

**Rafael Calvão Barbuto**

**GASTRINEMIA E DENSIDADE DAS CÉLULAS G E D  
NO ESTÔMAGO DE GERBIS INFECTADOS COM  
*HELICOBACTER PYLORI* SUBMETIDOS A VAGOTOMIA  
COM PILOROPLASTIA**

**Belo Horizonte**

**2008**

**RAFAEL CALVÃO BARBUTO**

**GASTRINEMIA E DENSIDADE DAS CÉLULAS G E D NO ESTÔMAGO  
DE GERBIS INFECTADOS COM *HELICOBACTER PYLORI* SUMETIDOS  
A VAGOTOMIA COM PILOROPLASTIA**

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

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

CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulciene Maria de Magalhães  
Queiroz

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Resposta Inflamatória à  
agressão Tecidual

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

2008

B241g Barbuto, Rafael Calvão  
Gastrinemia e densidade das células G e D no estômago de gerbis infectados com *Helicobacter pylori* submetidos a vagotomia com piloroplastia.  
/ Rafael Calvão Barbuto. – 2008.  
93 f. ilustr.

Orientadora: Ivana Duval de Araujo  
Co-orientadora: Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Infecções por *Helicobacter*. 3. Vagotomia.  
4. Células secretoras de gastrina. 5. Células secretoras de somatostatina.  
6. Experimentação animal. I. Duval-Araujo, Ivana. II. Queiroz, Dulciene Maria de Magalhães. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 154

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **REITOR**

Prof. Dr. Ronaldo Tadeu Pena

## **PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

## **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Francisco José Pena

## **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Carlos Faria Santos Amaral

## **COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA**

Prof. Dr. Edson Samesina Tatsuo (Coordenador)

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches (Subcoordenador)

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

## **SECRETÁRIA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Sra. Egly da Conceição Vieira

**RAFAEL CALVÃO BARBUTO**

**GASTRINEMIA E DENSIDADE DAS CÉLULAS G E D NO ESTÔMAGO  
DE GERBIS INFECTADOS COM HELICOBACTER PYLORI SUBMETIDOS  
A VAGOTOMIA COM PILOROPLASTIA**

Tese apresentada e defendida perante a Comissão Examinadora, constituída pelos professores:

---

---

---

---

---

---

---

---

Dulciene Maria de Magalhães Queiroz (Co-orientadora)

---

Ivana Duval de Araújo (Orientadora)

Belo Horizonte, de de 2008.

Aos meus sobrinhos, André e Annelise, pelo carinho e incentivo

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ivana Duval Araujo, por despertar em mim o interesse pela Pesquisa e pela vida acadêmica e por me incentivar em todos os momentos da minha vida pessoal e profissional.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia por toda a amizade e apoio dedicados, em especial à Professora Dra. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, pela co-orientação desta tese, ao Professor Dr. Gifone Aguiar Rocha, pelo auxílio constante, à bióloga Juliana Pinto da Silva Mol, pelo cultivo das amostras de *Helicobacter pylori*, ao biólogo Fabrício Freire de Melo pelo suporte técnico e à técnica de laboratório Marina do Amaral pela logística do manuseio de materiais e confecção dos meios de cultura.

Ao Professor Dr. José Carlos Serufo pela presteza e disponibilidade na realização das análises clínicas de gastrina sérica.

Ao Professor Dr. Alfredo José Afonso Barbosa pela dedicação à Pesquisa e pela colaboração no estudo histopatológico.

À equipe do Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Medicina da UFMG, em especial à Profa. Dra. Lúcia Porto Fonseca de Castro pelo carinho, orientação e ensinamentos; à Professora Mariana Gontijo Ramos pela colaboração no processamento das biopsias pela técnica imunoistoquímica e à técnica de laboratório Maria de Lourdes Gomes Evangelista pelo preparo dos cortes histológicos e confecção das lâminas utilizadas neste estudo.

Aos Professores Dr. José Renan da Cunha Melo e Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade pela utilização do Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica para os estudos de microscopia.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina na UFMG, Marcelo Moreira de Jesus, Derlim Severiano de Paula e José Maria de Almeida, pelo cuidado e tratamento especial dispensado aos animais usados nesse experimento.

Aos funcionários da Disciplina de Técnica Cirúrgica, Adão Alves Teixeira (*in memoriam*), Jaime dos Santos e Rosália Nery Barbosa, pelo suporte técnico durante todo o trabalho experimental.

Às secretárias do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, em especial a Sra. Egly da Conceição Vieira, Adriana Oliveira e Élen Cristina de Jesus pela paciência e incentivo durante todo o Curso de Doutorado.

Aos amigos do Grupo de Parede Abdominal e Retroperitônio do Hospital das Clínicas da UFMG, Sílvia Zenóbio do Nascimento, Antônio Eustáquio de Oliveira, Geraldo Henrique Gouvêa de Miranda pela colaboração e amizade durante essa caminhada.

À Prof. Dra. Paula Martins pela afeição e apoio no campo pessoal e profissional.

À médica Magda Maria Profeta da Luz, grande amiga e companheira na graduação em Medicina, nos plantões do Pronto Atendimento do Hospital das Clínicas da UFMG e nos bons e maus momentos da vida.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Savassi Rocha e à Profa. Dra. Soraya Rodrigues Almeida pela confiança e pela possibilidade de trabalhar junto à Residência Médica do HC.

Ao designer gráfico e amigo Eduardo Carvalho de Almeida pela colaboração na produção gráfica das fotografias digitais.

Ao médico Eduardo Ângelo Braga pela contribuição no desenvolvimento da parte experimental desse estudo.

Ao Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG e Fapemig pelo suporte financeiro.

“O homem nasceu para aprender,  
aprender tanto quanto a vida lhe permita”.

João Guimarães Rosa

## RESUMO

A infecção gástrica pelo *Helicobacter pylori* (HP) está envolvida na etiopatogênese da úlcera péptica (UP), gastrite crônica atrófica e linfoma MALT, além de forte associação ao câncer gástrico. A UP é uma das doenças mais prevalentes no mundo e, atualmente, o seu tratamento é clínico, ficando a cirurgia reservada apenas às complicações ou à falência clínica. Dentre as técnicas operatórias, a vagotomia associada a piloroplastia foi uma opção cirúrgica bastante utilizada nas últimas décadas. Porém, não se sabe com precisão as alterações fisiopatológicas iniciais decorrentes dessa associação (HP e cirurgia). Na tentativa de elucidar essas alterações desenvolveu-se um modelo experimental para avaliar a influência do HP e da cirurgia sobre a gastrinemia e a densidade das células G e D do estômago. Estudaram-se 53 gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) divididos em quatro grupos: Grupo A (n= 10), sem infecção pelo HP, operação simulada após 30 dias; Grupo B (n=14), sem infecção pelo HP, operação (vagotomia e piloroplastia) após 30 dias; Grupo C (n=12), infecção pelo HP, operação simulada após 30 dias e Grupo D (n=17), infecção pelo HP, operação (vagotomia e piloroplastia) após 30 dias. Após 90 dias da operação foi coletado sangue para dosagem da gastrina pós-prandial e, em seguida, os animais foram sacrificados e seus estômagos ressecados para obtenção de biopsias do corpo, antro e zonas transicionais (corpo-antro e antro-duodeno) para avaliação microbiológica, histológica e imunoistoquímica. A presença da infecção foi confirmada por microscopia direta através da análise das biopsias do antro coradas pela carbolfucsina e pela PCR (“Polymerase Chain Reaction”) das biopsias do antro e corpo. Foi avaliada a presença e característica do infiltrado inflamatório no material biopsiado corado pela hematoxilina-eosina, através de microscopia óptica. Não se observou inflamação significativa no corpo dos animais dos quatro grupos. Na junção corpo-antro e na junção antro-duodenal, a presença de infiltrado inflamatório apresentou diferença quando comparados os Grupos B e D ( $p=0,018$  e  $p=0,021$ , respectivamente) e os Grupos C e D ( $p=0,018$  e  $p=0,017$ , respectivamente). No antro, a presença de infiltrado inflamatório foi significativa quando comparados os Grupos A e C ( $p=0,039$ ) e os Grupos B e D ( $p=0,05$ ). A inflamação, em sua maioria, foi classificada como leve, com predomínio de infiltrado mononuclear e ausência de agregados linfóides. Na análise imunoistoquímica, observou-se aumento da densidade das células G quando comparados os grupos A e C ( $p= 0,0001$ ) e B e D ( $p=0,007$ ) e aumento da densidade das células D quando comparados os grupos A e C ( $p=0,001$ ) e uma forte tendência ao aumento quando comparados os grupos B e D ( $p=0,056$ ). A análise desses resultados permite concluir que a inflamação é mais importante nas regiões

mais distais do estômago e a sua presença pode estar associada à infecção pelo HP ou a associação da infecção com a vagotomia e piloroplastia, dependendo da localização anatômica. A infecção pelo *Helicobacter pylori* em gerbis aumenta a densidade das células G e das células D na fase aguda, porém não alteram os níveis séricos de gastrina pós-prandiais.

Palavras-Chave : *Helicobacter pylori*. Vagotomia. Células G. Células D. Gastrina.

## ABSTRACT

The gastric *Helicobacter pylori* (HP) infection is involved in etiopathogenesis of peptic ulcer (PU), atrophic chronic gastritis, MALT lymphoma, beyond strong association to the gastric cancer. The PU is one of the illnesses most prevalent in the world. Currently, the PU treatment is clinical, being the surgery reserved only to the complications or the clinical failure. Amongst the surgical techniques, the vagotomy and piloroplasty was a surgical option sufficiently used in the last few decades. However, one does not know with precision the precocious physiopathologic alterations decurrent of this association (HP and surgery). In the attempt to elucidate these alterations an experimental model was developed to evaluate the influence of the HP and the surgery on the gastrinemia and the G and D cells density of the stomach. Fifty three Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) was divided in four groups: Group A (n= 10), no HP infection and simulated surgery 30 days after; Group B (n=14), no HP infection and surgery (vagotomy and piloroplasty) 30 days after; Group C (n=12), HP infection and simulated surgery 30 days after and Group D (n=17), HP infection and surgery (vagotomy and piloroplasty) 30 days after. Ninety days after the operation, blood was collected for the gastrin postprandial dosage and, later, the animals had been sacrificed and carried through biopsies of the corpus, antrum and gastric transitional zones (corpus-antrum and antrum-duodenum) for the microbiological, histological and immunohistochemical evaluation. The infection's presence was confirmed by direct microscopy through the analysis of the biopsies of the antrum and PCR (Polymerase Chain Reaction) of the biopsies of the gastric antrum and corpus. The characteristic and presence of the inflammatory infiltrated one in the biopsies was evaluated, through to the optic microscopy. No significant inflammation was observed in the corpus of all animals. In the corpus-antrum junction and the antrum-duodenum junction, the inflammatory infiltrated presence presented difference when compared the Groups B and D (p=0,018 and p=0,021, respectively) and Groups C and D (p=0,018 and p=0,017, respectively). In the antrum, the inflammatory infiltrated presence was significant when compared the Groups and the C (p=0,039) and Groups B and D (p=0,05). The inflammation was classified as light, with predominance of mononuclear infiltrated and absence of aggregate lymphoid follicles in the majority of the animals. In the immunohistochemical analysis, the increase of the G cells density was observed when compared the groups A and C (p= 0.0001) and B and D (p=0,007) and increase of D cells density when compared the groups A and C (p=0,001) and one strong trend to the increase

when compared groups B and D ( $p=0,056$ ). The analysis of these results demonstrates that the inflammation is more important in the distals regions of the stomach and its presence can be associated to the HP infection or the association of the infection with vagotomy and piloroplasty, depending on the anatomical localization. The precocious HP infection in gerbils increases the G and D cells density, however they do not modify the postprandial gastrinemia.

