** Prof. Dr. Francisco José Penna

**VICE-DIRETOR:** Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

**COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa  
Rocha

**SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Profa. Dra. Teresa Cristina de  
Abreu Ferrari

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA:** Prof.Dr. Marcelo Eller Miranda

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA:** Prof. Dr.  
Roberto Eustáquio Santos Guimarães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À  
CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA:** Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

**SUB-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À  
CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA:** Profa. Dra. Ivana Duval de Araujo

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Profa. Dra Ivana Duval de Araujo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral - representante discente

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ivana Duval Araújo, exemplo de dedicação à vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto, por fortalecer em mim o interesse pela Pesquisa.

À Ana Elisa Diniz, acadêmica da Faculdade de Medicina da UFMG e futura colega, por todo o auxílio prestado.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da UFMG pelo apoio dedicado, em especial à Profa. Dra. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz e ao biólogo Fabrício Freire de Melo.

À Paula Vidigal e Fapemig pelo suporte financeiro.

*“Para entender o coração e a mente de uma  
pessoa, não olhe para o que ela já conseguiu,  
mas para o que ela aspira.”*

*Gibran Khalil Gibran*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A infecção pelo *Helicobacter pylori* (HP) promove alterações gástricas como a inflamação e mudanças nos hormônios gastrointestinais, que parecem estar intimamente relacionadas a distúrbios motores gástricos. É possível que cepas com diferentes perfis de patogenicidade induzam a uma resposta hormonal e motora de diferente intensidade. **OBJETIVOS:** Avaliar o padrão de esvaziamento gástrico e a gastrinemia sérica de gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) infectados por cepas de HP com diferentes padrões de patogenicidade. **MATERIAIS E MÉTODO:** Foram utilizados 56 gerbis da Mongólia, fêmeas, com quatro meses de idade e peso médio de 80,0 g. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: A (n=8), animais do grupo controle mantidos em observação durante 180 dias; B (n=16), animais infectados com cepa padrão *CagA* negativo, sendo oito animais (B1) avaliados aos 45 dias de infecção e os oito restantes (B2) aos 180 dias de infecção; C (n=16), animais infectados com cepa de HP com loci com 1 *epya*, sendo oito animais (C1) avaliados aos 45 dias da infecção e os oito restantes (C2) aos 180 dias de infecção; D (n=16), animais infectados com cepa *CagA* positivo e com loci com 3 *epyas*, sendo oito animais avaliados aos 45 dias de infecção (D1) e os oito restantes aos 180 dias de infecção (D2). O esvaziamento gástrico foi determinado por meio de estudo cintilográfico realizado em gama-câmara Ventri<sup>®</sup> (GE-Healthcare Medical Systems<sup>®</sup>, Milwaukee, EUA) após administração de solução nutriente contendo leite e 7,4 MBq de <sup>99m</sup>Tc-Fitado. A identificação da presença do microorganismo no antro gástrico foi realizada por meio da “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR). As lâminas do antro gástrico foram avaliadas quanto ao grau de inflamação, classificando o infiltrado em ausente, leve, moderado e acentuado. A gastrina sérica foi dosada por técnica imunoenzimática (ELISA). **RESULTADOS:** O estudo da PCR foi positivo em todos os fragmentos do antro dos animais infectados (grupos B, C e D) e negativo nos animais não infectados (grupo A). Os resultados obtidos mostraram maior resposta inflamatória no grupo D aos 45 e aos 180 dias de infecção. Houve aumento da velocidade de esvaziamento gástrico nos grupos B e C, redução significativa da gastrinemia no grupo D e aumento da concentração sérica do hormônio no grupo C. **CONCLUSÕES:** Diferentes

cepas de HP exibiram diferentes padrões na secreção de gastrina e esvaziamento gástrico, com cepas CagA negativo e 1 epyia mostrando perfil hipersecretor hormonal e de hipermotilidade, e cepas com 3 epyias com perfil de menor secreção de gastrina e hipomotilidade gástrica.

Palavras-Chave: Esvaziamento Gástrico; Cintilografia; Motilidade Gastrointestinal; *Helicobacter pylori*; Infecções por *Helicobacter*; Experimentação animal.



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Infection with *Helicobacter pylori* (HP) promotes gastric changes such as inflammation and changes in gastrointestinal hormones, which seem to be closely related to gastric motor disorders. It is possible that strains with different pathogenic profiles induce hormonal and motor response with different intensity. **OBJECTIVES:** This study aimed to evaluate the pattern of gastric emptying and serum gastrin of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) infected with strains of HP with different patterns of pathogenicity. **MATERIALS AND METHODS:** A total of 56 Mongolian gerbils, females, four months old, and weighing 80.0 g were used. The animals were divided into four experimental groups: A (n = 8), control animals kept under observation for 180 days; B (n = 16), animals infected with standard strain CagA negative, consisting of eight animals (B1) studied for 45 days of infection and the remaining eight (B2) evaluated 180 days after infection; C (n = 16), animals infected with strain of HP with 1 epyia loci, consisting of eight animals (C1) studied 45 days after infection and the remaining eight (C2) after 180 days of infection; and D (n = 16), animals infected with CagA-positive strains and loci with 3 epyias, with eight animals evaluated 45 days after infection (D1) and eight animals studied 180 days after infection (D2). Gastric emptying was determined by a scintigraphic study performed in a Ventri<sup>®</sup> gamma camera (GE-Healthcare Medical Systems<sup>®</sup>, Milwaukee, EUA) after administration of a nutrient solution containing peptone broth 50% (Biobrás, Brazil) and 7.4 MBq of Phytate-<sup>99m</sup>Tc. Microorganism presence in the gastric antrum was identified by polymerase chain reaction (PCR). The gastric antrum slides were evaluated for the degree of inflammation, with infiltration ranked as absent, mild, moderate, and severe. Serum gastrin was measured by enzyme immunoassay (ELISA). **RESULTS:** The PCR study was positive in all fragments from the antrum and body of infected animals (groups B, C, and D) and negative in non-infected animals (group A). The results showed greater inflammatory response in group D at 45 and 180 days of infection. There was an increase of the emptying rate in groups B and C, significant gastrin reduction in groups B and D, and increased hormone serum concentration in group C. **CONCLUSIONS:** Different strains of HP exhibited different patterns in gastrin secretion and gastric emptying, with CagA-negative strains and 1 epyia showing hypersecretory hormonal profile and hypermotility, and strains with 3 epyias with reduced secretion of gastrin and gastric hypomotility profile.

**Keywords:** Gastric Emptying; Radionuclide Imaging; Gastrointestinal Motility; *Helicobacter pylori*; *Helicobacter* Infections; Animal Experimentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inóculo de <i>Helicobacter pylori</i> em caldo Brucella.	24
Figura 2 - Agulha (a) para inoculação de suspensão bacteriana no estômago de gerbil (b).	25
Figura 3 - Estação de processamento Xeleris <sup>®</sup> (GE-Healthcare Medical Systems <sup>®</sup> , Milwaukee, EUA).	26
Figura 4 - Imagens obtidas imediatamente após a administração do radiofármaco (seta branca) e após 20, 40 e 60 minutos (seta amarela) da administração do radiotraçador.	27
Figura 5 - Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (setas) em antro gástrico de gerbil infectado com <i>Helicobacter pylori</i> .	32

## LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

Quadro 1 - Condições do método de PCR.	29
Gráfico 1 - Percentual de amostras de antro gástrico de gerbis infectados com diferentes cepas de <i>Helicobacter pylori</i> com inflamação moderada a acentuada após 45 ou 180 dias de permanência da infecção.	32
Gráfico 2 - Média do percentual de esvaziamento gástrico de gerbis após 45 dias de infecção com diferentes cepas de <i>Helicobacter pylori</i> após 60 minutos da administração de refeição proteica.	33
Gráfico 3 - Média do percentual de esvaziamento gástrico de gerbis após 180 dias de infecção com diferentes cepas de <i>Helicobacter pylori</i> após 60 minutos da administração de refeição proteica.	34
Gráfico 4 - Média de esvaziamento gástrico após 60 minutos de refeição proteica em gerbis infectados com diferentes cepas de <i>Helicobacter pylori</i> , aos 45 e 180 dias de infecção.	35
Gráfico 5 - Média da gastrinemia em gerbis infectados com diferentes cepas de <i>Helicobacter pylori</i> aos 45 dias de infecção.	36
Gráfico 6 - Média da gastrinemia em gerbis infectados com diferentes cepas de <i>Helicobacter pylori</i> aos 180 dias de infecção.	37
Gráfico 7 - Média da gastrinemia em gerbis infectados com diferentes cepas de <i>Helicobacter pylori</i> aos 45 e 180 dias de infecção.	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{99m}\text{Tc}$ -Fitato – Fitato marcado com Tecnécio-99 metaestável

BHM – meio Belo Horizonte

*Cag* – “*citotoxin antigen*” ou citocina antigênica

*CagA* – “*citotoxin antigen associated A*” ou citocina antigênica associada ao gene A

CG – câncer gástrico

Células D – células produtoras de somatostatina

Células G – células produtoras de gastrina

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

cm – centímetros

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CRF – contagem radioativa final

CRI – contagem radioativa inicial

DUP – doença ulcerosa péptica

EG – esvaziamento gástrico

ELISA – “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” ou ensaio de imunoabsorção ligado à enzima

FM – Faculdade de Medicina

g – grama

Hh1 – *Helicobacter heilmannii* tipo 1

HP – *Helicobacter pylori*

IARC – “*International Agency for Research on Cancer*” ou Agência Internacional de Pesquisa do Câncer

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IL-1 $\beta$  – interleucina 1 beta

kg – quilograma

MBq – MegaBequerel

min – minuto

mL – mililitros

mm – milímetro

nm – nanômetro

PCR – “*Polymerase Chain Reaction*” ou reação em cadeia de polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

SS1 – “*Sidney strain type 1*” ou cepa de *Sidney* tipo 1

TNF- $\alpha$  – “*tumoral necrosis factor alfa*” ou fator de necrose tumoral alfa

UFC – unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UP – úlcera péptica

VacA – “*vacuolating associated A*” ou citocina vacuolizante associada ao gene A

WHO – “*World Health Organization*” ou Organização Mundial da Saúde

$\mu$ L – microlitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius ou graus centígrados

$\alpha$  – alfa

$\beta$  – beta

® – marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 OBJETIVOS</b>	20
<b>3 RELEVÂNCIA</b>	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODO</b>	22
4.1 ÉTICA	22
4.2 ANIMAIS UTILIZADOS E CUIDADOS DISPENSADOS	22
4.3 DESENHO DA PESQUISA	22
4.4 OBTENÇÃO DOS INÓCULOS	23
4.5 INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS	24
4.6 ESVAZIAMENTO GÁSTRICO	25
4.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO GÁSTRICO	28
4.8 IDENTIFICAÇÃO DO <i>Helicobacter pylori</i> NO TECIDO GÁSTRICO	28
4.9 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO TECIDO GÁSTRICO	29
4.10 DOSAGEM DA GASTRINA SÉRICA	30
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
<b>5. RESULTADOS</b>	31
5.1 POSITIVIDADE DA INFECÇÃO	31
5.2 ATIVIDADE INFLAMATÓRIA	31
5.3 ÍNDICE DE ESVAZIAMENTO GÁSTRICO	33
5.4 GASTRINEMIA	35
<b>6 DISCUSSÃO</b>	39
<b>7 CONCLUSÃO</b>	46
<b>REFERÊNCIAS</b>	47
<b>APÊNDICES</b>	56
<b>ANEXOS</b>	58

# 1 INTRODUÇÃO

A úlcera péptica (UP) é uma doença de distribuição universal e atinge entre 5% e 10% da população geral. Desde o final do século XIX, quando o médico francês Jean Cruveilhier fez a descrição anatomopatológica da UP, até o final do século passado, o tratamento de escolha era a operação. Até essa época, a fisiopatologia da doença fundamentava-se no desequilíbrio entre os fatores defensivos e agressivos da mucosa gástrica e/ou duodenal<sup>1</sup>. A partir de 1970, com o surgimento dos antiácidos e bloqueadores H<sub>2</sub>, houve declínio do número de operações e, desde a descoberta do *Helicobacter pylori* (HP) por Warren e Marshall em 1983<sup>2</sup>, houve redução na prevalência da doença e o tratamento operatório ficou restrito às complicações e falência da terapêutica clínica. Além disso, ao se conhecer o agente etiológico da doença, o estudo de vários dos seus aspectos tomou um novo impulso.