Key-words: *Helicobacter pylori*. Vagotomy. G Cells. D Cells. Gastrin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia digital do Gerbil da Mongólia ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) .....	18
Figura 2: Fotografia digital de placa de Petri contendo BHM onde se observa o crescimento de colônias de HP .....	19
Figura 3: Fotografia digital do gerbil anestesiado em decúbito dorsal com as patas fixadas por esparadrapos depois da tonsura e anti-sepsia da parede abdominal .....	21
Figura 4: Fotografia digital da cavidade abdominal do gerbil com identificação dos nervos vagos direito (imagem A) e esquerdo (imagem B) .....	21
Figura 5: Fotografia digital da cavidade abdominal do gerbil para identificação do local onde foi realizada a piloroplastia à Heinecke-Miculicz (setas) .....	22
Figura 6 - Desenho esquemático do estômago de gerbil (imagem A*) mostrando as regiões do estômago ( <i>pars esofageana</i> , corpo, antro e duodeno) e estômago de gerbil aberto na curvatura maior (imagem B), mostrando os locais de biópsia (1 - Corpo, 2 – Antro, 3 – Transição corpo/antro e 4 – Transição antro/duodeno) .....	23
Figura 7: Fotografia digital de corte histológico de tecido antral de gerbil analisado por microscopia óptica (aumento: ocular 10x, objetiva 40x) corado por técnica de imunistoquímica (Streptavidina-Biotina-Peroxidase modificada) para identificação de células produtoras de gastrina (células G). A linha tracejada mostra a área de mucosa avaliada, compreendida entre a superfície (A) e a muscular da mucosa (B). Por esta técnica as células G (setas) adquirem coloração acastanhada .....	27
Figura 8: Fotografia digital ampliada de microscopia óptica de corte histológico do antro gástrico infectado pelo HP (setas). Coloração: Carbofucsina. Aumento: 1000 x .....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1 – Presença de infiltrado inflamatório no corpo, junção corpo-antro, antro e junção antro-duodeno do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidos ou não à vagotomia com piloro-plastia .....	34
Gráfico 2 – Densidade de células produtoras de gastrina (células G) do antro de gerbis infectados ou não pelo <i>Helicobacter pylori</i> e submetidos ou não à vagotomia com piloro-plastia .....	37
Gráfico 3 – Densidade de células produtoras de somatostatina (células D) do antro de gerbis infectados ou não pelo <i>Helicobacter pylori</i> e submetidos ou não à vagotomia com piloro-plastia .....	38
Gráfico 4 – Relação entre as células produtoras de gastrina (células G) e células produtoras de somatostatina (células D) do antro de gerbis infectados ou não pelo <i>Helicobacter pylori</i> e submetidos ou não à vagotomia com piloro-plastia .....	39
Gráfico 5 – Mediana da dosagem da gastrina sérica pós-prandial de gerbis infectados ou não com o <i>Helicobacter pylori</i> e submetidas ou não a vagotomia com piloro-plastia .....	40

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Condições do método de PCR .....	25
Tabela 1 – Identificação do <i>Helicobacter pylori</i> no antro gástrico (microscopia direta e PCR) e no corpo gástrico (PCR) de gerbis .....	32
Tabela 2 – Presença de infiltrado inflamatório no corpo, junção corpo- antro, antro e junção antro-duodeno do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidos ou não a vagotomia com piloroplastia .....	34
Tabela 3 – Densidade das células produtoras de gastrina (células G) e de somatostatina (células D) e relação das células G/D do antro do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidos ou não a vagotomia com piloroplastia .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	anticorpo
APUD	“amine precursor uptake descarboxilation” ou amina precursora da descarboxilização
BHM	meio Belo Horizonte
CagA	“citotoxin antigen associated A” ou citocina antigênica associada ao gene A
Cag PAI	“cag pathogenicity island” ou citocina antigêncica marcadora da ilha de patogenicidade
Células D	células produtoras de somatostatina
Células G	células produtoras de gastrina
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm	centímetros
FM	Faculdade de Medicina
g	grama
GIP	“gastric inhibitory polypeptide” ou polipeptídeo inibitório gástrico
HH	<i>Helicobacter heilmannii</i>
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
IARC	“International Agency for Research on Câncer” ou Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-1 $\beta$	interleucina 1 beta
IL-4	interleucina 4
Kg	quilograma
min	minuto
mL	mililitros

mm	milímetro
PCR	“Polymerase Chain Reaction” ou reação em cadeia de polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PVPI	polivinilpirrolidona-iodo
SS1	“Sidney strain type 1” ou cepa de Sidney tipo 1
seg	segundos
TNF- $\alpha$	“tumoral necrosis factor alfa” ou fator de necrose tumoral alfa
UFC	unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UP	úlceras pépticas
VacA	“vacuolating associated A” citocina vacuolizante associada ao gene A
VIP	“vasoactive intestinal polypeptide” ou peptídeo vasoativo intestinal
VP	vagotomia associada a piloroplastia
WHO	“World Health Organization” ou Organização Mundial da Saúde
$\mu$ L	microlitro
$\mu$ m	micrômetro

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius ou graus centígrados

$\alpha$  alfa

$\beta$  beta

$\gamma$  gama

® marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	4
<b>3 RELEVÂNCIA</b> .....	6
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	8
4.1 ULCERA PÉPTICA .....	9
4.2 <i>Helicobacter pylori</i> .....	9
4.3 TRATAMENTO DA ÚLCERA PÉPTICA .....	10
4.4 FISIOLOGIA E REGULAÇÃO DA FUNÇÃO GÁSTRICA .....	11
<b>4.4.1 Células G e D</b> .....	12
<b>4.4.2 Hormônios Intestinais</b> .....	13
4.4.2.1 Gastrina .....	14
4.4.2.2 Somatostatina .....	14
4.5 ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
4.6 ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA VAGOTOMIA .....	16
<b>5 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	17
5.1 ÉTICA .....	18
5.2 ANIMAIS UTILIZADOS E CUIDADOS DISPENSADOS .....	18
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	19
5.4 PREPARO DO HP PARA INÓCULAÇÃO .....	19
5.5 INOCULAÇÃO DO <i>Helicobacter pylori</i> .....	20
5.6 TÉCNICA OPERATÓRIA .....	20
5.7 COLETA DE SANGUE E MORTE DOS ANIMAIS .....	23
5.8 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO GÁSTRICO .....	23
5.9 IDENTIFICAÇÃO DO <i>Helicobacter pylori</i> NO TECIDO GÁSTRICO .....	24
<b>5.9.1 Microscopia Direta</b> .....	24
<b>5.9.2 Biologia Molecular</b> .....	24
5.10 HISTOTOLOGIA .....	25
5.11 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS G e D .....	25
5.12 DOSAGEM DE GASTRINA .....	28
5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	29
<b>6. RESULTADOS</b> .....	30

---

---

6.1 IDENTIFICAÇÃO DO <i>Helicobacter pylori</i> NO TECIDO GÁSTRICO .....	31
<b>6.1.1 Microscopia direta</b> .....	31
<b>6.1.2 Biologia molecular</b> .....	32
6.1.2.1 PCR do antro gástrico .....	32
6.1.2.1 PCR do corpo gástrico .....	32
6.2 HISTOLOGIA .....	33
<b>6.2.1 Infiltrado inflamatório</b> .....	33
6.2.1.1 – Grau da Inflamação .....	35
6.2.1.2 Tipo de infiltrado inflamatório predominante .....	35
<b>6.2.2 Presença de agregados linfóides</b> .....	36
<b>6.3 Imunoistoquímica</b> .....	36
6.3.1 Densidade das células G do antro .....	36
6.3.2 Densidade das células D do antro.....	37
6.3.3 Relação células G/D do antro.....	38
<b>6.4 Gastrinemia pós-prandial</b> .....	40
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>10 APÊNCIDES</b> .....	64
<b>11 ANEXOS</b> .....	69

# **1 INTRODUÇÃO**

A infecção gástrica por bactérias espiraladas é considerada o fator causal da gastrite crônica atrófica, importante fator na etiopatogênese da úlcera péptica (UP) e um dos fatores associados à gênese do câncer gástrico. Dentre essas afecções, a UP é uma das mais comuns, e seu tratamento baseia-se na erradicação do *Helicobacter pylori* (HP) e na restauração dos fatores defensivos da mucosa gástrica (COGHLAN *et al.*, 1987).

Durante muitas décadas, optou-se pela vagotomia associada à *piloro-plastia* como tratamento de escolha nos pacientes com UP, sendo ainda uma opção naqueles casos onde há refratariedade ao tratamento clínico. O princípio dessa operação é o de que, ao controlar a secreção de hormônios gastrointestinais como a gastrina, haveria redução da acidez gastroduodenal e controle eficaz da doença, uma vez que o vago tem ação direta no controle da secreção da gastrina e outros hormônios do trato digestivo, além de modular a atividade motora gastroduodenal por meio de seus ramos celíacos.

Alterações na fisiologia gástrica, como aumento na secreção de gastrina e redução na secreção de somatostatina, são observadas em organismos infectados pelo HP. O mecanismo pelo qual as bactérias alteram a secreção dos hormônios gástricos não está bem esclarecido. Algumas explicações possíveis são a alcalinização do microambiente gástrico pela produção de amônia pela bactéria, presença de outros produtos tóxicos e inflamação do antro, que poderiam estimular as células G produtoras de gastrina e inibir as células D produtoras de somatostatina (BEALES, 2001; BECKER, 1980). Essas mudanças, somadas àquelas promovidas pelas alterações inflamatórias na mucosa gástrica podem modificar o complexo equilíbrio gástrico e afetar a secreção hormonal (BECKER *et al.*, 1973; BELL & POWELL, 1993).

Dados anteriores revelaram que a infecção pelo *Helicobacter helmantii* (HH) em ratos é capaz de induzir respostas semelhantes àquelas vistas na infecção pelo HP, como aumento na concentração sérica pós-prandial de gastrina sem hipergastrinemia no período de jejum (CALABUIG *et al.*, 1988), o que poderia indicar que estímulos vagais, além daqueles produzidos pela infecção bacteriana, atuam sinergicamente no estímulo à produção de gastrina. Outro estudo, utilizando também ratos infectados pelo HH, corrobora essa hipótese ao mostrar que a interação entre vagotomia, piloro-plastia e a infecção pelo HH produz aumento na velocidade do esvaziamento gástrico (BARBUTO, 2001). Não foi identificado, entretanto, qual seria o mecanismo responsável por estas alterações na fisiologia gástrica, visto que existem poucos estudos clínicos bem controlados sobre o comportamento hormonal e motor gástrico na infecção pelo *Helicobacter*. Também são escassos os dados referentes às

alterações da fisiologia gástrica após operações de denervação do antro gástrico e sem uso de medidas terapêuticas para erradicação da bactéria.

Para simular o que poderia ocorrer nesses indivíduos, pode-se lançar mão de modelos experimentais. Camundongos e ratos infectados por bactérias espiraladas desenvolvem infecção gástrica com alterações histopatológicas semelhantes às observadas na gastrite. A persistência da infecção por longos períodos (CUSCHIERI, 1986), a presença de células mononucleares na mucosa gástrica de animais infectados (DEBONGNIE *et al.*, 1995) e as alterações hormonais semelhantes às de seres humanos (BRODY & TRAD, 1997) fazem desse modelo um bom parâmetro para o estudo da infecção de seres humanos pelo HP. Outra espécie animal, o gerbil, mostrou-se mais adequado à simulação da infecção em seres humanos pelo HP, pois a infecção é obtida facilmente, sem a necessidade de usar artifícios como manipulação gênica ou isolamento em ambiente livre de bactérias. Este modelo, portanto, poderia ser aplicado na investigação da possível interação entre infecção gástrica por bactérias espiraladas e operações de denervação do antro.

Sendo a acetilcolina um neurotransmissor capaz de estimular a síntese de gastrina pelas células G do antro gástrico, a denervação gástrica poderia tornar essas células mais sensíveis, ou talvez mais numerosas, e a infecção por bactérias espiraladas gástricas poderia atuar como estímulo para secreção de gastrina por essas mesmas células. Portanto, é possível que, a vagotomia em organismos infectados pelo HP promova hipergastrinemia, que pode estar associada a alterações da densidade e/ou função das células G produtoras de gastrina e das células D produtoras de somatostatina.

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar alterações iniciais na gastrinemia pós-prandial, na densidade das células G e D e na histologia do epitélio gástrico induzidas pela:

- a. infecção pelo *Helicobacter pylori*.
- b. vagotomia associada a piloroplastia.
- c. associação da infecção pelo *Helicobacter pylori* com vagotomia e piloroplastia.

## **3 RELEVÂNCIA**

Os resultados deste estudo podem dar informações sobre a relação de células G e D e gastrinemia em indivíduos infectados pelo HP e submetidos a operação gástrica. Esses dados poderão motivar estudos clínicos em pacientes submetidos a vagotomia com piloroplastia com vistas à necessidade ou não da erradicação do HP no pós-operatório de indivíduos assintomáticos.

## **4 REVISÃO DA LITERATURA**

#### 4.1 – ÚLCERA PÉPTICA

A úlcera péptica 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 úlcera péptica, 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 (DeCROSS & MARSHALL, 1993). 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 (1983), 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.

#### 4.2 – *Helicobacter pylori*

Em 1983, WARREN e MARSHALL, 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* (WARREN & MARSHALL, 1983; 1984). A partir de 1989 foi reclassificada em um novo gênero, o *Helicobacter*, sendo denominada *Helicobacter pylori* (HP) (DOOLEY & COHEN, 1988; HOLCK *et al.*, 1997; BUCKLEY & O’MORAIN, 1998; OWEN, 1998).

A infecção pelo HP é uma das mais prevalentes na espécie humana, atingindo cerca de 50% da população mundial (BESWICK *et al.*, 2006). Além da úlcera péptica, o HP é reconhecido como o fator etiopatogênico mais importante da gastrite tipo B e do linfoma MALT, e desde 1994 classificado como carcinógeno Grupo-1 em seres humanos (evidência suficiente de carcinogenicidade) pela “World Health Organization” (WHO) e pela “International Agency for Research on Câncer” (IARC, 1994; ASAKA *et al.*, 1998). A maioria dos indivíduos colonizados apresenta apenas gastrite assintomática, porém 10 a 20% podem desenvolver úlcera péptica (gástrica e duodenal), e aproximadamente 1% a 2%, câncer gástrico (BESWICK *et al.*, 2006).

O HP apresenta um tropismo pelo estômago (principalmente antro e corpo) e duodeno, onde se fixa à parede gástrica, 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 (SMITH, 2006). 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% destas bactérias espiraladas se fixam à parede gástrica. Após a adesão, a bactéria provoca uma série de desordens histológicas e humorais, que se iniciam com inflamação, podendo progredir a partir daí para atrofia, metaplasia, displasia e neoplasia (FOX & WANG, 2007).

Além dessas mudanças, os organismos infectados pelo HP apresentam ainda mudanças na fisiologia do trato digestivo, sobretudo no estômago (vide tópico 4.5).

#### 4.3 – TRATAMENTO DA ÚLCERA PÉPTICA

Cerca de 90% dos pacientes com úlcera duodenal e 70% daqueles com úlcera gástrica estão infectados com o HP. A erradicação da bactéria, obtida com o uso de antibacterianos associado aos inibidores da bomba de prótons, diminui substancialmente a recorrência da UP (BELL & POWELL, 1993).

Até meados do século passado, a terapêutica operatória consistia na realização de jejunostomias para derivação do trânsito ou gastrectomias totais ou parciais. Nos anos 40, com o melhor conhecimento da fisiologia gástrica e dos mecanismos de ação do nervo vago na secreção gástrica, a vagotomia, popularizada por Dragstedt, foi instituída como uma nova terapêutica. Porém o próprio Dragstedt observou que a vagotomia, isoladamente, resultava em dificuldades no esvaziamento gástrico, e sugeriu sua combinação a um dos procedimentos de drenagem gástrica realizados anteriormente (LIPOAF *et al.*, 2006). Já entre os anos 70 e 80 do século passado, a vagotomia troncular combinada à antrectomia foi a operação mais realizada devido a taxa de recorrência inferior a 5% e baixa mortalidade (LIPOAF *et al.*, 2006). Porém, os sintomas pós-operatórios, especialmente a “Síndrome de Dumping” eram freqüentes. Nessa mesma época, a vagotomia troncular associada à piloroplastia (VP) passou a ser a cirurgia de escolha de muitos cirurgiões, pois apresentava índices de recidiva ulcerosa bem próximos ao

da antrectomia associada à vagotomia troncular, porém com taxas de complicações bem menores (JORDAN Jr, 1991).

Ainda no final do século passado outras modalidades de vagotomia foram desenvolvidas, como a vagotomia seletiva, que consiste na denervação dos ramos gástricos do vago separadamente dos ramos hepáticos e celíacos, e a vagotomia superseletiva ou vagotomia das células parietais, onde se realizava a denervação da massa de células parietais com preservação da inervação motora proximal do estômago. Apesar dos supostos benefícios decorrentes da menor denervação, essas técnicas foram pouco utilizadas, pois requeriam grande experiência e técnica cirúrgica apurada e, além disso, alguns estudos não demonstraram superioridade em relação aos tratamentos até então realizados (HERRINGTON Jr & SAWYERS, 1978).

Atualmente, o tratamento operatório da úlcera péptica está restrito aos seguintes casos: falência do tratamento clínico com recorrência da doença; na urgência, nos casos de perfurações ou sangramento não controlado pela terapêutica endoscópica; na obstrução pilórica, por deformidades anatômicas no bulbo duodenal decorrentes da cicatrização das lesões (LIPOAF *et al.*, 2006).

#### 4.4 – FISOLOGIA E REGULAÇÃO DA FUNÇÃO GÁSTRICA

O estômago desempenha importantes funções absorptiva, secretora e de marca-passo da motilidade digestiva. Essas funções resultam da interação entre atividade intrínseca das células musculares e secretoras e os sistemas de regulação neuro-hormonais (THOMPSON, 1994).

As células gastrointestinais produzem peptídeos endócrinos, parácrinos e neurócrinos que atuam como mensageiros químicos e regulam as funções do tubo digestivo. Os peptídeos endócrinos, ou hormônios, como a gastrina, secretina e motilina, são capazes de atingir todos os órgãos através da circulação sanguínea. São secretados por células endócrinas largamente distribuídas em toda a mucosa do trato digestório, razão pela qual o tubo digestivo é considerado o maior órgão endócrino do corpo. Os peptídeos parácrinos, como a histamina, atingem os órgãos alvo através da sua difusão no espaço extracelular e ainda podem atuar sobre as células endócrinas, regulando a liberação de outros hormônios. Os peptídeos neurócrinos localizam-se em neurônios e atuam como neurotransmissores, atingindo as

células-alvo através da sua difusão pela fenda sináptica. Eles atuam inibindo ou estimulando a liberação dos peptídeos endócrinos e parácrinos.

O controle neural é feito pelo sistema nervoso autônomo, por meio de uma complexa rede de neurônios localizada na parede do tubo gastrointestinal, formando um sistema nervoso extrínseco e outro intrínseco ou entérico.

O sistema nervoso extrínseco é formado por ramos simpáticos e parassimpáticos. Os ramos simpáticos têm fibras pré e pós-ganglionares que, quando estimuladas, inibem a transmissão sináptica do sistema nervoso entérico e, como consequência, reduzem a atividade motora externa, estimulando a contração da muscular da mucosa e de alguns esfíncteres, provocando vasoconstricção. Já o ramo parassimpático, cujas fibras têm origem no núcleo dorsal do vago, é formado por fibras pré-ganglionares, com corpos medulares que estão localizados na medula espinhal e que terminam em neurônios colinérgicos nos plexos submucosos e mioentéricos. A estimulação parassimpática é responsável por aumentar a atividade motora e secretora.

O sistema nervoso intrínseco é formado por neurônios cujos corpos celulares localizam-se em dois pontos da parede intestinal: na camada muscular externa (plexo mioentérico) e na camada submucosa (plexo submucoso). Há ainda plexos não ganglionares localizados na lâmina própria (plexo mucoso) e na transição entre a submucosa e a serosa. Enquanto o plexo mioentérico está relacionado ao peristaltismo, o plexo submucoso controla a atividade secretora endócrina e exócrina.

#### 4.4.1 - Células G e D

As células endócrinas intestinais são derivadas das células neuroendócrinas, originadas no ectoblasto embrionário e responsáveis pela produção de vários hormônios intestinais como gastrina, colecistoquinina, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), polipeptídeo inibitório gástrico (GIP), somatostatina, entre outros. Localizam-se em todo tubo gastrointestinal, de forma dispersa, raramente agrupadas e fazem parte o sistema APUD (sigla do inglês, “amine precursor uptake decarboxilation”).

A digestão é a função mais importante do estômago, onde a secreção ácida tem papel fundamental. Na célula, o controle da secreção ácida gástrica é feito pela interação entre os dois grupos predominantes de células endócrinas: as células produtoras de gastrina (células G) e as células produtoras de somatostatina (células delta ou células D) (LIU *et al.*, 2005).

No antro de um indivíduo normal, as células G representam 50% das células endócrinas e as células D 15% dessas células. Localizam-se nos dois terços superiores e terço inferior da mucosa, respectivamente. As células D são encontradas também no corpo gástrico, onde representam cerca de 8% das células endócrinas (LIU *et al.*, 2005).

A relação entre a área e o número de células G e D tende a permanecer constante, sendo regulada pela estimulação e inibição de mecanismos parácrinos (histamina), endócrinos (gastrina e somatostatina) e nervosos (fibras vagais). O aumento na relação células G/D indica um distúrbio funcional no trato gastrointestinal, e pode ser observado na gastrite, nas lesões ulceradas da mucosa e na infecção pelo HP, onde o número de células G é significativamente mais elevado que o número de células D. Essas alterações correlacionam-se melhor com a gravidade da inflamação do que com a densidade do HP (LIU *et al.*, 2005). Em crianças, a erradicação do HP leva ao aumento significativo da densidade de células D e diminuição de células G antrais (QUEIROZ *et al.*, 1994), também observada em adultos (THAM *et al.*, 1998). A diminuição na densidade das células D observada na infecção pelo HP poderia explicar a hipergastrinemia observada nesses pacientes, já que a somatostatina é um inibidor das células G.

A influência da inervação vagal na densidade e relação entre células G e D é controversa. Estudo experimental em ratos submetidos a diferentes tipos de operações demonstrou que quando houve aumento do pH antral a concentração gastrina sérica ficou elevada. Em animais vagotomizados há aumento da densidade das células G, provavelmente por ação do pH antral elevado e da passagem do alimento, mostrando que a inervação vagal não é requerida para estimulação da secreção de gastrina (ALUMETS *et al.*, 1980). Em seres humanos, a vagotomia proximal seletiva parece também aumentar a densidade das células G, porém, no que tange às células D, há estudos demonstrando tanto o seu aumento (HOLLE *et al.*, 1985) quanto sua diminuição (ARNOLD *et al.*, 1982), tornando a relação células G/D inalterada ou aumentada, respectivamente.

#### 4.4.2 – Hormônios Intestinais

A gastrina e a somatostatina são os hormônios intestinais mais importantes (YAO *et al.*, 2001). A descoberta da gastrina em 1905 por Edkins acompanhada, meio século depois, pelo isolamento e síntese do “hormônio antral” por GREGORY & TRACY, introduziu

um novo conceito no mecanismo de controle da secreção gástrica, isto é, a importância da ação hormonal atuando paralelamente aos mecanismos nervosos (WALSH & LAM, 1980).

#### 4.4.2.1 – Gastrina

A gastrina é produzida pelas células G, localizadas principalmente na mucosa antro-pilórica, estando essas células ausentes na mucosa oxíntica, íleo e cólon (LARSSON,1980). Algumas poucas células produtoras de gastrina podem ser encontradas no jejuno proximal, sendo que o hormônio produzido por essas células difere estruturalmente daquele produzida pelas células antrais. A gastrina também tem sido encontrada em extratos de jejuno proximal (BECKER, 1980).