Em 1983, Warren e Marshall<sup>2</sup>, estudando biópsias gástricas, observaram a presença de um pequeno bacilo recurvado e em forma de “S” que, inicialmente, associaram à gastrite crônica ativa. No começo, a bactéria foi classificada no gênero *Campylobacter*, recebendo o nome de *Campylobacter pyloridis* e, posteriormente *Campylobacter pylori*<sup>2,3</sup>. A partir de 1989 foi reclassificada em um novo gênero, o *Helicobacter*, sendo denominada *Helicobacter pylori*<sup>4,5,6,7</sup>.

A infecção pelo HP é uma das mais prevalentes na espécie humana, atingindo cerca de 50% da população mundial<sup>8</sup>. Além da UP, o HP é reconhecido como o fator etiopatogênico mais importante da gastrite tipo B e do linfoma MALT, e desde 1994 é classificado como carcinógeno Grupo-1 em seres humanos (evidência suficiente de carcinogenicidade) pela “*World Health Organization*” (WHO) e pela “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC)<sup>9,10</sup>. A maioria dos indivíduos colonizados apresenta apenas gastrite assintomática, porém 10 a 20% podem desenvolver UP (gástrica e duodenal) e, aproximadamente 1% a 2%, câncer gástrico (CG)<sup>8</sup>.

O HP apresenta tropismo pelo estômago (principalmente antro e corpo) e duodeno, onde se fixa à mucosa, localizando-se logo abaixo da camada de muco, na



intimidade do epitélio gástrico. Para colonizar essas regiões, ele produz uma enzima, a urease, que hidroliza a uréia da mucosa em amônia e dióxido de carbono, criando um meio adequado e constante, com pH em torno de 6,0 a 8,0<sup>11</sup>. A afinidade seletiva pelo epitélio gástrico faz com que a bactéria se adira a ele através de pontes que se formam entre as estruturas polissacarídeas das microvilosidades e as estruturas polissacarídeas de seu glicocálix. Apesar de possuir flagelos que permitem sua movimentação, cerca de 8% dessas bactérias se fixam à parede gástrica. Após a adesão, a bactéria provoca uma série de desordens histológicas e hormonais, que se iniciam com inflamação, podendo progredir para atrofia, metaplasia, displasia e neoplasia<sup>12,13</sup>. Diversas alterações gástricas são observadas nos organismos infectados pelo HP, sendo a inflamação a resposta histopatológica mais importante, além de mudanças nos níveis sérico e tecidual de gastrina e diminuição da somatostatina nos tecidos<sup>14,15,16</sup>. Fatores liberados pelo HP na mucosa gástrica, como a urease e as proteínas *CagA*, induzem à secreção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a migração de células mononucleares para a mucosa e a formação de agregados linfóides nas infecções crônicas. Há ainda alteração na renovação do epitélio, caracterizado por aumento do crescimento celular e da apoptose<sup>12</sup>.

As alterações nos hormônios gástricos parecem estar intimamente relacionadas a distúrbios motores em organismos infectados, tendo sido observadas em estudos clínicos e experimentais<sup>17,18</sup>. O mecanismo que causa aumento na resposta motora à refeição no organismo infectado não está claro, mas experimentos mostraram que o tecido gástrico isolado responde anormalmente aos estímulos agonistas da acetilcolina com aumento significativo da secreção de gastrina *in vitro*. Alguns trabalhos demonstraram que a infecção gástrica pelo HP está associada a aumento da gastrina sérica pós-prandial e redução nos níveis de somatostatina antral, o que, na presença do estímulo da acetilcolina, pode promover alterações na secreção ácida e função motora, e explica, em parte, a ocorrência de disfunção motora no organismo infectado com a bactéria espiralada<sup>17</sup>.

A relação entre os hormônios gástricos gastrina e somatostatina e a motilidade gastrointestinal é bem conhecida. A gastrina tem efeito agonista sobre a motilidade do músculo liso, enquanto a somatostatina possui efeito contrário. Portanto, nos casos de infecção gástrica pelo HP, o efeito esperado é o aumento da motilidade gastrointestinal.

No entanto, os resultados referentes à função motora na infecção pela bactéria, principalmente na dispepsia funcional, são controversos<sup>17</sup>.

O determinante principal da virulência do HP é uma ilha de patogenicidade chamada *Cag*. Diversos estudos têm demonstrado estreita relação entre cepas *Cag* positivas e o desenvolvimento de doença ulcerosa péptica (DUP) e CG. Genes na ilha de patogenicidade *Cag* codificam um sistema de secreção através do qual uma proteína efetora, *CagA*, é translocada para o citoplasma da célula hospedeira. Uma vez dentro da célula hospedeira, a *CagA* pode interromper as vias de sinalização, por meio de fosforilação dependente e outros mecanismos independentes, levando a alterações na proliferação celular, na motilidade e no citoesqueleto das células epiteliais gástricas. A *CagA* é fosforilada por ação de quinases *Src* na região C-terminal em tirosina contendo a seqüência de aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA), cuja diversidade estrutural resulta em duas espécies principais: *Western* e *East Asian CagA*<sup>19</sup>.

Quatro tipos de segmentos EPIYA são descritos: A, B, C e D. Cepas *Western* geralmente apresentam padrão ABC e cepas *East Asian* padrão ABD. Segmentos A, B e D estão ocasionalmente ausentes ou repetidos. Em contrapartida, segmentos C estão muitas vezes duplicados e cepas *Western* com padrões ABCC e ABCCC são relativamente comuns. O maior número de segmentos EPIYA-C aumenta a magnitude da fosforilação da *CagA*, tornando mais profundos seus efeitos na célula, o que tem sido sugerido como fator de elevação do risco para o CG<sup>19</sup>.

Baseado nesses resultados, julga-se pertinente supor que pacientes infectados com HP poderiam ter resposta motora diferenciada em caso de infecção por cepas de HP com diferentes padrões de patogenicidade, oriundas de pacientes com CG, DUP ou gastrite.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar o padrão de esvaziamento gástrico e a gastrinemia sérica de gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) infectados por cepas de HP com diferentes padrões de patogenicidade.

### **3 RELEVÂNCIA**

O conhecimento do comportamento patogênico das diferentes cepas de HP poderia vir a ser útil no estabelecimento de protocolos de tratamento de pacientes não apenas com DUP, mas também aqueles com sintomas dispépticos sem outra etiologia definida.

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 ÉTICA

O experimento foi realizado de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, criados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) em 1991 e com a Lei Federal nº. 6.638, de 08 de maio de 1979. Além disso, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sendo protocolado sob o nº 27/2009 (Anexo 1).

### 4.2 ANIMAIS UTILIZADOS E CUIDADOS DISPENSADOS

Foram utilizados 56 gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), fêmeas, com quatro meses de idade e peso médio de 80,0 g, adquiridos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina (FM) da UFMG, acondicionados em gaiolas coletivas com capacidade para oito animais cada, em ambiente sanitizado, com ventilação natural e exaustão mecânica, submetidos a ciclos naturais dia e noite, com livre acesso a água filtrada e ração padrão para roedores (Labina<sup>®</sup>, Purina<sup>®</sup>, Brasil), exceto nos períodos de inoculação da bactéria e realização das cintilografias de esvaziamento gástrico.

### 4.3 DESENHO DA PESQUISA

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais:

Grupo A (n=8) Controle - animais sem intervenção, mantidos em observação durante 180 dias;

Grupo B (n=16) - animais infectados com cepa de HP padrão *CagA* negativo, sendo oito animais (B1) avaliados aos 45 dias de infecção e os oito restantes (B2) aos 180 dias de infecção;

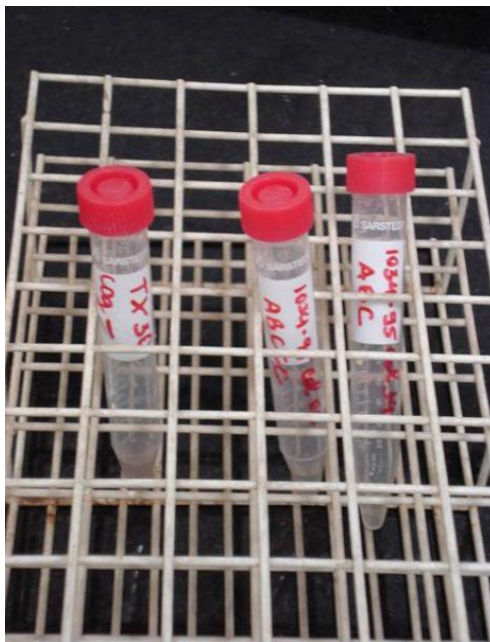
Grupo C (n=16) - animais infectados com cepa de HP com loci com 1 epyia, sendo oito animais (C1) avaliados aos 45 dias de infecção e os oito restantes (C2) aos 180 dias de infecção;

Grupo D (n=16) - animais infectados com cepa de HP *CagA* positiva e com loci com 3 epyias, sendo oito animais avaliados aos 45 dias de infecção (D1) e os oito restantes aos 180 dias de infecção (D2).

#### **4.4 OBTENÇÃO DOS INÓCULOS**

Foram obtidas amostras de HP oriundas de banco de amostras pertencentes ao Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da UFMG. A identificação da cepa bacteriana foi feita por “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR), sendo selecionadas duas amostras, uma contendo 1 epyia e outra contendo 3 epyias. As amostras foram semeadas em placas de vidro para cultura de microorganismos contendo *Belo Horizonte medium* (BHM). Essas placas foram separadas em grupos de 15 e colocadas em jarras hermeticamente fechadas em condições de microaerofilia, obtidas com o uso de Anaerocult C<sup>®</sup> (Merck<sup>®</sup>, Alemanha), e mantidas em estufa a 37,5°C por 72 horas. Após esse período, as placas foram abertas em capela de fluxo laminar e observado o crescimento bacteriano. As colônias de HP obtidas foram repicadas em BHM e novamente incubadas em microaerofilia durante 72 horas. Esse processo foi repetido até se obter material suficiente para inocular todos os animais com a mesma amostra. Ao final, o inóculo bacteriano foi conservado em caldo Brucella e levado ao espectrofotômetro para verificação da concentração bacteriana. Em seguida, o caldo de cultura bacteriana foi dividido em alíquotas de 2,0mL, armazenado em tubos de Eppendorf e congelado a -20°C até a época da inoculação nos animais. (Fig. 1)

**Fig. 1:** Inóculo de *Helicobacter pylori* em caldo Brucella.



#### 4.5 INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS

À época da inoculação, os Eppendorf's contendo o caldo bacteriano foram descongelados à temperatura ambiente e o caldo inoculado no estômago dos animais através de agulha metálica acoplada a uma seringa, própria para administração de medicação oral para roedores de pequeno porte. Esta agulha metálica apresenta um dispositivo em forma de esfera na sua extremidade, para não perfurar o esôfago e o estômago do animal (Fig. 2a). A agulha é introduzida através de gavagem oro-esôfago-gástrica e o inóculo injetado diretamente no estômago (Fig. 2b).

**Figura 2:** Agulha (a) para inoculação de suspensão bacteriana no estômago de gerbis (b).



Previamente à inoculação do HP, os animais foram mantidos em jejum de oito horas. Em seguida, foi feita introdução do inóculo através de gavagem gástrica após sedação dos animais com quetamina (5 mg/kg). Em cada inoculação foram administrados 0,2 mL de caldo bacteriano, na concentração de  $10^9$  UFC/mL. Quatro horas após a inoculação, os animais receberam ração padrão para ratos (Labina<sup>®</sup>, Purina, Brasil) e água *ad libitum*.

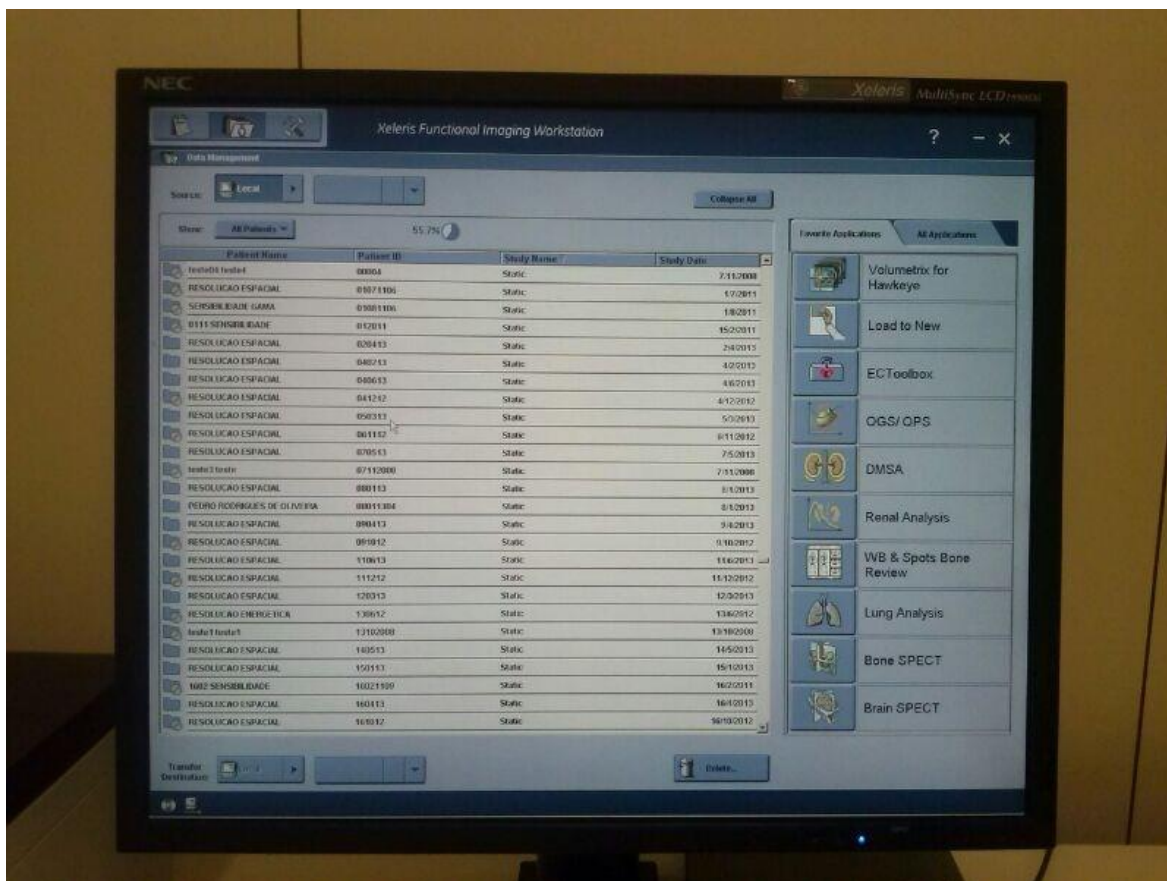
#### 4.6 ESVAZIAMENTO GÁSTRICO

O esvaziamento gástrico foi determinado por meio de estudo cintilográfico realizado em gama-câmara Ventri<sup>®</sup> (GE-Healthcare Medical Systems<sup>®</sup>, Milwaukee, EUA), com duplo detector retangular e colimadores de baixa energia e alta resolução, tendo sido adquiridas imagens estáticas planas com *zoom* de 1,5, matriz 64x64, fotopico de 140 KeV e janela de  $\pm 20\%$ , após administração de solução nutriente contendo leite e 7,4 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -Fitato.

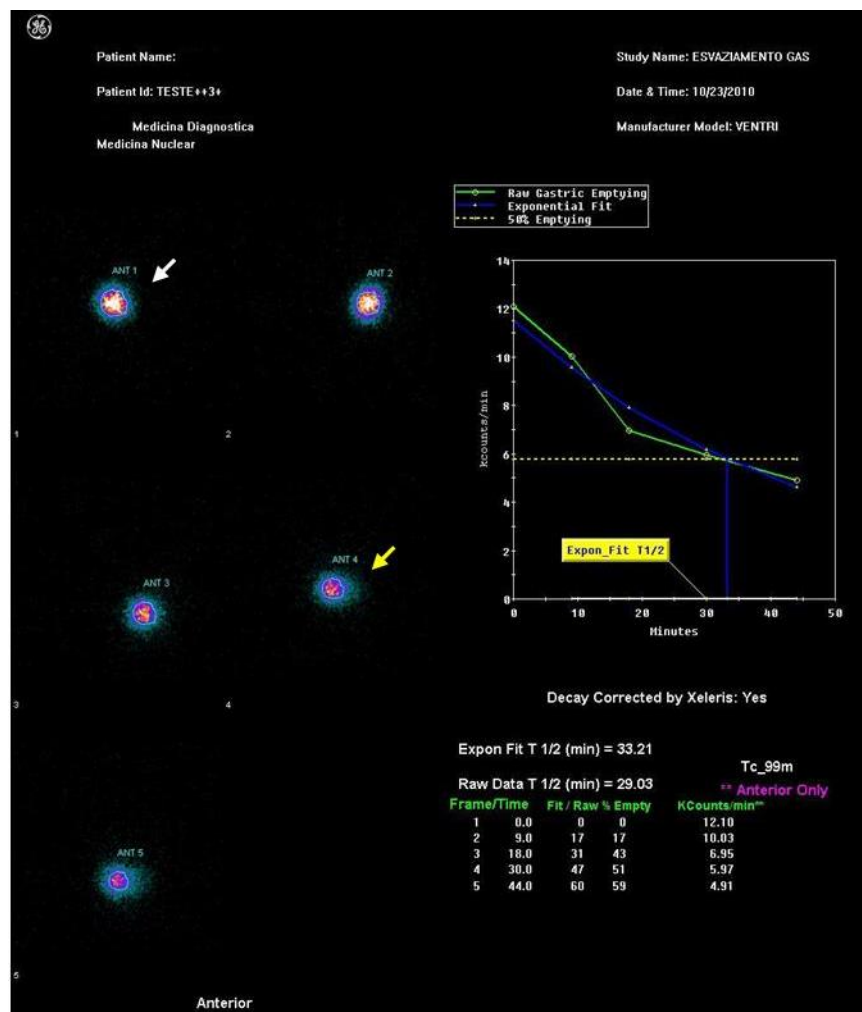


Na noite anterior ao estudo do esvaziamento gástrico, os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso a solução de glicose a 25% e mantido período de jejum para sólidos de oito horas. No momento do estudo de esvaziamento gástrico, os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) associada a xilazina (10 mg/kg) aplicadas por via intraperitoneal. Após a anestesia, foi feita gavagem oro-esôfago-gástrica com catéter de nelaton nº 04, posicionando-se o animal em decúbito ventral sobre colimador para propósitos gerais acoplado à gama-câmara e infundido, através do catéter gástrico, 0,1mL de solução protéica (leite) com o radiofármaco, seguida da lavagem do catéter com 0,2mL de solução protéica sem o radiofármaco. Foram adquiridas imagens, com duração de vinte segundos, imediatamente após este procedimento e nos tempos de 20, 40 e 60 min depois da administração do radiotraçador. As imagens foram então transmitidas a uma estação de processamento Xeleris® (GE-Healthcare Medical Systems®, Milwaukee, EUA) (Fig. 3).

**Figura 3:** Estação de processamento Xeleris® (GE-Healthcare Medical Systems®, Milwaukee, EUA).



**Figura 4:** Imagens obtidas imediatamente após a administração do radiofármaco (seta branca) e após 20, 40 e 60 minutos (seta amarela) da administração do radiotraçador.



Para o cálculo do índice de esvaziamento gástrico, foram consideradas as contagens no estômago entre a imagem inicial e a imagem aos 60 min. Considerou-se como 100% a contagem na imagem inicial e, por cálculo proporcional, obteve-se o percentual de solução que deixou o estômago, sendo o índice de esvaziamento gástrico determinado através da fórmula :

$$EG = \frac{100 \times (CRI - CRF)}{CRI}$$

Onde:

EG = esvaziamento gástrico

CRF = contagem radioativa final,

CRI = contagem radioativa inicial.

#### **4.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO GÁSTRICO**

Após a determinação do esvaziamento gástrico, os animais foram mortos por superdosagem anestésica (quetamina 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg por via intraperitoneal) e o abdome aberto através de incisão xifopúbica na linha alba. O estômago de cada animal foi ressecado, aberto ao longo da curvatura maior, lavado em solução salina e colhidas duas amostras do antro gástrico, sendo uma armazenada em frasco contendo formalina a 10%, para avaliação histológica, e outra conservada em congelador a -80°C para detecção da presença da bactéria por meio de PCR.

#### **4.8 – IDENTIFICAÇÃO DO *Helicobacter pylori* NO TECIDO GÁSTRICO**

A identificação do microorganismo no antro gástrico foi realizada por meio da PCR em espécime do antro gástrico. O DNA das amostras foi extraído usando o “kit” QIAamp<sup>®</sup> (QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Para controle da extração utilizou-se água destilada. Os sedimentos foram colocados em tubos de microcentrifuga contendo 180 µL do tampão ATL e 20 µL de proteinase K, homogeneizados em vórtex, e incubados a 56°C por 18 horas. A cada amostra foram acrescentados 200 µL de tampão AL e os tubos foram incubados a 70°C por 10 min. A seguir, 200 µL de etanol (96-100%) foram adicionados a cada tubo e essa mistura foi transferida para a coluna de giro do “kit”, que foi centrifugada a 6.000 giros/min. Cada coluna foi colocada dentro de um tubo coletor de 2 mL. O material da coluna foi lavado duas vezes (250 µL cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas vezes com o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) do “kit”. Depois da última lavagem, cada coluna foi inserida no interior de um tubo de microcentrifuga e o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado. O DNA foi eluído em 100 µL de água deionizada estéril e sua

concentração determinada por espectrofotometria. O DNA extraído foi estocado a -20°C até o uso.

Para a amplificação do gene *ureA* foram usados os iniciadores e as condições descritas previamente por Clayton *et al.*<sup>20</sup>. O gene DNAr 16S do gênero *Helicobacter* foi amplificado usando os iniciadores C97 e C98 descritos por Fox *et al.*<sup>21</sup>. Os iniciadores usados e as condições de reação estão descritas no quadro 1. Os produtos amplificados foram identificados por eletroforeses em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo e examinado em luz ultravioleta. Foram consideradas positivas amostras em que se identificou a presença do DNA do HP.

**QUADRO 1 – CONDIÇÕES DO MÉTODO DE PCR**

<b>Gene alvo</b>	<b>Nome do “Primer” e sua seqüência</b>	<b>Condições de realização</b>	<b>Bases*</b>
<i>DNAr 16S</i>	C97: 5´ - CGT ATG ACG GGT ATC C - 3´  C98: 5´ - GAT TTT ACC CCT ACA CCA - 3´	95°C-5 min.; 34 ciclos (94°C-1 min., 55°C-2 min. e 72°C-3 min.) e 72°C-5 min.	400

\* Base: Unidade de comprimento para fragmentos do DNA que é igual a 1 seqüência de nucleotídeos

#### **4.9 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO TECIDO GÁSTRICO**

As lâminas do antro gástrico foram avaliadas por um único examinador, que desconhecia a qual grupo pertencia cada amostra. Foi feita avaliação do grau de inflamação pelo sistema de *Sidney*, classificando o infiltrado em ausente, leve, moderado e acentuado. Os resultados ausente ou leve foram agrupados como inflamação ausente, e os resultados moderado e acentuado como inflamação presente. Os dados foram comparados entre os grupos e consideradas diferenças para  $p < 0,05$ .

#### **4.10 DOSAGEM DA GASTRINA SÉRICA**

Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cava após a morte do animal e o soro obtido após centrifugação a 3000 rotações/min durante 20 min. O soro obtido foi armazenado em frascos de Eppendorf e levados a congelador a -20°C onde ficaram armazenadas até sua posterior utilização nos ensaios. A gastrina sérica foi dosada por técnica imunoenzimática (ELISA) empregando-se kit da ABCAM<sup>®</sup> do mesmo lote para todas as amostras.

O kit de gastrina é um imunoenensaio competitivo para determinação quantitativa do hormônio nas amostras. Ele utiliza um anticorpo policlonal de gastrina para ligar, de maneira competitiva, a gastrina, ou uma molécula de fosfatase alcalina que possua gastrina covalentemente ligada, na amostra. Após incubação simultânea à temperatura ambiente, os reagentes em excesso são removidos por lavagem e o substrato é adicionado. Depois de um curto período de incubação, a reação enzimática é interrompida e a cor amarela resultante analisada em leitor de microplacas a 405 nm. A intensidade da cor amarela vinculada é inversamente proporcional à concentração de gastrina nas amostras. A densidade óptica medida é usada para calcular a concentração de gastrina.