Existem seis peptídeos capazes de inibir a secreção da gastrina pelas células G e também capazes de agir sobre as células parietais. Esses hormônios são a secretina, o glucagon, o VIP, o GIP, a somatostatina e a calcitonina. Os mecanismos pelos quais o hormônio pode ser secretado são a excitação vagal, os estímulos intraluminares (alimentos, cálcio, distensão), a estimulação química por via sangüínea (bombesina, epinefrina, cálcio, prednisolona), e pode ser inibido por estímulos vagais colinérgicos, estímulos luminiais (ácido, análogos da prostaglandina E1) e estímulos químicos (secretina, glucagon, GIP, VIP, calcitonina, somatostatina) (WALSH & LAM, 1980).

#### 4.4.2.2 – Somatostatina

A somatostatina foi isolada em 1973 no hipotálamo de ovelhas inicialmente como um fator inibidor do hormônio do crescimento (BRAZEAU *et al.*, 1973). Atualmente, sabe-se que esse hormônio é produzido não só no hipotálamo, mas por vários órgãos do trato gastrointestinal, como duodeno, pâncreas e estômago, e por células nervosas periféricas. No estômago, é produzido pelas células D localizadas principalmente no corpo e antro, e geralmente tem função inibitória sobre os peptídeos gástricos, sendo o principal inibidor da secreção ácida estimulada pela gastrina. No sistema nervoso central, a somatostatina age como um neurotransmissor, e nos tecidos periféricos regula a secreção exócrina e endócrina, além de modular a atividade motora do trato gastrointestinal. Atua ainda na regulação das células hematopoiéticas envolvidas nos mecanismos imunológicos de defesa em diversos

tecidos, incluindo o estômago, sendo que sua secreção é influenciada pelas citocinas produzidas por essas células, especialmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , que atuam como inibidores, e a IL-4, que atua como estimulador (ZAVROS *et al.*, 2004).

#### 4.5 – ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO *Helicobacter pylori*

Diversas alterações gástrica são observadas nos organismos infectados pelo HP, sendo a inflamação a resposta histopatológica mais importante. Fatores liberados pelo HP na mucosa gástrica, como a urease e as proteínas CagA, induzem a 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.

Nos pacientes infectados pelo HP e com UP, foi observada hipersecreção ácida associada a aumentado da gastrinemia pós-prandial. A hipergastrinemia pós-prandial, com níveis normais de gastrina basal, foi observada em pacientes infectados com o HP quando comparados aos indivíduos sem a bactéria, independente da presença da úlcera, e a simples erradicação do HP associa-se a redução importante da gastrinemia. (GISBERT *et al.*, 1995; GRAHAM *et al.*, 1993)

A infecção pelo HP produz alteração do número de células endócrinas responsáveis pela regulação da secreção ácida. Essas alterações são tão mais exacerbadas quanto maior a gravidade da inflamação, sem entretanto, correlacionar-se com a carga bacteriana (LIU *et al.*, 2005). Vários trabalhos têm mostrado a diminuição do número de células D na presença da infecção pelo HP (PARK *et al.*, 1999; HARUMA *et al.*, 2000; TZANEVA, 2001), além de aumento do número e estimulação da função das células G em crianças (SOKIC-MILUTINOVIC *et al.*, 2005). Essa diminuição da população de Células D e aumento de células G, com conseqüente elevação na relação células G/D, pode ser um dos fatores que contribuem para a hipergastrinemia observada nos pacientes com úlcera péptica e infectados pelo HP. Outra explicação para a hipergastrinemia seria o aumento do pH local provocado pela amônia derivada do metabolismo do HP, levando as células G a liberar quantidades excessivas de gastrina, ou reduzindo o funcionamento normal das células G, que normalmente reduzem a liberação de gastrina em pH intraluminal baixo. (KONTUREK & KONTUREK, 1994)

#### 4.6 – ALTERAÇÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS PELA VAGOTOMIA

Diversos estudos mostraram que tanto a vagotomia troncular quanto a vagotomia gástrica proximal induziram ao aumento da gastrina sérica basal e pós-prandial em seres humanos (ELFBERG *et al.*, 1989; LUKASIEWICZ & JONDERKO, 1990), em ratos (MURAKAMI *et al.*, 1988; AMI *et al.*, 1993) e em cães (INMAN *et al.*, 1990). Baseado nos achados de Pavlov no século passado, KONTUREK *et al.* (2005), estudando modelos de digestão, observaram que a estimulação vagal é acompanhada de uma elevação significativa dos níveis dos hormônios estimuladores da secreção ácida do estômago e uma elevação apenas discreta de hormônios inibidores gástricos. Anticolinérgicos, como a atropina, atuam aumentando a resposta da gastrina plasmática aos estímulos digestivos, causando, ao mesmo tempo, uma supressão completa da resposta ácida. Portanto, as interações do complexo vagal-colinérgico atuam aumentando a gastrina e o GRP nas glândulas oxínticas, contribuindo para uma aumento da secreção ácida do estômago. (KONTUREK *et al.*, 2005)

Vários fatores estão envolvidos com o desenvolvimento da possível hipergastrinemia pós-vagotomia. Além do refluxo duodeno-gástrico (MIYATA *et al.*, 1995) também a redução da secreção ácida gástrica, com redução da inibição secretória pH dependente, pode ter grande importância (BECKER, 1980). Em ratos, observou-se aumento da densidade de células G na mucosa antral após denervação vagal em operações como fundectomia gástrica associada a vagotomia ou vagotomia troncular isolada (ALUMETS *et al.*, 1980). Resultados semelhantes foram encontrados em seres humanos submetidos a vagotomia troncular e piloroplastia, onde se verificou aumento do número de células G do antro (ELFBERG *et al.*, 1989). Esta hiperplasia seria secundária à ativação de células G pré-existentes e a maturação rápida de células progenitoras (SHIMODA *et al.*, 1992). Em ratos, a ultra-estrutura dessas células mostrou hipertrofia dos complexos de Golgi e dos retículos endoplasmáticos rugosos, além do aumento do número e variação da densidade eletrônica dos grânulos secretórios (MURAKAMI *et al.*, 1988).

## **5 MATERIAIS E MÉTODO**

## 5.1 – 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, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais, e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sendo protocolado sob o nº 024/04 (Anexo 1).

## 5.2 – ANIMAIS UTILIZADOS E CUIDADOS DISPENSADOS

Foram utilizados 53 gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), machos, com quatro meses de idade e peso médio de 80,0 g (FIG. 1) 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 em condições naturais (ciclos dia/noite) em gaiolas próprias com, no máximo, cinco animais por gaiola. Os animais receberam água e ração padrão para roedores (Labina<sup>®</sup>, Purina, Brasil) à vontade, exceto nos períodos de inoculação da bactéria e no pré e pós-operatório imediatos.



Figura 1: Fotografia digital do Gerbil da Mongólia (*Meriones unguiculatus*)

### 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em quatro grupos:

- Grupo A (n= 10), sem infecção pelo (HP), operação simulada aos 30 dias;
- Grupo B (n=14), sem infecção pelo HP e vagotomia com piloroplastia aos 30 dias.
- Grupo C (n=12), infecção pelo *Helicobacter pylori* (HP), operação simulada aos 30 dias;
- Grupo D (n=17), infecção pelo HP e vagotomia com piloroplastia aos 30 dias.

### 5.4 PREPARO DO HP PARA INOCULAÇÃO

A amostra de *Helicobacter pylori* inoculada nos animais foi obtida de fragmentos de biópsia gástrica (colhidos por esofagogastroduodenoscopia) de um único paciente HP positivo, com diagnóstico endoscópico e histológico de úlcera duodenal, e virgem de tratamento (biópsia n°. 803/05 – Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia/FM/UFMG). Os fragmentos colhidos foram macerados em cadinhos de vidro contendo meio de transporte (4,3g de Brucella<sup>®</sup> Agar - Difco, Detroit, Estados Unidos da América - em 90 mL de água destilada). O material obtido da maceração foi semeado 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 sob condições de microaerofilia, obtida com o uso de Anaerocult C<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, 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 (FIG. 2). As colônias de HP obtidas foram repicadas em BHM e, novamente incubadas em microaerofilia durante 72 horas.



Figura 2: fotografia digital de placa de Petri contendo meio BH, onde se observa o crescimento de colônias de *Helicobacter pylori*.

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 2,0 mL, armazenado em tubos de Eppendorf e congelado a -80°C até a época da inoculação nos animais.

### 5.5 – INOCULAÇÃO DO *Helicobacter pylori*

À época da inoculação, os tubos de Eppendorf contendo o caldo bacteriano foram descongelados à temperatura ambiente e inoculadas 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. A agulha é introduzida através de gavagem oro-esôfago-gástrica, e o inóculo injetado diretamente no estômago.

Foram feitas três inoculações de HP com intervalo de 48 horas entre elas, sendo respeitado jejum de oito horas antes de cada procedimento. Em cada inoculação foram administrados 0,2 mL de caldo bacteriano, na concentração de  $10^9$  UFC/mL. Após a inoculação, os animais receberam solução glicosada a 25% via oral durante 12 horas e, a partir daí, ração padrão para roedores (Labina<sup>®</sup>, Purina, Brasil) à vontade.

### 5.6 – TÉCNICA OPERATÓRIA

Os procedimentos operatórios foram realizados com técnica limpa, porém não asséptica. A anestesia foi realizada por meio de injeção intraperitoneal de solução de xilazina (Rhompum<sup>®</sup> - 20 mg/mL) e quetamina (Ketamin S<sup>®</sup> - 50 mg/mL), na dose de 4,0 mg/Kg e 50 mg/Kg respectivamente.

Os animais dos grupos C e D foram submetidos a operação (operação simulada ou vagotomia com piloroplastia) somente 30 dias depois da inoculação do HP, para que a infecção se estabelecesse. Os animais dos grupos A e B, apesar de não infectados, também foram operados somente depois de 30 dias, para que todos os grupos tivessem o mesmo tempo da operação. Depois de anestesiados, os animais foram submetidos a tonsura da região ventral,

anti-sepsia abdominal com polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) tópico a 10% (FIG. 3) e laparotomia.



Figura 3: Fotografia digital do gerbil anestesiado em decúbito dorsal com as patas fixadas por esparadrapos depois da tonsura e anti-sepsia da parede abdominal.

Os animais dos Grupos B e D foram submetidos a laparotomia mediana, vagotomia troncular bilateral, piloroplastia e laparorráfia. A vagotomia troncular foi realizada seccionando-se os nervos vago direito e esquerdo na altura do hiato esofágico (FIG. 4).

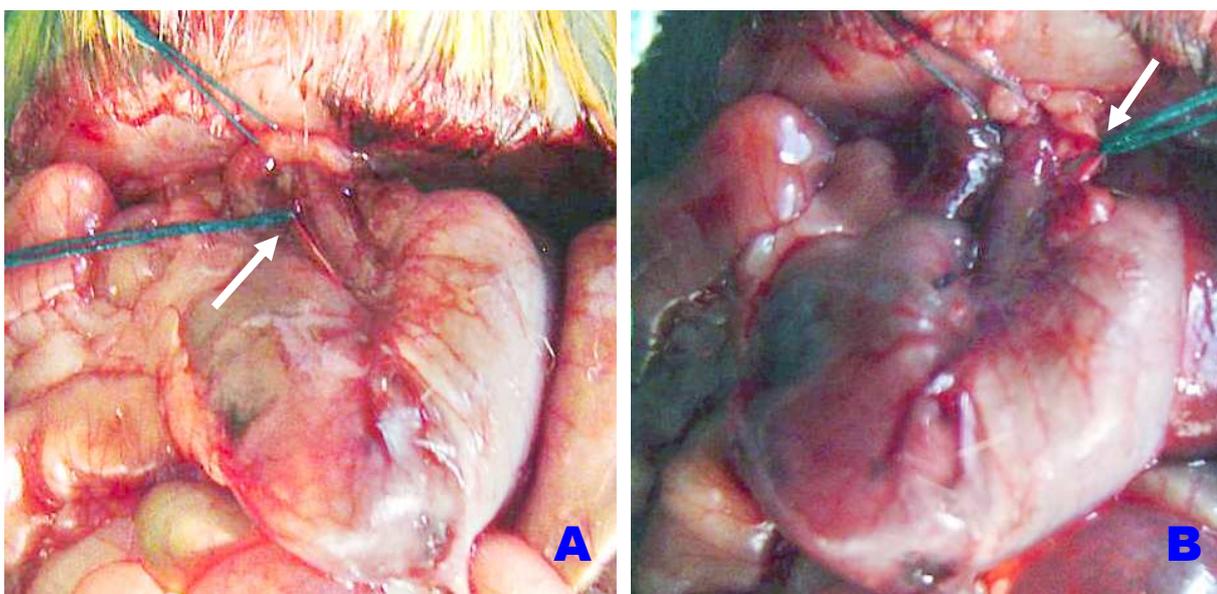


Figura 4: Fotografia digital da cavidade abdominal do gerbil com identificação dos nervos vagos direito (imagem A) e esquerdo (imagem B).