#### **4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados qualitativos foram comparados entre os grupos por meio do teste do qui-quadrado, considerando-se significativos valores de  $p < 0,05$ . O índice de esvaziamento gástrico e a dosagem da gastrina sérica foram analisados através do teste t de Student não pareado, tendo sido comparados os diferentes grupos no mesmo período de evolução e os diferentes tempos de evolução dentro do mesmo grupo. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . Para tanto, foi utilizado o software SPSS v.17<sup>®</sup>.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 POSITIVIDADE DA INFECÇÃO

O estudo da biologia molecular para identificação do HP, realizado por meio da PCR, foi positivo em todos os fragmentos do antro dos animais infectados (grupos B, C e D). Naqueles animais não infectados (grupo A), a PCR das biopsias de antro foram negativas.

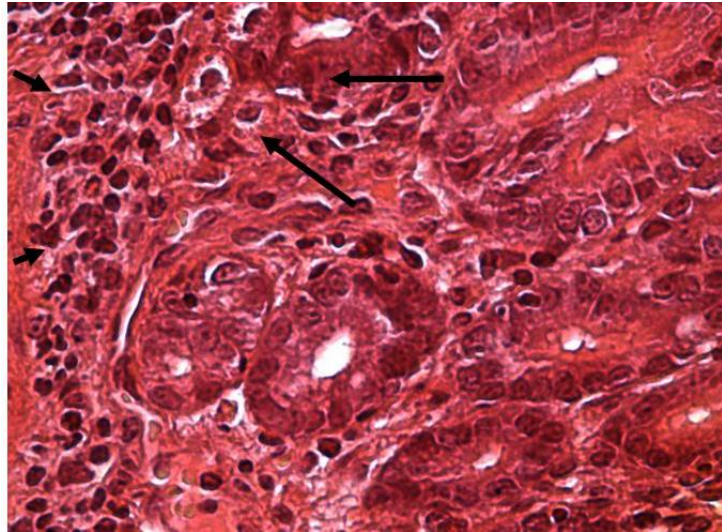
### 5.2 ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

A inflamação do antro, classificada como moderada a acentuada (Fig. 5), foi vista em 2 animais do grupo controle. No grupo de animais infectados com 45 dias de evolução, a inflamação no antro foi observada em 1 animal do grupo CagA negativo (B1), 2 animais do grupo infectado com cepa 1 epyia (C1) e 4 animais infectados com cepa 3 epyias (D1). Houve tendência a maior resposta inflamatória no grupo infectado com 3 epyias quando comparado ao grupo CagA negativo ( $p=0,07$ ), mas nenhum dos três grupos infectados mostrou diferença quando comparados aos animais do grupo controle (Gráfico 1).

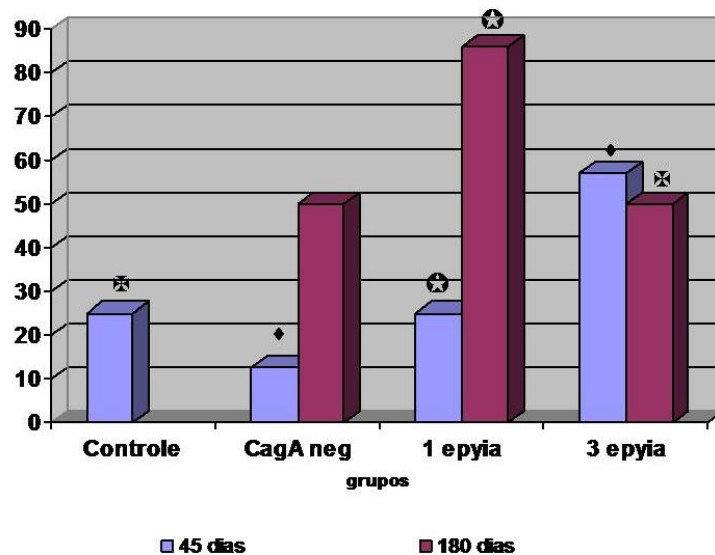
Nos animais após 180 dias de infecção, a inflamação moderada a acentuada ocorreu em 4 animais do grupo CagA negativo (B2), 6 animais do grupo infectado com cepa 1 epyia (C2) e 3 animais do grupo infectado com cepa 3 epyias (D2). Houve maior resposta inflamatória nos animais infectados quando comparado aos animais do grupo controle.

Quando comparados os animais infectados após 45 ou 180 dias de infecção, observou-se que a inflamação progrediu de forma mais acentuada no grupo de animais infectados com cepa 1 epyia ( $p=0,02$ ), o que não foi observado nos demais grupos (Gráfico 1).

**Figura 5:** Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (setas) em antro gástrico de gerbil infectado com *Helicobacter pylori*.



**Gráfico 1:** Percentual de amostras de antro gástrico de gerbis infectados com diferentes cepas de *Helicobacter pylori* com inflamação moderada a acentuada após 45 ou 180 dias de permanência da infecção.

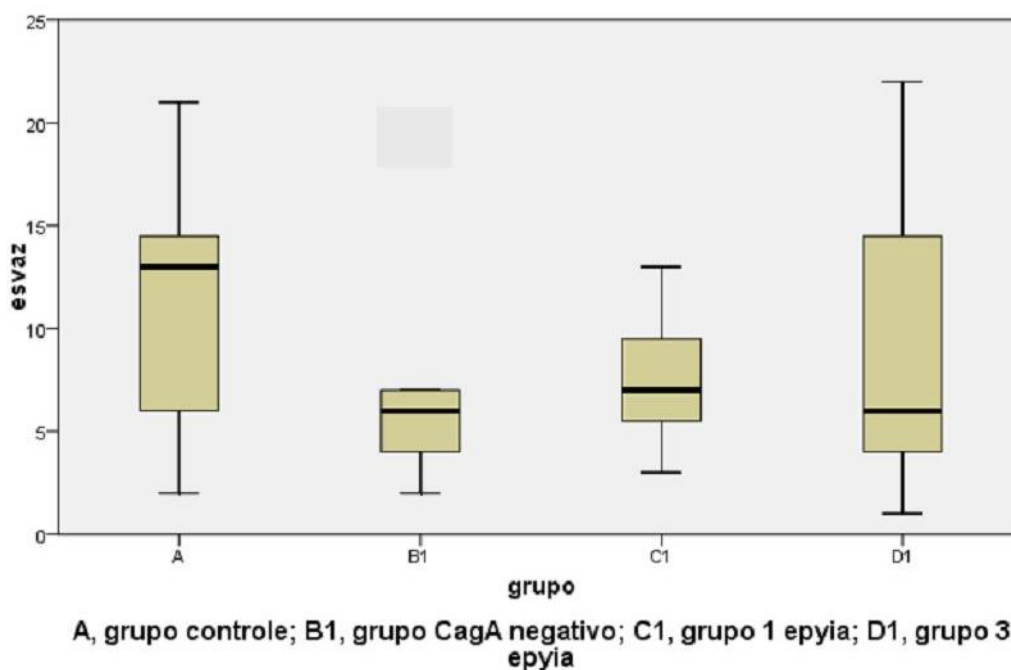


† p=0,07; ✖ p=0,03; ⚡ p=0,02

### 5.3 ÍNDICE DE ESVAZIAMENTO GÁSTRICO

A média do esvaziamento gástrico foi de  $11,0 \pm 6,8\%$  no grupo controle. Nos animais infectados durante 45 dias, a média de esvaziamento gástrico foi de  $7,8 \pm 7,0\%$  nos animais infectados com cepa CagA negativo,  $7,6 \pm 3,4\%$  no grupo onde foi feita inoculação da cepa com 1 epyia e  $9,4 \pm 7,7\%$  naqueles infectados com cepa com 3 epyias. Não houve diferença no índice de esvaziamento quando comparados os grupos infectados e o grupo controle, ou na comparação entre os grupos infectados com diferentes cepas da bactéria (Gráfico 2).

**Gráfico 2:** Média do percentual de esvaziamento gástrico de gerbis após 45 dias de infecção com diferentes cepas de *Helicobacter pylori* após 60 minutos da administração de refeição proteica.

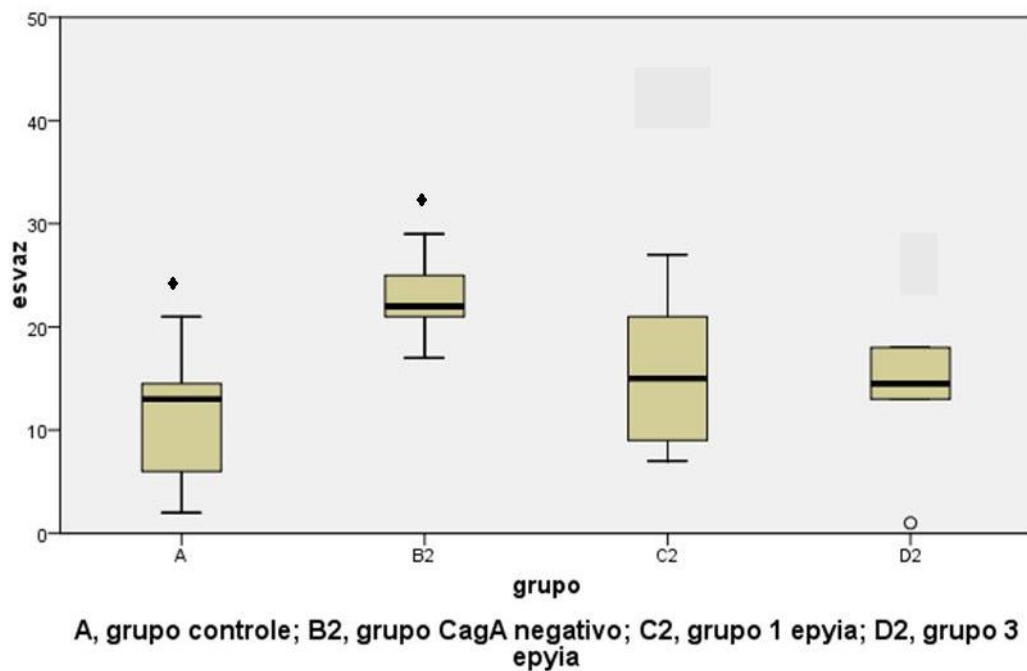


O esvaziamento gástrico nos animais após 180 dias de infecção foi de  $22,7 \pm 4,0\%$  nos animais infectados com cepa CagA negativo,  $17,9 \pm 12,9\%$  nos animais onde foi feita infecção com cepa com 1 epyia e  $14,5 \pm 8,1\%$  nos animais infectados com cepa de HP com 3 epyias. Houve diferença apenas na comparação entre os animais infectados com a



cepa CagA negativo e o grupo controle ( $p=0,004$ ), mas não entre os três grupos infectados (Gráfico 3).

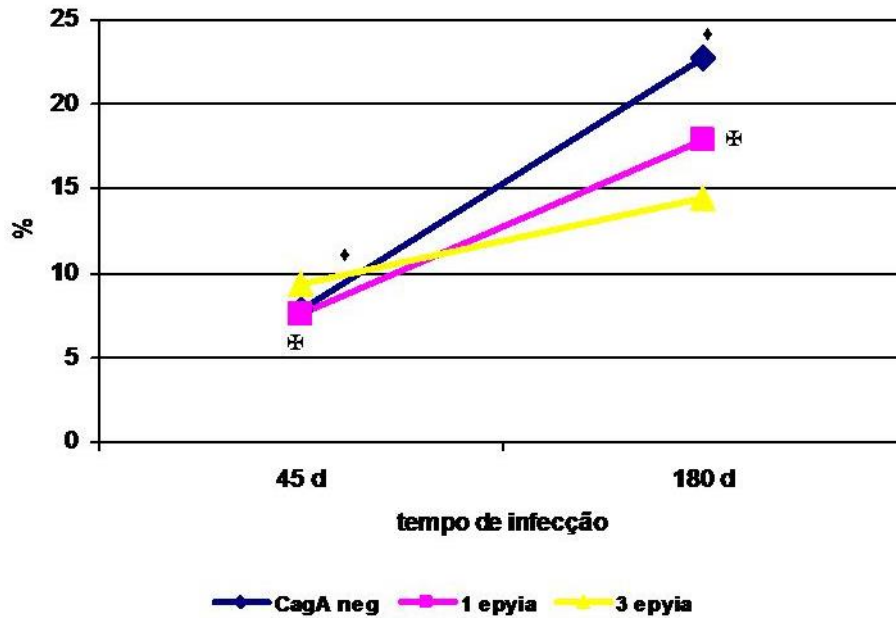
**Gráfico 3:** Média do percentual de esvaziamento gástrico de gerbis após 180 dias de infecção com diferentes cepas de *Helicobacter pylori* após 60 minutos da administração de refeição proteica.



♦  $p=0,004$

Quando comparados os dois períodos de infecção, houve aumento da velocidade de esvaziamento no grupo CagA negativo aos 180 dias quando comparado àqueles infectados durante 45 dias ( $p=0,02$ ), bem como tendência a diferença na comparação 45 versus 180 dias nos animais com 1 epyia ( $p=0,06$ ). Os grupos infectados com 3 epyias não mostraram diferença no esvaziamento quando comparados os grupos aos 45 e aos 180 dias (Gráfico 4).

**Gráfico 4:** Média de esvaziamento gástrico após 60 minutos de refeição proteica em gerbis infectados com diferentes cepas de *Helicobacter pylori*, aos 45 e 180 dias de infecção.



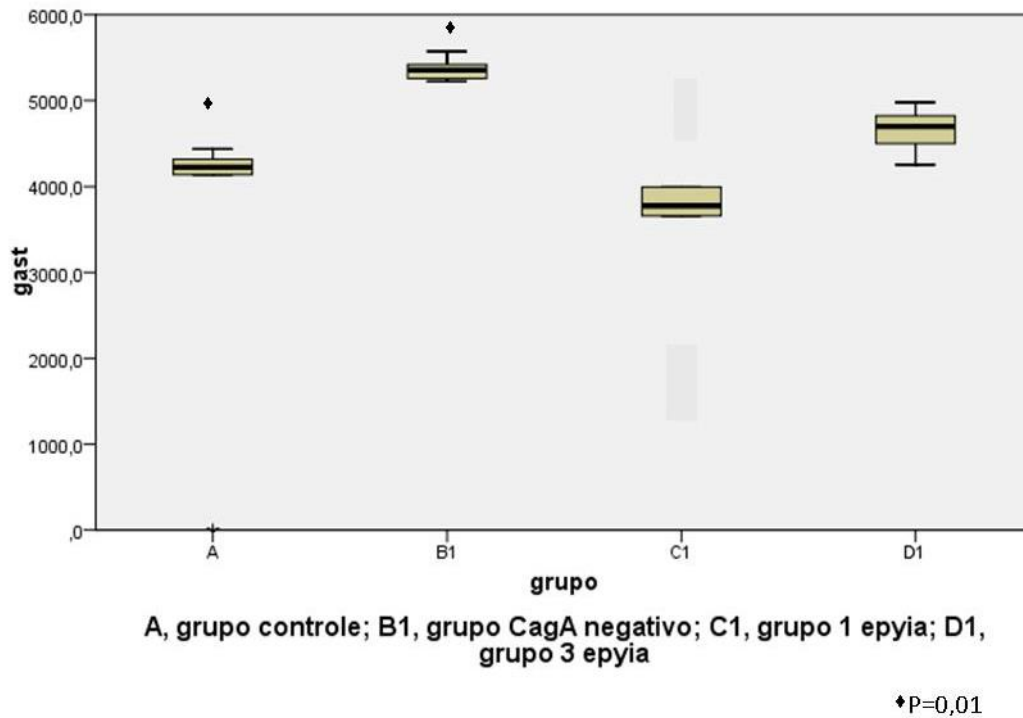
◆ p=0,02

⊠ p=0,06

#### 5.4 GASTRINEMIA

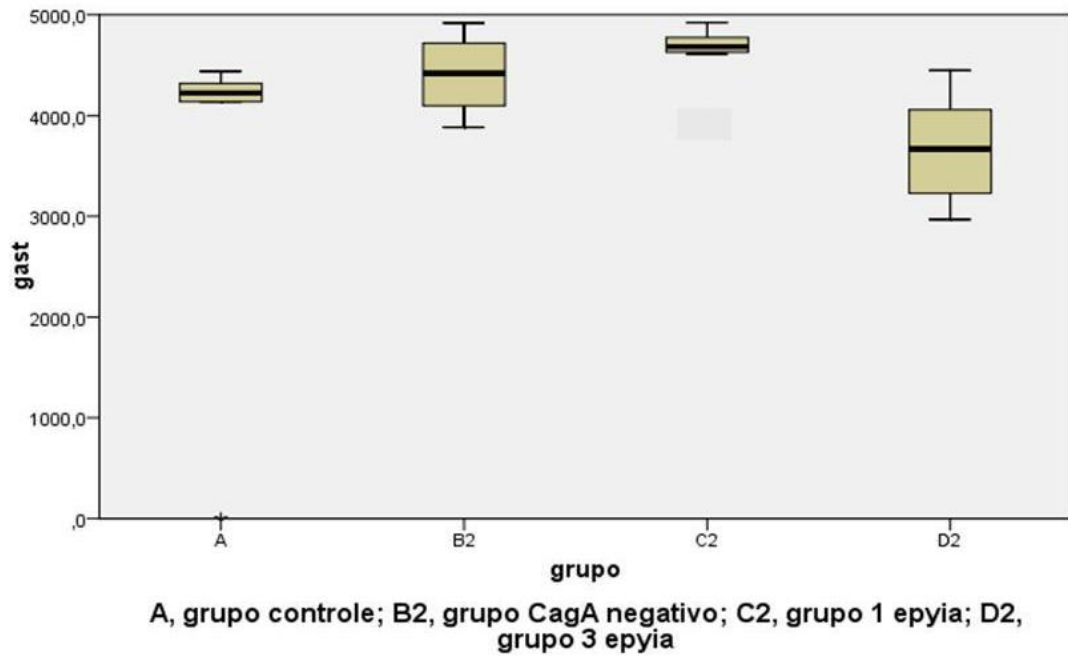
A gastrinemia no grupo controle foi de  $3557,1 \pm 1746,0$  pg/mL. No grupo de animais com 45 dias de infecção, o valor da gastrinemia foi de  $5358,5 \pm 116,3$  pg/mL nos animais infectados com amostras CagA negativo,  $3638,5 \pm 1052,4$  pg/mL no grupo inoculado com cepas com 1 epyia e  $4654,2 \pm 256,1$  pg/mL naqueles animais infectados com bactérias com 3 epyias. Houve diferença quando comparados os grupo controle e CagA negativo ( $p=0,01$ ), como pode ser visto no Gráfico 5.

**Gráfico 5:** Média da gastrinemia em gerbis infectados com diferentes cepas de *Helicobacter pylori* aos 45 dias de infecção.



Aos 180 dias de infecção, a gastrinemia foi de  $4407,8 \pm 398,5$  pg/mL nos animais CagA negativo,  $4631,4 \pm 295,7$  pg/mL nos animais colonizados por cepa de HP com 1 epyia e  $3665,6 \pm 547,9$  pg/mL naqueles animais onde foi feita inoculação da cepa da bactéria com 3 epyias. Não houve diferença na comparação entre os três grupos infectados aos 180 dias (Gráfico 6).

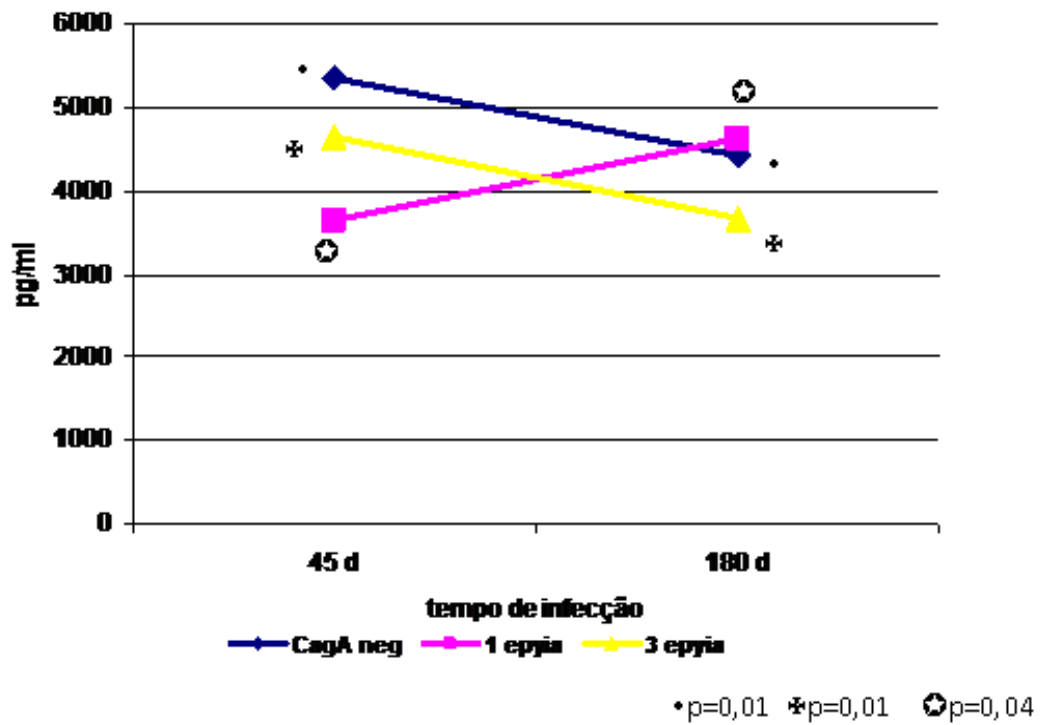
**Gráfico 6:** Média da gastrinemia em gerbis infectados com diferentes cepas de *Helicobacter pylori* aos 180 dias de infecção.



♦P=0,01

A comparação entre os grupos aos 45 e aos 180 dias mostrou que nos grupos CagA negativo e 3 epyias houve redução significativa da gastrinemia ( $p=0,001$  e  $p=0,001$ , respectivamente), enquanto nos animais inoculados com 1 epyia houve aumento significativo da concentração do hormônio ( $p=0,04$ ), como observado no Gráfico 7.

**Gráfico 7:** Média da gastrinemia em gerbis infectados com diferentes cepas de *Helicobacter pylori* aos 45 e 180 dias de infecção.



## 6 DISCUSSÃO

A infecção gástrica por bactérias espiraladas desencadeia alterações fisiopatológicas que estão associadas à maioria das doenças que acometem o trato gastrointestinal superior, como dispepsia, UP e CG. Porém, os substratos fisiológicos e histológicos desta relação ainda não estão totalmente elucidados, em parte devido a ausência de modelos experimentais adequados<sup>22</sup>.

O HP coloniza o epitélio gástrico, vivendo dentro da camada de muco em contato íntimo com a superfície epitelial à qual ele pode estar aderido, mas sem invadir a mucosa. Inicialmente, o microorganismo pode interagir com as células epiteliais superficiais, produzindo algum dano celular direto ou estimulando a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-8, derivados dessas mesmas células. Em um segundo momento, os produtos pró-inflamatórios podem atingir a mucosa, estimulando diretamente respostas imunes do hospedeiro e causando liberação de uma variedade de citocinas, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  e interleucinas 1 e 6. A superfície celular danificada produz alterações na permeabilidade da mucosa e maior exposição aos agentes lesivos à mesma. A aderência do microorganismo às células da mucosa gástrica é acompanhada de perda das microvilosidades, irregularidades nas bordas luminais e alteração nas trocas intracelulares, incluindo perda do citoplasma, edema e vacuolização. Outro fator importante no dano celular são as enzimas produzidas pela bactéria, sendo a urease a mais importante. Essa enzima produz amônia que, além de proteger o HP do ácido gástrico, tem graves efeitos tóxicos sobre a mucosa<sup>23,24</sup>.