A piloroplastia, semelhante à Heinecke-Miculicz, foi realizada com bisturi de lâmina nº. 11, seccionando-se longitudinalmente o piloro em uma extensão de cerca de 0,5 cm e, em seguida, síntese das camadas sero-muscular no sentido transversal com três a quatro pontos separados de Polipropileno 6-0 (Prolene<sup>®</sup>– Ethicon), conforme procedimentos padronizados em estudo prévio (BARBUTO, 2001) (FIG. 5).

A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos, sendo o primeiro, músculo-aponeurótico e o segundo, pele e subcutâneo, ambos com sutura contínua com fio trançado de ácido poliglicólico nº. 4-0 (Dexon<sup>®</sup>, Davis+Geck). Após a síntese da parede abdominal, a ferida operatória foi limpa com PVPI tópico.

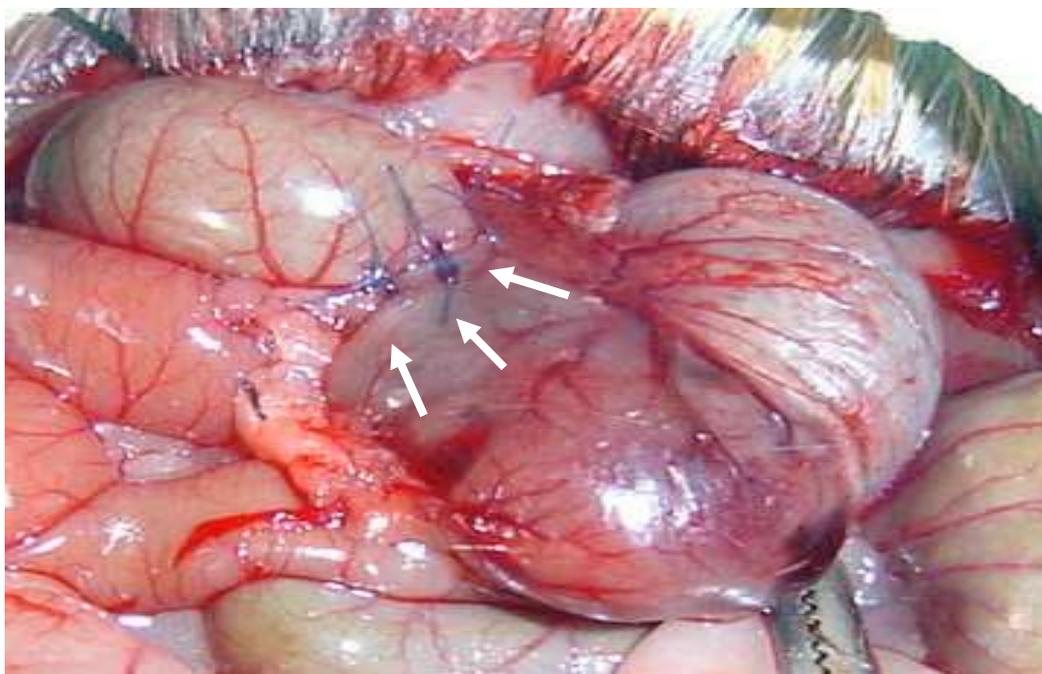


Figura 5: Fotografia digital da cavidade abdominal do gerbil para identificação do local onde foi realizada a piloroplastia à Heinecke-Miculicz (setas).

Nos Grupos A e C foi realizada laparotomia mediana seguida da identificação dos nervos vago direito e esquerdo, identificação do piloro e manipulação das alças intestinais (operação simulada). A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos, seguida da limpeza da ferida operatória com PVPI tópico, de modo semelhante ao grupo anterior.

Todos os animais receberam analgesia nas primeiras 48 horas de pós-operatório mediante administração subcutânea de Cloridrato de Nalbufina (Nubaim<sup>®</sup> - Cristália), na dose de 3mg/kg/dia em três tomadas com intervalo de oito horas. A primeira dose foi feita no peroperatório devido ao efeito anestésico sinérgico.

## 5.7 – COLETA DE SANGUE E MORTE DOS ANIMAIS

Depois do intervalo de 90 dias da operação (vagotomia com piloroplastia ou operação simulada), os animais receberam 0,5 mL de caldo peptonado a 50% através de gavagem oro-esôfago-gástrica. Duas horas depois eles foram anestesiados e submetidos a laparotomia e dissecação do retroperitônio com exposição da veia cava, que foi puncionada para coleta de amostra de 2,5 mL de sangue. O soro obtido desse sangue foi armazenado em tubos de Eppendorf e conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem da gastrina. Em seguida, os animais foram mortos por exsanguinação mediante secção da aorta abdominal.

## 5.8 – OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO GÁSTRICO

Imediatamente depois da morte, o estômago de cada animal foi ressecado, aberto ao longo da curvatura maior e colhidos amostras de tecido gástrico de cerca de 2,0 mm do antro, do corpo gástrico e das zonas transicionais (VAN ZANTEN *et al.*, 1999), que são aquelas zonas juncionais entre diferentes tipos de mucosa (FIG. 6). As alterações macroscópicas e as biopsias realizadas foram anotadas em protocolos próprios (Anexo 2).

Cada um desses fragmentos de tecido gástrico foi armazenado em frasco contendo formalina a 10%, e etiquetados de acordo com a região de onde foram obtidos.

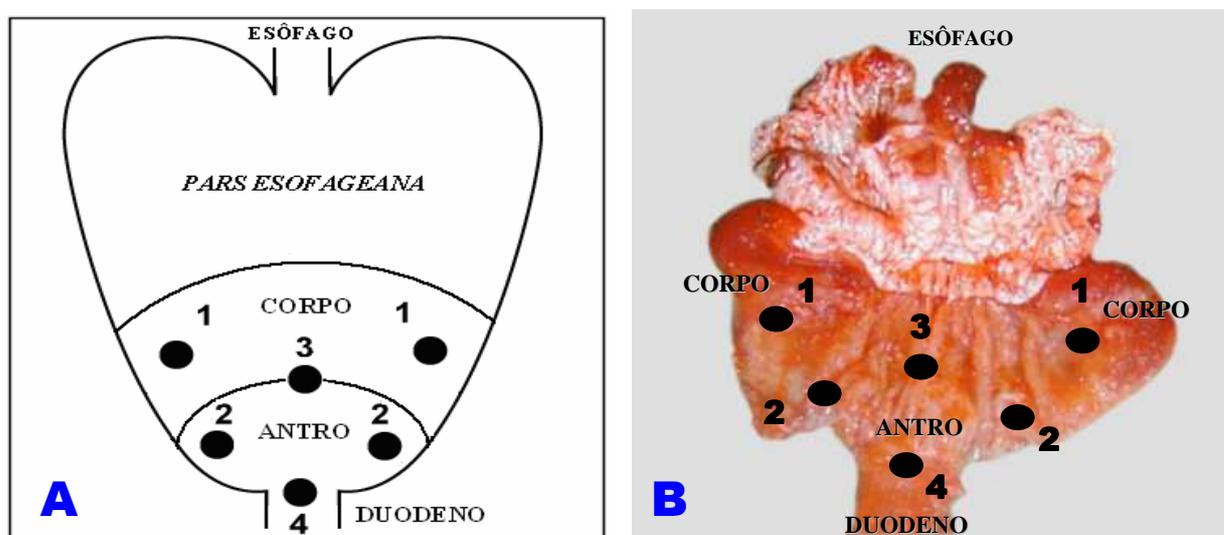


Figura 6 - Desenho esquemático do estômago de gerbil (imagem A\*) mostrando as regiões do estômago (*pars esophageana*, corpo, antro e duodeno) e estômago de gerbil aberto na curvatura maior (imagem B), mostrando os locais de biópsia (1 - Corpo, 2 - Antro, 3 - Transição corpo/antro e 4 - Transição antro/duodeno).

\* Desenho modificado de ALVARES *et al* (2006).

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

### 5.9.1 – Microscopia Direta

Fragments de antro gástrico foram utilizados para confecção de esfregaço em lâmina corados pela carbolfucsina. As lâminas coradas foram examinadas por um único observador em microscópio óptico com aumento de 1000 X. Foram consideradas negativas aquelas lâminas em que não se identificou nenhuma bactéria espiralada. Os resultados foram anotados em protocolo e utilizados para confirmação da infecção bacteriana nos animais infectados e ausência de infecção naqueles não infectados.

### 5.9.2 – Biologia Molecular

O estudo da biologia molecular foi realizado por meio da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) em espécimes do antro e corpo gástricos. O DNA das amostras foi extraído usando o “kit” QIAamp® (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Para controle da extração utilizou-se água destilada. Os sedimentos foram colocados em tubos de microcentrífuga 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 minutos. 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 microcentrífuga 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 -80°C até o uso.

Para a amplificação do gene *ureA* foram usados os iniciadores e as condições descritas previamente por CLAYTON *et al* (1992). O gene DNAr 16S do gênero *Helicobacter* foi amplificado usando os iniciadores C97 e C98 descritos por FOX *et al* (1998). 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 onde 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

## 5.10 – HISTOPATOLOGIA

Após a fixação em formol, fragmentos do antro, corpo e das zonas juncionais (corpo/antro e antro/duodeno) do estômago foram incluídos em parafina. Desse material foram feitos cortes histológicos de 4,0µm para confecção de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina. Essas lâminas foram vistas por um único examinador que desconhecia os grupos aos quais pertencia o material, e avaliou-se as alterações inflamatórias na mucosa do antro, do corpo e das zonas juncionais. As alterações foram expressas como ausente, leve, moderada ou acentuada. Nas lâminas onde houve a presença de inflamação, avaliou-se o tipo de célula inflamatória predominante (mononucleares, polimorfonucleares ou ambas). A observação de folículos linfóides, comum na infecção pelo HP, foi classificada como ausente ou presente. Todos estes dados foram anotados em protocolos (Anexo 3) para posterior avaliação estatística.

## 5.11 – QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS G e D

Empregou-se a técnica imunoistoquímica da Streptavidina-Biotina-Peroxidase modificada (SALES *et al.*, 2004), para verificar a presença das proteínas gastrina e somatostatina na mucosa gástrica (e consequentemente, a identificação das células G e D),

utilizando-se Anticorpos (Ac) policlonais de coelho, NCL-GASp e NCL-SOMATOp (Novacasta Laboratories, Newcastle, Reino Unido), respectivamente. A técnica, resumidamente consiste em: desparafinização, bloqueio da peroxidase endógena, reativação antigênica, incubação dos anticorpos primários, incubação dos anticorpos secundários, formação dos complexos de ligação, revelação, contra-coloração e montagem das lâminas.

Os fragmentos de biópsia obtidos do antro e corpo gástrico foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, submetidos a cortes de 4µm de espessura e montados em lâminas de vidro especiais para imunoistoquímica. O processo imunoistoquímico propriamente dito inicia-se com a desparafinização. Nessa fase as lâminas são mantidas em estufa a 70-80°C por 40 min, imersas em xilol por 15 min e hidratadas através de banhos de álcool etílico de concentrações diferentes (álcool a 100%, 90%, 80% e 70% sucessivamente).