Na tentativa de definir de forma clara as alterações da fisiologia gástrica envolvidas nos processos patológicos, estudos clínicos e experimentais são extensamente conduzidos, mas todos esbarram em dificuldades metodológicas, principalmente no desenvolvimento de modelos experimentais adequados para estudo das principais alterações gástricas na infecção por bactérias espiraladas. Os primatas infectados pelo HP constituem modelo experimental ideal para estudo da UP, pois a evolução da doença pode ser acompanhada por endoscopia e as respostas histopatológicas e hormonais são

semelhantes às observadas em seres humanos<sup>25</sup>. Entretanto, este modelo não pode ser amplamente utilizado devido ao alto custo, às restrições éticas e ao fato de que grande parte desses animais são também infectados naturalmente por outras espécies de *Helicobacter*<sup>12,26</sup>.

Os primeiros modelos experimentais bem sucedidos na infecção pelo HP foram porcos gnotobióticos, nos quais se identificaram vários fatores bacterianos responsáveis por sua virulência<sup>27,28</sup>. A maior limitação deste modelo, além do custo, é a impossibilidade de se avaliar a infecção crônica, já que os animais só podem ser mantidos em isolamento durante três meses<sup>29</sup>.

Animais como o furão, gatos e cães infectados naturalmente por outras espécies de *Helicobacter* (*H. mustelae*, *H. felis*) têm sido utilizados para o estudo de bactérias espiraladas<sup>29</sup>. A colonização da mucosa gástrica do furão pelo *H. mustelae* é similar àquela vista em seres humanos, entretanto, a despeito da gastrite crônica ocorrer nos animais infectados, o componente neutrofílico da resposta é baixo ou ausente<sup>12,29</sup>.

O camundongo seria outro modelo experimental conveniente para este tipo de estudo devido à economia, tamanho, resistência a mutações e à disponibilidade de numerosos reagentes imunológicos e bioquímicos encontrados comercialmente, além de apresentar similaridades do ponto de vista da fisiologia do aparelho digestório com seres humanos<sup>29</sup>. Entretanto, a dificuldade de infectar camundongos convencionais com amostras bacterianas isoladas de seres humanos restringe o uso desses roedores<sup>30</sup>. Assim, têm sido utilizadas outras espécies de *Helicobacter* na infecção desses animais para viabilizar os estudos de vários aspectos da infecção. Um modelo bastante utilizado é a infecção de ratos pelo *Helicobacter heilmannii* tipo 1 (Hh1), bactéria que infecta naturalmente suínos com úlcera gástrica. Nesse modelo murino, há boa correlação entre a infecção gástrica pelo Hh1 e achados histopatológicos de gastrite. Os animais infectados apresentam alterações hormonais e desenvolvem um infiltrado inflamatório de células mononucleares<sup>31</sup>, alguns neutrófilos e poucos eosinófilos, principalmente no terço inferior da mucosa antral e oxíntica, e a infecção permanece por um longo período<sup>32</sup>, semelhante ao que ocorre em seres humanos infectados pelo HP<sup>17,32</sup>. Entretanto, a dificuldade de

obtenção da bactéria pela recente adição de antibacterianos à ração dos suínos, associada à impossibilidade do seu cultivo *in vitro*, tem levado ao abandono do modelo<sup>12</sup>.

Outros pequenos roedores como o camundongo e o gerbil têm sido utilizados como modelo de infecção pelo HP. No caso do camundongo, a infecção é obtida através da inoculação via oral de cepas mutantes de HP (especialmente *Sidney strain* – SS1), desenvolvidas em laboratório<sup>33</sup>. Porém, o gerbil é atualmente o animal mais utilizado no estudo da interação microorganismo-hospedeiro e das respostas terapêuticas ao HP<sup>12</sup>.

Anatomicamente, o estômago do gerbil apresenta a divisão convencional do estômago de mamíferos: cárdia, fundo, corpo e antro<sup>34</sup>. É constituído por uma parte não-glandular, formada pelo cárdia, fundo e porção superior do corpo, de coloração opaca, que representa sua maior área, e uma parte glandular, formada pela porção inferior do corpo, antro e canal antro-pilórico, de coloração avermelhada. A parte não-glandular é formada por epitélio escamoso estratificado altamente queratinizado e a parte glandular por epitélio tubular simples. A divisão entre essas duas partes é bem delimitada pela muscular da mucosa, bastante desenvolvida neste ponto e constituída por musculatura lisa, que se estende circunferencialmente entre as curvaturas maior e menor. Na área glandular, a muscular da mucosa torna-se mais tênue. A túnica submucosa é constituída por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos; a muscular por uma camada circular interna espessa e uma camada longitudinal externa mais delgada, com células ganglionares entre elas, enquanto a túnica serosa é fina<sup>35</sup>. No estômago, as células G estão presentes exclusivamente no antro, principalmente no canal antro-pilórico, localizando-se predominantemente nos terços superior e médio do tecido glandular. São células grandes e poliédricas estendendo-se da lâmina basal até o lúmen das glândulas. As células D localizam-se no terço inferior do tecido glandular, geralmente cercadas por células indiferenciadas ou mucosas e células parietais, sendo inervadas por fibras vagais. De modo semelhante às células G, têm forma poliédrica e apresentam numerosos microfilamentos que se organizam em forma de trouxa<sup>12,34</sup>.

O uso do gerbil como modelo experimental é bastante útil no estudo da infecção pelo HP devido à similaridade anatômica do estômago deste animal com o do homem, além da semelhança das alterações da mucosa na vigência da infecção<sup>36,37</sup>.



Apresentam também pH gástrico similar ao de seres humanos, com valores basais médios em torno de 1,4<sup>38</sup>. Quando infectados pelo HP desenvolvem duodenite, metaplasia gástrica e úlceras duodenais, constituindo bom modelo animal para o estudo do agente etiológico, de acordo com os requisitos postulados por Koch<sup>39</sup>. Além disso, esse modelo tem despertado especial interesse devido à facilidade no desenvolvimento de neoplasia gástrica<sup>12</sup>. Outras vantagens dizem respeito à alta freqüência e estabilidade da infecção, à grande colonização pelo HP e ao longo período de infecção, o que possibilita o estudo da infecção crônica e a similaridade das alterações patológicas com aquelas vistas em seres humanos<sup>40</sup>. Porém, algumas diferenças podem ser notadas, como a hiperplasia dos folículos linfóides da camada submucosa e a gastrite cística profunda observadas em gerbis e ausentes em seres humanos<sup>41</sup>. Outro ponto polêmico neste modelo refere-se ao tempo de aparecimento das lesões histológicas. Estudos demonstram a presença de alterações histológicas na fase aguda precoce<sup>42</sup>, ou a partir do segundo mês<sup>36</sup> enquanto em outros, essas alterações são observadas somente na infecção crônica<sup>40</sup> ou mesmo na fase crônica tardia, após 32 semanas<sup>37</sup>. O tempo de aparecimento dessas alterações relaciona-se a múltiplos fatores como virulência, carga bacteriana, cepa, entre outros. A similaridade das alterações histopatológicas e hormonais com as observadas em seres humanos, associada a outros fatores como tamanho, facilidade de manejo, baixo custo de manutenção, têm tornado a infecção do gerbil pelo HP o modelo mais utilizado pelos pesquisadores no estudo da UP.

As alterações gástricas induzidas pela infecção são resultado da resposta inflamatória provocada pela bactéria e/ou seus produtos, e existem diferenças marcantes na resposta orgânica quando se estuda a infecção aguda ou crônica. De forma simplista, podem ser divididas em alterações da histologia gástrica, alterações da secreção gástrica e alterações da função motora gástrica.

A infecção pelo HP induz a uma inflamação gástrica caracterizada histologicamente por degeneração da superfície epitelial e infiltração da mucosa gástrica por células inflamatórias crônicas (linfócitos, plasmócitos e ocasionalmente eosinófilos), e um característico, mas variável, componente ativo constituído por neutrófilos<sup>12,23,24,43</sup>. Neste estudo, alterações histopatológicas típicas de inflamação crônica foram vistas principalmente em animais infectados por períodos mais prolongados, sendo mais

acentuada nas infecções por cepa com 3 epyias. Mas em todos os grupos infectados ficou clara a progressão da infecção com o passar do tempo, havendo maior incidência de infiltrado inflamatório moderado a acentuado nos animais com 180 dias de infecção pelas diferentes cepas de HP.

Alterações da função motora gástrica observadas na infecção pelo HP não são um consenso. Alguns autores investigaram a associação entre infecção e disfunção motora gástrica em pacientes com dispepsia funcional, mas os resultados permanecem controversos. Em modelos animais há poucos resultados que sugerem esvaziamento gástrico acelerado induzido por infecção gástrica pela bactéria espiralada<sup>17</sup>, mas sem relatos consistentes sobre estas alterações motoras ou o mecanismo preciso envolvido.

O trânsito gastrointestinal é induzido pela contração e relaxamento locais após a ingestão da refeição, com a participação das fibras vagais aferentes, através da acetilcolina e de outros neurotransmissores. As fibras de músculo liso são parte essencial do esvaziamento gástrico<sup>44,45</sup> e as possíveis alterações em unidades musculares não foram bem esclarecidas.

Os resultados obtidos neste experimento mostraram diferença na velocidade de esvaziamento gástrico dependente da cepa bacteriana e com comportamento diverso nos dois períodos avaliados. Enquanto na infecção aguda em nenhum dos grupos houve alteração do esvaziamento gástrico quando comparados ao grupo controle, no período tardio a cepa CagA negativo esteve mais relacionada com o esvaziamento gástrico acelerado. Observou-se também que na comparação entre infecção aguda e crônica, apenas a cepa com 3 epyias, que estaria mais relacionada com a carcinogênese gástrica, não induziu a aumento importante no esvaziamento gástrico, o que poderia sugerir que em fases mais avançadas, a hipomotilidade gástrica seria um fator associado à maior ocorrência de CG. Por outro lado, o aumento da velocidade de esvaziamento do estômago observado nas infecções por cepas CagA negativo e 1 epyia, que seriam mais prevalentes em pacientes com UP, pode corroborar a teoria do túnel gástrico, em que o esvaziamento de conteúdo ácido no duodeno seria um fator estimulador da metaplasia gástrica no duodeno e posterior colonização desse epitélio metaplásico pelo HP e conseqüente ulceração.

Hormônios gastrointestinais são mensageiros químicos com função endócrina, parácrina ou autócrina. Eles desempenham funções regulatórias sobre a secreção, o crescimento, a absorção, a digestão e a motilidade do trato digestório. Peptídeos de gastrina são sintetizados principalmente nas células G do muco antro-pilórico. O hormônio é liberado para a corrente sanguínea e regula a secreção de ácido gástrico, o crescimento da mucosa e atua sobre a função motora estimulando a motilidade gástrica<sup>46,47,48</sup>.

Alguns autores demonstraram que a infecção gástrica pelo HP está associada com o aumento da gastrina sérica pós-prandial e a redução da somatostatina antral<sup>14,15,16,49</sup>. Estas alterações hormonais, na presença de estimuladores da acetilcolina, são capazes de promover alterações na secreção ácida e na função motora, explicando, em parte, a ocorrência de disfunção motora em organismos infectados por bactérias espiraladas. Apesar dos achados de Borg *et al.* não evidenciarem correlação entre a gastrinemia sérica e alterações do esvaziamento gástrico em pacientes infectados pelo HP<sup>50</sup>, eles revelaram que os níveis de gastrina plasmática pós-prandial eram significativamente maiores em pacientes com dispepsia funcional e retardo no esvaziamento gástrico<sup>51</sup>.

Assumindo que a infecção por Hh1 é capaz de provocar esvaziamento gástrico acelerado em ratos, o mecanismo envolvido pode ser a alteração na liberação da gastrina devido à diminuição da liberação de somatostatina induzida pela infecção bacteriana.

Os resultados deste estudo mostraram que na infecção precoce há hipergastrinemia nos animais inoculados com a cepa CagA negativo, mas esse aumento da gastrina sérica não se associou a hipermotilidade. Já no período tardio, nenhum dos grupos apresentou diferença na gastrinemia quando comparados aos animais do grupo controle, apesar de que, naqueles infectados com cepas CagA negativo, o aumento do esvaziamento gástrico não acompanhou-se de hipergastrinemia. Ao contrário, o que se observou nesse grupo foi redução do hormônio quando comparados os períodos precoce e tardio da infecção. Já o grupo infectado com 3 epyias mostrou que, com a redução do esvaziamento gástrico, houve também redução da gastrinemia, enquanto no grupo infectado com cepa com 1 epyia o aumento do esvaziamento gástrico acompanhou-se de aumento também da secreção de gastrina.

Todos esses resultados obtidos são bastante novos, sem que existam dados na literatura que nos permitam discuti-los com profundidade. A possibilidade de diferentes cepas de HP induzirem a um comportamento motor e secretor diferenciado foi postulada devido à multiplicidade de respostas vistas em estudos clínicos, diferente do que se observou em estudos experimentais.

A maioria das pesquisas sobre esvaziamento gástrico em pacientes infectados pelo HP estão focadas na dispepsia funcional. Os resultados de Marzio *et al.*<sup>52</sup> não mostraram diferenças no esvaziamento gástrico em pacientes infectados, mas Minocha *et al.*<sup>53</sup> observaram que o período de trânsito oro-cecal foi diminuído em pacientes infectados. Outros autores não encontraram relação entre a infecção gástrica e alterações da motilidade gástrica *in vivo*<sup>54,55</sup>, mas, recentemente, foi demonstrado aumento do esvaziamento gástrico em pacientes infectados pelo HP<sup>18,56,57</sup>. No entanto, na maioria destes estudos, não houve padronização das cepas bacterianas ou do tempo de curso da infecção.

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a possibilidade de que cepas do HP CagA negativo promovam menos inflamação, mas alteração da motilidade e secreção de gastrina, com tendência para um padrão hipersecretor e com aumento da motilidade. Já as cepas com 1 epyia têm padrão semelhante, mas com tendência a maior inflamação do tecido, enquanto que as cepas com 3 epyias induziram a uma inflamação mais exuberante, mas com motilidade gástrica pouco afetada e menor resposta à secreção de gastrina. Esses diferentes perfis sinalizam a possibilidade de que as cepas com 1 epyia se relacionam mais com a formação de UP, enquanto as alterações nos organismos infectados com 3 epyias se relacionam mais com a oncogênese gástrica.

Esses resultados são iniciais e apontam para a necessidade de novos estudos que determinem o perfil patogênico das diferentes cepas de HP.

## **7 CONCLUSÃO**

Diferentes cepas de HP exibiram diferentes padrões na secreção de gastrina e esvaziamento gástrico, com cepas CagA negativo e 1 epyia mostrando perfil hipersecretor hormonal e de hipermotilidade, e cepas com 3 epyias com perfil de menor secreção de gastrina e hipomotilidade gástrica.

## REFERÊNCIAS

1. DeCross AJ, Marshall BJ. The role of *Helicobacter pylori* in acid-peptic disease. Am J Med Sci. 1993;306(6):381-92.
2. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli in gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1983;4(1):1273-5.
3. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984;16(1):1311-5.
4. Buckley MJM, O'Morain CA. *Helicobacter* biology – discovery. Br Med Bull. 1998;54(1):7-16.
5. Dooley CP, Cohen H. The clinical significance of *Campylobacter pylori*. An Int Med. 1988;108(1):70-9.
6. Holck S, Ingeholm P, Blom J, Norgaard A, Elsborg L, Adamsen S *et al*. The histopathology of human gastric mucosa inhabited by *Helicobacter heilmannii*-like (*Gastrospirillum hominis*) organisms, including the first culturable case. APMIS. 1997;105(10):746-56.
7. Owen RJ. *Helicobacter* – species classification and identification. Br Med Bull. 1998;54(1):17-30.
8. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. World J Gastroenterol. 2006;12(35):5599-605.
9. Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Takeda H. Review article: Long-term *Helicobacter pylori* infection - from gastritis to gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 1998;12(1):9-15.
10. International Agency for Research on Cancer (IARC). Infection with *Helicobacter pylori*. In: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:177-240.
11. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006;21(12):2979-90.

12. Barbuto RC. Gastrinemia e densidade das células G e D no estômago de gerbis infectados com *Helicobacter pylori* submetidos a vagotomia com piloroplastia [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina; 2008.
13. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest.* 2007;117(1):60-9.
14. Odum L, Petersen HD, Andersen IB, Hansen BF, Rehfeld JF. Gastrin and somatostatin in *Helicobacter pylori* infected antral mucosa. *Gut.* 1994;35:615-8.
15. Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA, Moura SB, Resende LM, Barbosa AJA *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* eradication on antral gastrin- and somatostatin-immunoreactive cell density and gastrin and somatostatin content. *Scand J Gastroenterol.* 1993;28:858-64.
16. Queiroz DMM, Moura SB, Mendes EN, Rocha GA, Barbosa AJA, Carvalho AST. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on G-cell and D-cell density in children. *Lancet.* 1994;343:1191-3.
17. Duval-Araujo I, Queiroz DMM, Magnano AG, Simal CJ, Marino VS, Carvalho SD *et al.* Increased gastric emptying induced by *Helicobacter heilmannii* type 1 infection in rats. *J Med Microbiol.* 2000;49: 627-34.
18. Symonds EL, Tran CD, Butler RN, Omari TI. Gastric Emptying is Altered with the Presence of Gastritis. *Dig Dis Sci.* 2008;53:636-41.
19. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL *et al.* Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* Gene Polymorphisms. *Gastroenterology.* 2008;135:91-9.
20. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(1):192-200.
21. Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ *et al.* Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology.* 1998;114(4):755-63.

22. Barbuto RC, Duval-Araujo I, Queiroz DMM, Lima CD, Okawa AE, Simal CJR. Alterações do esvaziamento gástrico e da gastrinemia induzidas pela vagotomia associada à piloroplastia em ratas infectadas ou não pelo *Helicobacter heilmannii* tipo 1 [dissertação]. Belo Horizonte: UFMG; 2008.
23. Blaser MJ. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* induced inflammation. *Gastroenterology*. 1992; 102(2): 720-7.
24. Bodger K, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull*. 1998;54(1):139-50.
25. Dubois A, Fiala N, Heman-Ackah LM, Drazek ES, Tarnawski A, Fishbein WN *et al*. Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. *Gastroenterology*. 1994;106(6):1405-17.
26. Drazek ES, Dubois A, Holmes RK. Characterization and presumptive identification of *Helicobacter pylori* isolates from rhesus monkeys. *J Clin Microbiol*. 1994;32(7):1799-804.
27. Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG, Leunk RD. Establishment of *Campylobacter pylori* infection in neonatal gnotobiotic piglet. *Infect Immun*. 1987;55(11):2789-96.
28. Lambert JR, Borromeo M, Pinkard KJ, Turner H, Chapman CB, Smith ML. Colonization of gnotobiotic piglets with *Campylobacter pyloridis* – an animal model? *J Infect Dis*. 1987;155(6):1344.
29. Lee A. Animals models for host-pathogen interaction studies. *Br Med Bull*. 1998;54(1):163-73.
30. Cantorna MT, Balish E. Inability of human clinical strains of to colonize the alimentary tract of germ-free rodents. *Can J Microbiol*. 1990;36(4):237-41.
31. Mendes EN, Queiroz DMM, Coimbra RS, Moura SB, Barbosa AJA, Rocha GA. Experimental infection of Wistar rats with '*Gastrospirillum suis*'. *J Med Microbiol*. 1996;44:105-8.
32. Moura SB, Queiroz DMM, Mendes EN, Nogueira AMMF, Rocha GA. The inflammatory response of the gastric mucosa of mice experimentally infected with '*Gastrospirillum suis*'. *J Med Microbiol*. 1993;39(1):64-8.



33. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology*. 1997; 112(4):1386-97. Errata in: *Gastroenterology*. 1997;113(2):732.
34. Kapur SP. An ultrastructural and cytochemical study of enteroendocrine cells of the pyloric antrum in the gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Acta Anat*. 1982;112(3):220-32.
35. Ghoshal NG, Bal HS. Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Lab Anim*. 1989;23(1):21-9.
36. Nakagawa S, Osaki T, Fujioka Y, Yamaguchi H, Kamiya S. Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori*: microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(2):347-53.
37. Wirth HP, Beins MH, Yang M, Tham KT, Blaser M.J. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun*. 1998;66(10):4856-66.
38. Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Oh J, Sachs G. Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(17):7235-40.
39. Ohkusa T, Okayasu I, Miwa H, Ohtaka K, Endo S, Sato N. *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut*. 2003;52(6):797-803.
40. Yan J, Luo YH, Mao YF. Establishment of *Helicobacter pylori* infection model in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol*. 2004;10(6):852-5.
41. Kodama M, Murakami K, Sato R, Okimoto T, Nishizono A, Fujioka T. *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2005;11(45):7063-71.
42. Suzuki H, Masaoka T, Nomura S, Hoshino Y, Kurabayashi K, Minegishi Y *et al*. Current consensus on the diagnosis and treatment of H. pylori-associated gastroduodenal disease. *Keio J Med*. 2003;52(3):163-73.

43. Blaser MJ. Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. *Gastroenterology*. 1987;93:371-83.
44. Danzer M, Jovic M, Samberger C, Painsipp E, Bock E, Pabst MA *et al*. Stomach-brain communication by vagal afferents in response to luminal acid backdiffusion, gastrin, and acid secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G403-11.
45. Jarrousse C, Lods N, Michel F, Bali JP, Magous R. Cultured gastrointestinal smooth muscle cells: cell response to contractile agonists depends on their phenotypic state. *Cell Tissue Res*. 2004;316:221-32.
46. Evers BM. Gastrointestinal growth factors and neoplasia. *Am J Surg*. 2005; 190:279-84.
47. Rehfeld JF, Friss-Hansen L, Goetze JP, Hansen TV. The biology of cholecystokinin and gastric peptides. *Curr Top Med Chem*. 2007;7:1154-65.
48. Watson SA, Grabowska AM, El-Zaatari M, Takhar A. Gastrin – active participant or bystander in gastric carcinogenesis? *Nat Rev Cancer*. 2006;6:936-46.
49. Dominguez-Muñoz JE, Malfertheiner P. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastrointestinal motility, pancreatic secretion and hormone release in asymptomatic humans. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36:1141-7.
50. Borg J, Melander O, Johansson L, Uvnas-Moberg K, Rehfeld JF, Ohlsson B. Gastroparesis is associated with oxytocin deficiency, oesophageal dysmotility with hyperCCKemia, and autonomic neuropathy with hypergastrinemia. *BMC Gastroenterol*. 2009;9:17.
51. He MR, Song YG, Zhi FC. Gastrointestinal hormone abnormalities and G and D cells in functional dyspepsia patients with gastric dysmotility. *World J Gastroenterol*. 2005;11:443-6.
52. Marzio L, Falcucci M, Cicciaglione AF, Malatesta MG, Lapenna D, Ballone E *et al*. Relationship between gastric and gallbladder emptying and refilling in normal subjects and patients with *H. pylori*-positive and negative idiopathic dyspepsia and correlation with symptoms. *Dig Dis Sci*. 1996;41:26-31.

53. Minocha A, Mokshagundam S, Gallo SH. Alterations in upper gastrointestinal motility in *Helicobacter pylori*-positive nonulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:1797-1800.
54. Murakami K, Asagoe K, Dekigai H, Kusaka S, Saita H, Kita T. Influence of *Helicobacter pylori* infection and the effects of its eradication on gastric emptying in non-ulcer dyspepsia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;7 Suppl 1:593-7.
55. Scott AM, Kellow JE, Shuter B, Cowan RN, Corbett AM, Riley JW *et al*. Intra-gastric distribution and gastric emptying of solids and liquids in functional dyspepsia. Lack of influence of symptom subgroups and *H. pylori*-associated gastritis. *Dig Dis Sci*. 1993;38:2247-54.
56. Konturek JW, Stoll R, Menzel J, Konturek M, Konturek SJ, Domschke W. Eradication of *Helicobacter pylori* restores the inhibitory effect of cholecystokinin on gastric motility in duodenal ulcer patients. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36:241-6.
57. Sykora J, Malán A, Záhlava J, Varvarská J, Stozický F, Siala K *et al*. Gastric emptying of solids in children with *H. pylori*-positive and *H. pylori*-negative non-ulcer dyspepsia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(3):246-52.
58. Alhan E, Calik A, Kucuktulu U, Cinel A. The effects of variously performed vagotomies on gastric secretion and gastric emptying in rats. *Acta Chir Hung*. 1995-96;35:277-84.
59. Beales IL. Effect of platelet-activating factor on gastrin release from cultured rabbit G-cells. *Dig Dis Sci*. 2001;46(2):301-6.
60. Becker HD. Hormonal changes after gastric surgery. *Clin Gastroenterol*. 1980;9:755-71.
61. Bisschops R, Karamanolis G, Arts J, Caenepeel P, Verbeke K, Janssens J, Tack J. Relationship between symptoms and ingestion of a meal in functional dyspepsia. *Gut*. 2008;57:1495-503.
62. Brody FJ, Trad KS. Comparison of acid reduction in anti-ulcer operations. *Surg Endosc*. 1997;11(2):123-5.

63. Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Konturek SJ, Pajdo R, Drozdowicz D *et al.* Triple eradication therapy counteracts functional impairment associated with *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54(1):33-51.
64. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guide to the care and use of experimental animals. 1984;2:347.
65. Chang CS, Chen GH, Kao CH, Wang SJ, Peng SN, Huang CK. The effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric emptying of digestible and indigestible solids in patients with nonulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 1996;91(3):474-9.
66. Coghlan JG, Gilligan D, Humphries H, Mekenna D, Dodey C, Sweeney E, Keane C, O'Morain C. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers. *Lancet.* 1987;2:1109-11.
67. Cuschieri A. Surgical management of severe intractable postvagotomy diarrhoea. *Br J Surg.* 1986;73(12):981-4.
68. Debongnie JC, Donnay M, Mairesse J. *Gastrospirillum hominis* ("*Helicobacter heilmannii*"): a cause of gastritis, sometimes transient, better diagnosed by touch cytology? *Am J Gastroenterology.* 1995;90(3):411-6.
69. Deselliers LP, Tan DT, Scott RB, Olson ME. Effects of *Giardia lamblia* infection on gastrointestinal transit and contractility in Mongolian gerbils. *Dig Dis Sci.* 1997;42(12):2411-9.
70. Ebara S, Shirasaka D, Aoyama N, Kachi M, Miki I, Morita Y *et al.* The relationship between gastric emptying determined by the breath test and *H. pylori*. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(74):613-6.
71. Edwards AM. Observations sur quelques mammifères du nord de la Chine. *Ann Sci Nat.* 1867;7:375-7.
72. Fock KM. Functional dyspepsia, *H. pylori* and post infectious FD. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 3:39-41.
73. Futagami S, Shimpuku M, Yin Y, Shindo T, Kodaka Y, Nagoya H *et al.* Pathophysiology of functional dyspepsia. *J Nippon Med Sch.* 2011;78(5):280-5.

74. Giurcan R, Voiosu TA. Functional dyspepsia: a pragmatic approach. *Rom J Intern Med.* 2010;48(1):9-15.
75. Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology.* 1989;96:615-25.
76. Hinder RA, Bremner CG, Horn BKP. A radio-isotope method of measuring gastric emptying, reflux and secretion. *Br J Surg.* 1972;59:903.
77. Jones KL, Wishart JM, Berry M, Russo A, Xia HH, Talley NJ *et al.* *Helicobacter pylori* infection is not associated with delayed gastric emptying or upper gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus. *Dig Dis Sci.* 2002;47(4):704-9.
78. Jordan Jr. PH. Surgery for peptic ulcer disease. *Curr Probl Surg.* 1991;271-330.
79. Kachi M, Shirasaka D, Aoyama N, Ebara S, Miki I, Morita Y *et al.* Effects of *Helicobacter pylori* eradication therapy on gastric emptying measured using the <sup>13</sup>C-octanoic acid breath test and the acetaminophen method. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(5):824-30.
80. Kao CH, Hsu YH, Wang SJ. Delayed gastric emptying and *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic renal failure. *Eur J Nucl Med.* 1995;22(11):1282-5.
81. Kao CH, Pan DY, Wang SJ, Chen GH. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric emptying in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Nucl Med.* 1995;22(2):122-5.
82. Kao CH, Tsai SC, Wang SJ, Chen GH. Abnormal gastric emptying and *Helicobacter pylori* infection in patients with cirrhosis of the liver. *Nucl Med Commun.* 1996;17(10):915-9.
83. Labenz J. Evidence for the essential role of *Helicobacter pylori* in gastric ulcer disease. *Gut.* 1994; 35:19.
84. Leontiadis GI, Minopoulos GI, Maltezos E, Kotsiou S, Manolas KI, Simopoulos K *et al.* Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric emptying rate in patients with non-ulcer dyspepsia. *World J Gastroenterol.* 2004;10(12):1750-4.
85. Machado RS, Reber M, Patrício FR, Kawakami E. Gastric emptying of solids is slower in functional dyspepsia unrelated to *Helicobacter pylori* infection in female children and teenagers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46(4):403-8.

86. Mimidis K, Tack J. Pathogenesis of dyspepsia. *Dig Dis*. 2008;26(3):194-202.
87. Mizuta Y, Shikuwa S, Isomoto H, Mishima R, Akazawa Y, Masuda J *et al*. Recent insights into digestive motility in functional dyspepsia. *J Gastroenterol*. 2006;41(11):1025-40.
88. Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S *et al*. Influence of EPIYA-Repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori CagA*. *Gastroenterology*. 2006;130:1181-90.
89. Oida T, Kano H, Mimatsu K, Kawasaki A, Kuboi Y, Fukino N *et al*. Gastric marginal ulcer after pancreaticoduodenectomy with pancreaticogastrostomy due to delayed gastric emptying and *Helicobacter pylori* infection. *Hepatogastroenterology*. 2012;59(115):899-902.
90. Oustamanolakis P, Tack J. Dyspepsia: organic versus functional. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(3):175-90.
91. Penta R, Ueno H, Nishi Y, Wen CY, Nakazato M, Kohno S. *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells: from gastritis to cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2005;24:337-45.
92. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Suzuki S, Matsuzaki J, Hirata K *et al*. Dysfunctional gastric emptying with down-regulation of muscle-specific microRNAs in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Gastroenterology*. 2011;140(1):189-98.
93. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadacos K, Martinez-Gonzalez B, Roumbani A, Panayiotou J *et al*. *CagA* and *VacA* Polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected greek children. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2426-34.
94. Thompson DG. Modulation of gastric perception and motility in man. Current concepts and correlation with symptoms. *Dig Dis Sci*. 1994;39 Supl 12:48S-50S.
95. Van Zanten SJ, Dixon MF, Lee A. The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. *Gastroenterology*. 1999;116(5):1217-29.

96. Wolfle TL. 50 years of the Institute for Laboratory Animal Research (ILAR): 1953-2003. ILAR J. 2003;44(4):324-37.

## APÊNDICES

**Tabela 1:** Distribuição dos animais segundo os grupos experimentais.


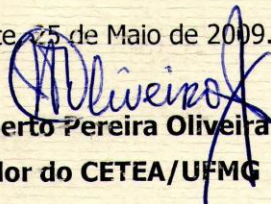
Animal	Grupo	Tempo de infecção	Índice de esvaziamento gástrico (%)	Gastrinemia (pg/mL)
1	A	180	3	4163,5
2	A	180	21	4318,5
3	A	180	2	4283,5
4	A	180	14	4438,5
5	A	180	15	4138,5
6	A	180		
7	A	180	9	
8	A	180	13	
9	B1	45		5223,5
10	B1	45		5353,5
11	B1	45	2	5228,5
12	B1	45	6	5403,5
13	B1	45	4	5358,5
14	B1	45		5573,5
15	B1	45	7	5438,5
16	B1	45	20	5288,5
17	C1	45		3658,5
18	C1	45	3	3848,5
19	C1	45	9	3703,5
20	C1	45	13	
21	C1	45	5	1708,5
22	C1	45	10	
23	C1	45	7	3993,5
24	C1	45	6	4918,5
25	D1	45	5	
26	D1	45	22	4978,5
27	D1	45		4808,5
28	D1	45	3	4838,5
29	D1	45	6	4698,5
30	D1	45	13	4603,5
31	D1	45	16	4253,5
32	D1	45	1	4398,5
33	C2	180	9	4683,5
34	C2	180	27	4613,5
35	C2	180	7	4003,5
36	C2	180	9	4643,5
37	C2	180		
38	C2	180	15	4783,5



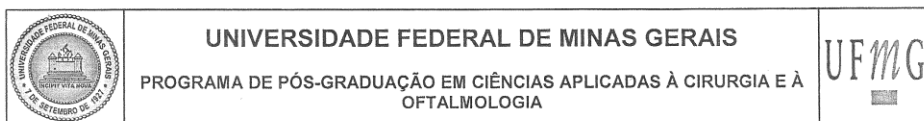
39	C2	180	15	4923,5
40	C2	180	43	4768,5
41	D2	180	1	4448,5
42	D2	180	18	4133,5
43	D2	180		3238,5
44	D2	180	13	3218,5
45	D2	180	15	
46	D2	180		2968,5
47	D2	180	14	3668,5
48	D2	180	26	3983,5
49	B2	180	25	3883,5
50	B2	180	21	
51	B2	180	22	4918,5
52	B2	180	29	4743,5
53	B2	180		4693,5
54	B2	180		4418,5
55	B2	180	22	4223,5
56	B2	180	17	3973,5

## ANEXOS

**Anexo 1:** Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</b> <b>- C E T E A -</b>
<b>CERTIFICADO</b>	
<p>Certificamos que o <b>Protocolo nº 27/2009</b>, relativo ao projeto intitulado "<b>Esvaziamento gástrico e secreção de gastrina em gerbils infectados com diferentes cepas de Helicobacter pylori após vagotomia com piloroplastia</b>", que tem como responsável(is) <b>Ivana Duval de Araujo</b>, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo <b>Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)</b>, tendo sido aprovado na reunião de <b>20/ 05/2009</b>.</p>	
<p>Este certificado expira-se em <b>20/ 05/ 2014</b>.</p>	
<b>CERTIFICATE</b>	
<p>We hereby certify that the <b>Protocol nº 27/2009</b>, related to the project entitled "<b>Gastric emptying and gastrin secretion in vagotomized gerbils infected with different Helicobacter species</b>", under the supervisors of <b>Ivana Duval de Araujo</b>, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the <b>Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)</b>, and was approved in <b>May 20, 2009</b>.</p>	
<p>This certificate expires in <b>May 20, 2014</b>.</p>	
<p>Belo Horizonte, 25 de Maio de 2009.</p>	
<p> <b>Prof. Humberto Pereira Oliveira</b> <b>Coordenador do CETEA/UFMG</b></p>	
<p><b>Universidade Federal de Minas Gerais</b> Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>	
<p>(Mod.Cert. v1.0)</p>	

**Anexo 2: Declaração de aprovação.**



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

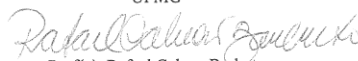
**Esvaziamento gástrico e gastrinemia em gerbis infectados com cepas de Helicobacter pylori de diferentes expressões gênicas para o fragmento epyia**


**CARLYLE MARQUES BARRAL**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração ANATOMOFISIOPATOGENIA CIRÚRGICA,

Aprovada em 11 de novembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Ivaia Duval de Araujo - Orientador  
UFMG



  
Prof(a). Rafael Calvao Barbuto  
UFMG

  
Prof(a). Bruno Zilberstein  
USP

  
Prof(a). Viviane Santuari Parisotto Marino  
UFMG

Belo Horizonte, 11 de novembro de 2013.

**Anexo 3: Ata da defesa da dissertação.**

	<p style="text-align: center;"><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA</p>	
---	--	---

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO  
CARLYLE MARQUES BARRAL**


Realizou-se, no dia 11 de novembro de 2013, às 14:00 horas, sala 029, andar terreo, Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Esvaziamento gástrico e gastrinemia em gerbis infectados com cepas de Helicobacter pylori de diferentes expressões gênicas para o fragmento epyia*, apresentada por CARLYLE MARQUES BARRAL, número de registro 2011656910, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Ivana Duval de Araujo - Orientador (UFMG), Prof(a). Rafael Calvao Barbuto (UFMG), Prof(a). Bruno Zilberstein (USP), Prof(a). Viviane Santuari Parisotto Marino (UFMG).

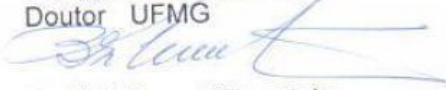
A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada  
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 11 de novembro de 2013.

  
Prof(a). Ivana Duval de Araujo  
Doutora - UFMG

  
Prof(a). Rafael Calvao Barbuto  
Doutor - UFMG

  
Prof(a). Bruno Zilberstein  
Doutor - USP

  
Prof(a). Viviane Santuari Parisotto Marino  
Doutora - UFMG