O processo continua com o bloqueio da peroxidase endógena através da imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% por 20 min. Em seguida é feita a reativação antigênica, onde as lâminas são colocadas em uma cuba contendo tampão citrato pré-aquecido (no microondas, em potência alta por 4 min) e depois transferida para o calor úmido em panela a vapor pré-aquecida a 95°C, permanecendo aí por 25 min. A cuba é então retirada da panela e mantida em temperatura ambiente por 40 min e, por fim, as lâminas são imersas em banho de tampão PBS (“phosphate buffer saline”) pH 7,2-7,4 por 5 min.

Depois dessa etapa, inicia-se a incubação dos anticorpos primários, onde são gotejados 50 µl do Ac policlonal de coelho específico para gastrina ou somatostatina, e em seguida as lâminas são incubadas em câmara úmida por 60 min.

Seguindo a incubação dos Ac primários é realizada a incubação com os Ac secundários por 30 min. Os Ac secundários formam um complexo de ligação com as Imunoglobulinas anti-coelho e mamíferos de modo geral. As lâminas são lavadas com PBS, imersas em cuba contendo PBS por 5 min e depois secas, preservando-se o corte histológico, onde é colocada uma gota do Complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase que interage por 30 min. Novamente as lâminas são lavadas com PBS e imersas em cuba contendo PBS por 5 min.

Ao fim dessa etapa é feita a revelação, com gotejamento de 50 µl da solução de 3,3-tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB), preparada momentos antes do uso utilizando-se 1,0 mL do diluente (“DAB chromogen”) para cada gota do DAB substrato. Após a revelação as lâminas são imersas em água corrente. O processo de Revelação deve ser iniciado pelo controle para se observar o padrão da reação e avaliar a coloração ideal.

O processo da imunoistoquímica termina com a contra-coloração, fase na qual as lâminas são lavadas em água corrente por 10 min e a superfície dos cortes histológicos são

contra-corados com Hematoxilina de Harris rapidamente (cerca de 2 min) e novamente lavados em água corrente por aproximadamente 10 min. Por fim, é realizada a desidratação, diafanização e montagem das lâminas. Elas são submetidas a desidratação através de banhos de álcool etílico absoluto (quatro concentrações diferentes por 2 min cada) e diafanização em xilol (dois banhos de 2 min cada). Elas são então mantidas na segunda cuba de xilol até a montagem com lamínula e resina (Entellan<sup>®</sup> - Merck, Darmstadt, Alemanha).

As lâminas coradas pela imunohistoquímica foram avaliadas por um único observador que desconhecia o grupo ao qual pertencia o material, e que pesquisou a presença de células produtoras de gastrina (G) e de somatostatina (D). Somente os cortes histológicos que apresentavam a mucosa intacta (todo o tecido entre a superfície e a muscular da mucosa) foram estudados (FIG. 7).

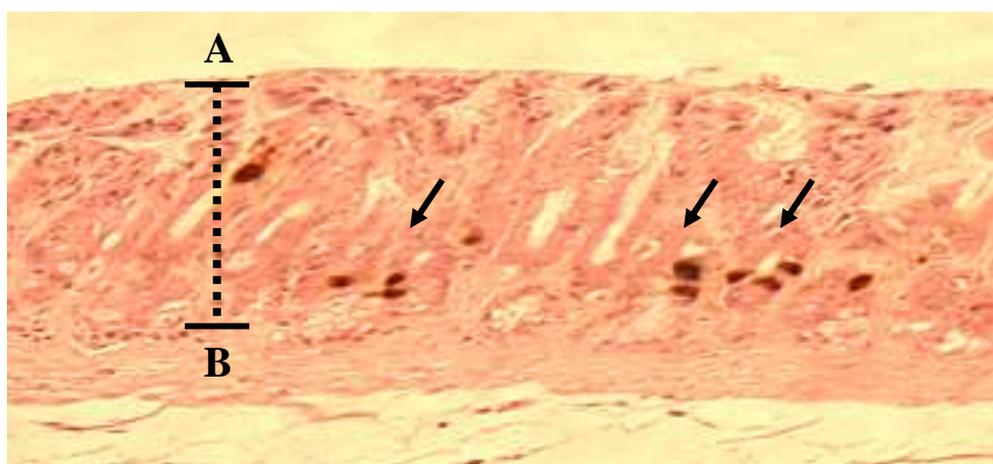


Figura 7: Fotografia digital de corte histológico de tecido antral de gerbil analisado por microscopia óptica (aumento: ocular 10x, objetiva 40x) corado por técnica de imunohistoquímica (Streptavidina-Biotina-Peroxidase modificada) para identificação de células produtoras de somatostatina (células D). A linha tracejada mostra a área de mucosa avaliada, compreendida entre a superfície (A) e a muscular da mucosa (B). Por esta técnica as células D (setas) adquirem coloração acastanhada.

Pesquisou-se células G e D em pelo menos cinco campos, em dois a três cortes diferentes do tecido antral, utilizando-se a ocular 10x e a objetiva 40x do microscópio (GRAHAM *et al.*, 1993; QUEIROZ *et al.*, 1994) (Apêndices 1 e 2). O número de células por área (mm) foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Número de células/mm} = \frac{\text{Número total de Células}}{\text{Número de campos avaliados} \times 0,25\text{mm}^*}$$

\*Área do campo do microscópio

## 5.12 – DOSAGEM DA GASTRINA

As amostras de soro armazenadas foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas e, em seguida, imersas em banho de gelo. A gastrina pós-prandial foi dosada pela técnica de quimioluminescência, utilizando-se o “kit” IMMULITE 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, Estados Unidos da América), de acordo com as especificações do fabricante.

A gastrina apresenta uma série de formas moleculares que se distinguem pelo comprimento da estrutura central do polipeptídeo e em derivados de aminoácidos individuais. As três formas principais – G-17, G-34 e G-14 – são classificadas de acordo com o número de aminoácidos que contém. A técnica utilizada neste estudo reconhece predominantemente o G-17, seguida pelo G-34 e, em menor escala o G-14.

O “IMMULITE 2000” é um ensaio imunométrico marcado com enzima quimioluminescente, que utiliza anticorpos (Ac) monoclonais marcados com ligante, anticorpos específicos de captura de gastrina e separação por fase sólida coberta com anticorpos anti-ligantes. Nesta técnica, o Ac monoclonal anti-gastrina marcado com ligante, o Ac policlonal anti-gastrina de coelho conjugado à fosfatase alcalina e o Ac monoclonal murino anti-gastrina conjugado à fosfatase alcalina são adicionados ao soro que se quer dosar e incubados simultaneamente na presença do anti-ligante, dentro do tubo de reação. Após 60 min de incubação, as moléculas de gastrina da amostra formam um complexo com o Ac, que por sua vez, se liga ao anti-ligante da fase sólida. O conjugado não ligado é então removido por centrifugação e, em seguida, o substrato luminogênico é adicionado ao tubo de reação e incubado por mais 5 minutos. O substrato quimioluminescente, um ester fostato do adamantil dioxetano, é hidrolisado na presença da fosfatase alcalina, gerando um intermediário instável. A produção contínua desse intermediário resulta numa emissão sustentada de luz. O complexo ligado, assim como a emissão de fótons medida pelo luminômetro é proporcional a concentração de gastrina da amostra, que é então mensurada.

## 5.13 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A identificação do HP nas lâminas do antro coradas pela carbolfucsina e analisadas por microscopia óptica foi classificada como positiva ou negativa e comparada

entre os grupos pelo teste exato de Fisher, e as diferenças consideradas significativas para 5% ( $p < 0,05$ ).

A identificação do HP no antro e corpo por Biologia Molecular (PCR) foi classificada como positiva ou negativa e comparada entre os grupos através do teste exato de Fisher, sendo consideradas significativas diferenças para 5% ( $p < 0,05$ ).

As alterações histopatológicas, os dados referentes à presença ou ausência de inflamação, quantificação da inflamação (leve, moderada ou acentuada), tipo de célula inflamatória presente (mononuclear, polimorfonuclear ou ambas) e presença ou ausência de agregados linfóides no corpo, junção corpo-antro, antro e junção antro-duodeno, foram comparados entre os grupos através do teste exato de Fisher, e as diferenças consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

A densidade das células G e D no antro foi comparada entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis, e as diferenças consideradas significativas para 5% ( $p < 0,05$ ).

A dosagem de gastrina sérica pós-prandial foram comparados entre os grupos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e as diferenças consideradas significativas para 5% ( $p < 0,05$ ).

## **6 RESULTADOS**

## 6.1– IDENTIFICAÇÃO DO *Helicobacter pylori*

A positividade da infecção foi confirmada pela identificação do HP por microscopia direta e estudo de biologia molecular (Tabela 1).

### 6.1.1– Microscopia Direta

As biopsias do antro coradas pela carbolfucsina foram avaliadas por um único observador. Todas as lâminas dos animais infectados (grupos C e D) foram positivas para a presença do HP (FIG. 8). Não foi identificada nenhuma bactéria nas lâminas dos animais não infectados (grupos A e B).

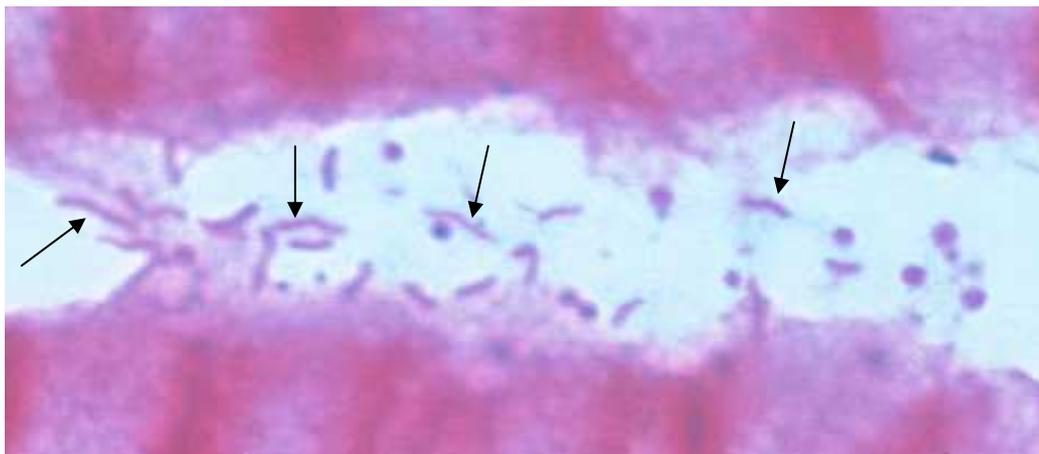


Figura 8: Fotografia digital ampliada de microscopia óptica de corte histológico do antro gástrico infectado pelo HP (setas). Coloração: Carbolfucsina. Aumento: 1000 x.

Houve diferença significativa quando comparados os animais não infectados e não operados (Grupo A) em relação aos animais infectados e não operados (Grupo C,  $p=0,0000015$ ) e aos animais não infectados e operados (Grupo B) em relação aos animais infectados e operados (Grupo D,  $p=0,00000019$ ). Não houve diferença entre os animais não infectados, não operados (Grupo A) ou operados (Grupo B,  $p=1,0$ ) e entre os animais infectados, não operados (Grupo C) ou operados (Grupo D,  $p=1,0$ ).

## 6.1.2 – Biologia Molecular

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

### 6.1.2.1 – PCR do antro gástrico

Houve diferença significativa quando comparada a PCR do antro dos animais não infectados e não operados (Grupo A) em relação aos animais infectados e não operados (Grupo C,  $p=0,0000015$ ) e aos animais não infectados e operados (Grupo B) em relação aos animais infectados e operados (Grupo D,  $p=0,00000019$ ). Não houve diferença entre os animais não infectados, não operados (Grupo A) ou operados (Grupo B,  $p=1,0$ ) e entre os animais infectados, não operados (Grupo C) ou operados (Grupo D,  $p=1,0$ ).

Tabela 1 – Identificação do *Helicobacter pylori* no antro gástrico (microscopia direta e PCR) e no corpo gástrico (PCR) de gerbis

<i>Parâmetro</i>	<i>A</i> ( <i>n=10</i> )		<i>B</i> ( <i>n=14</i> )		<i>C</i> ( <i>n=12</i> )		<i>D</i> ( <i>n=17</i> )		<i>p</i>
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Microscopia Direta do antro (carbolfucsina)	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	12 <sup>a</sup>	100	17 <sup>b</sup>	100	a 0,0000015 b 0,00000019
PCR do antro	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	12 <sup>a</sup>	100	17 <sup>b</sup>	100	a 0,0000015 b 0,00000019
<b>PCR do corpo</b>	0 <sup>a</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	12 <sup>a</sup>	100	17 <sup>b</sup>	100	a 0,0000015 b 0,00000019

### 6.1.2.2 – PCR do corpo gástrico

Houve diferença significativa quando comparada a PCR do corpo gástrico dos animais não infectados e não operados (Grupo A) em relação aos animais infectados e não

operados (Grupo C,  $p=0,0000015$ ) e aos animais não infectados e operados (Grupo B) em relação aos animais infectados e operados (Grupo D,  $p=0,0000019$ ). Não houve diferença entre os animais não infectados, não operados (Grupo A) ou operados (Grupo B,  $p=1,0$ ) e entre os animais infectados, não operados (Grupo C) ou operados (Grupo D,  $p=1,0$ ).

## 6.2 – HISTOLOGIA

### 6.2.1 – Infiltrado inflamatório

Na análise do infiltrado inflamatório do antro, dois resultados do Grupo D foram desconsiderados, pois a biópsia não correspondia ao tecido antral. O mesmo ocorreu na análise do infiltrado inflamatório da junção corpo-antro de outro animal do Grupo D, pois o tecido da biópsia compreendia apenas material do corpo.

No corpo, observou-se a presença de infiltrado inflamatório somente em três dos 17 animais avaliados no Grupo D (17,6%). Nos animais dos demais grupos não houve inflamação. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos (Tabela 2).

Na junção corpo-antro, observou-se a presença de infiltrado inflamatório em um animal do Grupo C (8,3%) e em seis animais do Grupo D (41,7%). Não havia inflamação em nenhum animal dos grupos A (0%) e B (0%). Houve diferença significativa quando comparados os Grupos B e D ( $p=0,018$ ) e os Grupos C e D ( $p=0,018$ ).

No antro, observou-se a presença de infiltrado inflamatório em dois animais do Grupo B (14,3%), cinco animais do Grupo C (41,7%) e oito animais do Grupo D (53,3%). Não havia inflamação em nenhum animal do grupo A. Houve diferença estatística quando comparados os Grupos A e C ( $p=0,039$ ) e os Grupos B e D ( $p=0,05$ ).

Na junção antro-duodenal, observou-se a presença de infiltrado inflamatório em quatro animais do Grupo B (28,6%), três animais do Grupo C (25,0%) e 13 animais do Grupo D (76,5%). Não havia inflamação em nenhum animal do grupo A (0%). Houve diferença significativa quando comparados os Grupos B e D, com  $p=0,021$  e os Grupos C e D, com  $p=0,017$  (Gráfico 1).

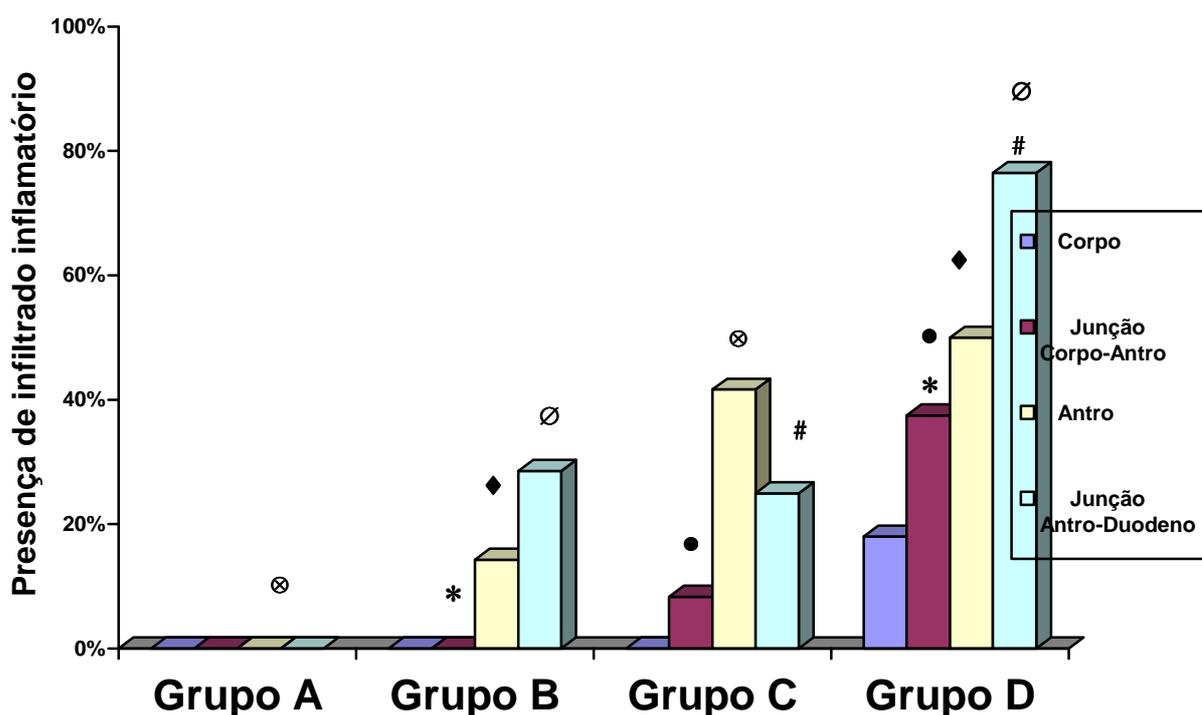


Gráfico 1 – Presença de infiltrado inflamatório no corpo, junção corpo-antro, antro e junção antro-duodeno do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidos ou não à vagotomia com piloro-plastia.

● p=0,018 \* p=0,018 ⊗ p=0,039 ◆ p=0,05 ∅ p=0,021 # p=0,017

Tabela 2 – Presença de infiltrado inflamatório no corpo, junção corpo- antro, antro e junção antro-duodeno do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidos ou não a vagotomia com piloro-plastia.

Infiltrado Inflamatório	Grupo A (n=10)		Grupo B (n=14)		Grupo C (n=12)		Grupo D* (n=17)		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Corpo	0	0	0	0	0	0	3	17,6	ns
Junção corpo-antro	0	0	0 <sup>a</sup>	0	1 <sup>b</sup>	8,3	6 <sup>a, b</sup>	41,7	a = 0,018 b = 0,018
Antro	0 <sup>c</sup>	0	2 <sup>d</sup>	14,3	5 <sup>c</sup>	41,7	8 <sup>d</sup>	53,3	c = 0,039 d = 0,050
Junção antro-duodeno	0	0	4 <sup>e</sup>	28,6	3 <sup>f</sup>	25	13 <sup>e, f</sup>	76,5	e = 0,021 f = 0,018

\* Um resultado da análise da biópsia da junção corpo-antro e dois resultados da análise da biópsia do antro foram descartados, ficando o grupo com n=16 e n=15, respectivamente, na análise desses parâmetros.

#### 6.2.1.1 – Grau da Inflamação

No corpo, a inflamação foi classificada como leve em todos os três animais do grupo D.

Na junção corpo-antro, o infiltrado inflamatório foi classificado como leve no único animal Grupo C que apresentou inflamação e em todos os seis animais do Grupo D que apresentaram inflamação. Os demais grupos não apresentaram inflamação. Não Houve diferença significativa quando comparados os grupos.

Naqueles animais que apresentaram infiltrado inflamatório no antro, a inflamação foi classificada como leve nos dois animais do Grupo B, nos cinco animais do Grupo C e nos oito animais do Grupo D.

Na junção antro-duodenal, naqueles animais onde houve inflamação, ela foi classificada em leve nos quatro animais do Grupo B (100,0%) e nos três animais do Grupo C (100,0%). No Grupo D, dos 13 animais que apresentaram infiltrado inflamatório, a inflamação foi classificada como leve em dez animais (76,9%) e moderada em três animais (23,1%). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos.

#### 6.2.1.2 – Tipo de Infiltrado Inflamatório predominante

No corpo, observou-se o predomínio de infiltrado mononuclear em todos os três animais do Grupo D que apresentaram inflamação.

Na junção corpo-antro, observou-se predomínio de infiltrado mononuclear no único animal do Grupo C que apresentou inflamação e, naqueles seis animais do Grupo D que apresentaram inflamação, em três houve predomínio de mononucleares e nos outros três predominou o infiltrado misto (mononuclear e polimorfonuclear).

No antro, nos dois animais do Grupo B que apresentavam inflamação houve predomínio de infiltrado inflamatório misto. No Grupo C, quatro animais apresentavam predomínio de células mononucleares e um, infiltrado misto. No Grupo D, um animal apresentou infiltrado polimorfonuclear; cinco animais, infiltrado mononuclear e dois animais, infiltrado misto.

Na junção antro-duodenal, naqueles quatro animais do Grupo B que apresentaram infiltrado inflamatório, em um houve predomínio de mononucleares e três apresentaram infiltrado misto; no Grupo C todos os três animais apresentaram predomínio de

mononucleares e no Grupo D, do total de 13 animais com inflamação, um animal apresentou predomínio de polimorfonucleares e em 12 animais predominou o infiltrado mononuclear. Houve diferença significativa quando comparados os Grupos B e D, com  $p=0,0026$ .

### **6.2.2 – Presença de Agregados Linfóides**

No corpo, observou-se a presença de agregados linfóides em dois animais do Grupo D. Nos demais grupos, não havia agregados linfóides.

Na junção corpo-antro não se observou a presença de agregados linfóides em nenhum Grupo estudado.

No antro, observou-se a presença de agregados linfóides em dois animais do Grupo B. Nos demais grupos, não havia agregados linfóides.

Na junção antro-duodenal, observou-se a presença de agregados linfóides em apenas três animais do Grupo D. Nos demais grupos, não havia agregados linfóides.

Não houve diferença significativa quando comparados os grupos.

## **6.3 – IMUNOISTOQUÍMICA**

### **6.3.1 – Densidade de células G do antro**

Alguns animais não preencheram o protocolo para avaliação da presença de células G devido a descontinuidade da mucosa ou a impossibilidade de avaliação do número adequado de cortes histológicos ou de campos microscópicos. Devido a isso, três resultados do Grupo B (lâminas 7, 8 e 11) e um resultado do Grupo D (lâmina 135) foram descartados, sendo a análise da densidade de Células G do antro realizada em dez animais do grupo A, 11 animais do Grupo B, dez animais do Grupo C e 16 animais do Grupo D.

A mediana da densidade de células G do antro foi de 9,3 células/mm (4,9 células/mm a 19,3 células/mm) nos animais do Grupo A, 10,8 células/mm (3,9 células/mm a 15,8 células/mm) no Grupo B, 29,9 células/mm (15,3 células/mm a 48,0 células/mm) no grupo C e 21,4 células/mm (5,5 células/mm a 76,4 células/mm) no grupo D (Tabela 3).

Houve aumento significativo na densidade de células G dos animais infectados e não operados (Grupo C) quando comparados àqueles não infectados e não operados (Grupo A), com  $p=0,0001$  e nos animais infectados e operados (Grupo D) quando comparados àqueles não infectados e operados (Grupo B), com  $p=0,007$ . Não houve diferença entre os animais não infectados, não operados (Grupo A) ou operados (Grupo B),  $p=0,57$  e entre os animais infectados, não operados (Grupo C) ou operados (Grupo D),  $p=0,48$  (Gráfico 2).

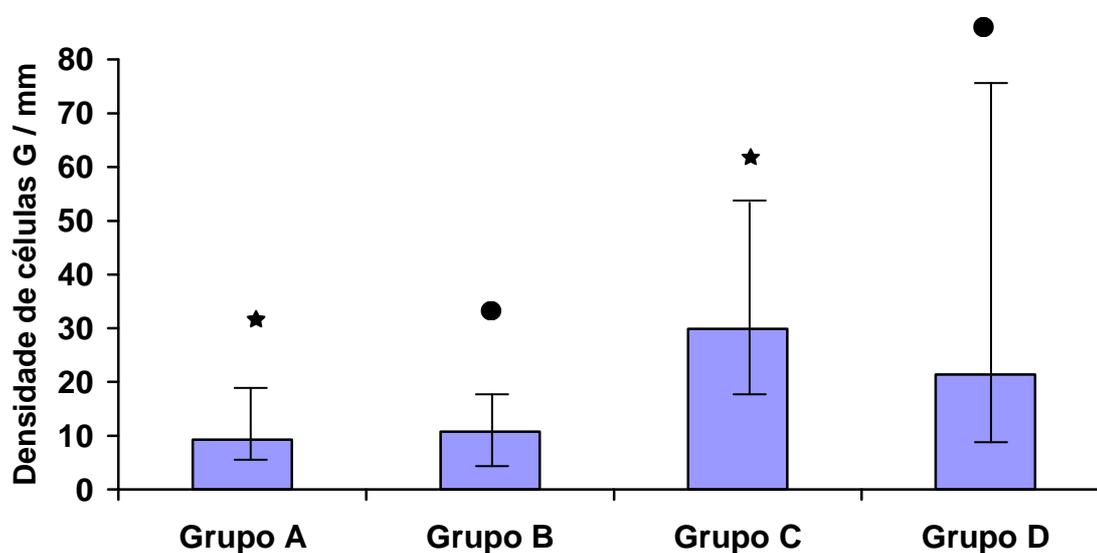


Gráfico 2 – Densidade de células produtoras de gastrina (células G) do antro de gerbis infectados ou não pelo *Helicobacter pylori* e submetidos ou não à vagotomia com piloroplastia. ★  $p=0.0001$  ●  $p=0.007$

### 6.3.2 – Densidade de células D do antro

Por motivo semelhante ao ocorrido na análise das células G, seis animais foram descartados na análise das células D; dois animais do Grupo A (lâminas 17 e 19), dois animais do Grupo B (lâminas 07 e 11) e dois animais do Grupo D (lâminas 135 e 140); ficando o Grupo A com  $n=8$ , o Grupo B com  $n=12$ , o Grupo C com  $n=12$  e o Grupo D com  $n=15$ .

A mediana da densidade de células D do antro foi de 4,3 células/mm (3,4 células/mm a 8,7 células/mm) nos animais do Grupo A, 5,4 células/mm (3,0 células/mm a 6,4 células/mm) no Grupo B, 8,6 células/mm (5,8 células/mm a 14,9 células/mm) no Grupo C e

6,7 células/mm (2,5 células/mm a 20,7 células/mm) no Grupo D (Tabela 3). Houve aumento significativo na densidade de células D nos animais infectados e não operados (Grupo C,  $p=0,001$ ) quando comparados àqueles não infectados e não operados (Grupo A) e um aumento, com forte tendência à diferença, quando comparados os animais infectados e operados (Grupo D,  $p=0,056$ ) àqueles não infectados e operados (Grupo B). Não houve diferença quando comparados os Grupos A e B ( $p=0,35$ ) e os Grupos C e D ( $p=0,12$ ) (Gráfico 3).

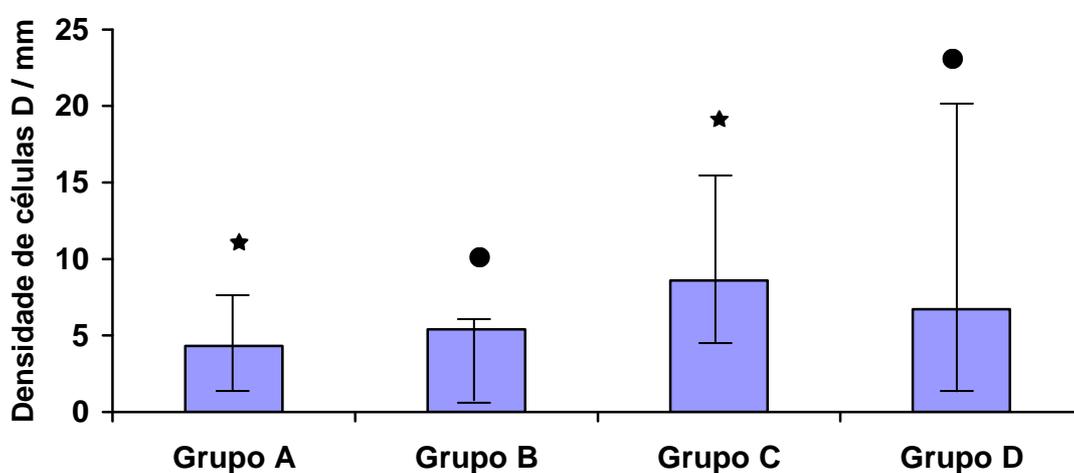


Gráfico 3 – Densidade de células produtoras de somatostatina (células D) do antro de gerbis infectados ou não pelo *Helicobacter pylori* e submetidos ou não à vagotomia com piloroplastia. ★  $p=0,001$  ●  $p=0,056$

### 6.3.3 – Relação células G/D

Nos animais onde foi possível a contagem tanto das células G quanto das células D, a relação G/D foi analisada (Apêndice 3). A relação G/D foi obtida em oito animais do Grupo A, 11 animais do Grupo B, 12 animais do Grupo C e 15 animais do Grupo D. A mediana da relação células G/D do antro foi de 2,30:1 (1,01:1 a 2,85:1) no Grupo A, 1,61:1 (1,26:1 a 3,22:1) no Grupo B, 2,98:1 (2,22:1 a 5,26:1) no Grupo C e 3,33:1 (1:1 a 7,14:1) no Grupo D (Tabela 3). Houve aumento significativo na relação G/D quando comparados os animais infectados e não operados (Grupo C) àqueles não infectados e não operados (Grupo

A,  $p=0,013$ ) e forte tendência ao aumento, quando comparados os animais infectados e operados (Grupo D) àqueles não infectados e operados (Grupo B,  $p=0,057$ ) (Gráfico 4).

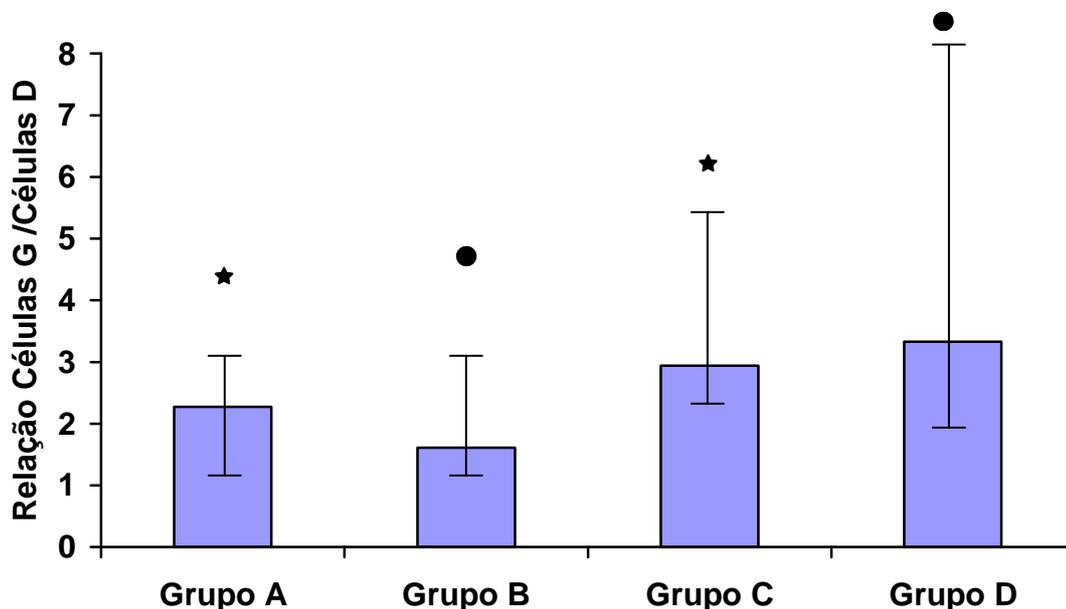


Gráfico 4 – Relação entre as células produtoras de gastrina (células G) e células produtoras de somatostatina (células D) do antro de gerbis infectados ou não pelo *Helicobacter pylori* e submetidos ou não à vagotomia com piloroplastia. ★  $p=0,013$  ●  $p=0,057$

Tabela 3 – Densidade das células produtoras de gastrina (células G) e de somatostatina (células D) e relação das células G/D do antro do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidos ou não a vagotomia com piloroplastia

GRUPO	A		B		C		D		P
	n	$\bar{M}$ (mínimo) (máximo)	n	$\bar{M}$ (mínimo) (máximo)	n	$\bar{M}$ (mínimo) (máximo)	n	$\bar{M}$ (mínimo) (máximo)	
Densidade das células G do antro (células/mm)	10	9,3 <sup>a</sup> (4,9) (19,3)	11	10,8 <sup>b</sup> (3,9) (15,8)	12	29,9 <sup>a</sup> (15,3) (48,0)	16	21,4 <sup>b</sup> (5,5) (76,4)	a=0,0001 b=0,007
Densidade das células D do antro (células/mm)	8	4,3 <sup>c</sup> (3,4) (8,7)	12	5,4 <sup>d</sup> (3,0) (6,4)	12	8,6 <sup>c</sup> (5,8) (14,9)	15	6,7 <sup>d</sup> (2,5) (20,7)	c=0,01 d=0,056
Relação das células G / D no antro	8	2,30:1 <sup>e</sup> (1,01:1) (2,85:1)	11	1,61:1 <sup>f</sup> (1,26:1) (3,22:1)	12	2,98:1 <sup>e</sup> (2,22:1) (5,26:1)	15	3,33:1 <sup>f</sup> (1:1) (7,14:1)	e=0,013 f=0,057

#### 6.4 – GASTRINEMIA PÓS-PRANDIAL

A gastrina sérica pós-prandial foi dosada em duplicata em todas as amostras dos quatro grupos estudados, exceto em dois animais do grupo D (amostras Mic-125 e Mic-141), devido a escassez de plasma obtido. Sendo assim, as dosagens de gastrina sérica desses dois animais foram desconsideradas, ficando o Grupo A com n=10, o Grupo B com n=14, o Grupo C com n=12 e o Grupo D com n=15.

A capacidade mínima de detecção de gastrina pela técnica de quimioluminescência é de 5,0 pg/mL. Portanto, todos os valores menores que 5,0 pg/mL foram considerados como 4,0 pg/mL para efeito de estudo estatístico (Apêndice 4).

A mediana da dosagem da gastrina sérica pós-prandial foi de 41,5 pg/mL (4,0 pg/mL a 131,0 pg/mL) no grupo A, 11,6 pg/mL (4,0 pg/mL a 117,0 pg/mL) no grupo B, 10,5 pg/mL (4,0 pg/mL a 41,1 pg/mL) no grupo C e 6,5 pg/mL (4,0 pg/mL a 45,5 pg/mL) no grupo D.

Não houve diferença na gastrinemia entre os animais infectados e operados (Grupo D) em relação aos não infectados e operados (Grupo B, p=0,11) e àqueles infectados e não operados (Grupo C, p=0,28). Não foi observada também, diferença significativa quando comparada a gastrinemia dos animais do grupo controle (Grupo A) com os não infectados e operados (Grupo B, p=0,31) e àqueles infectados e não operados (Grupo C, p=0,079) (Gráfico 5).

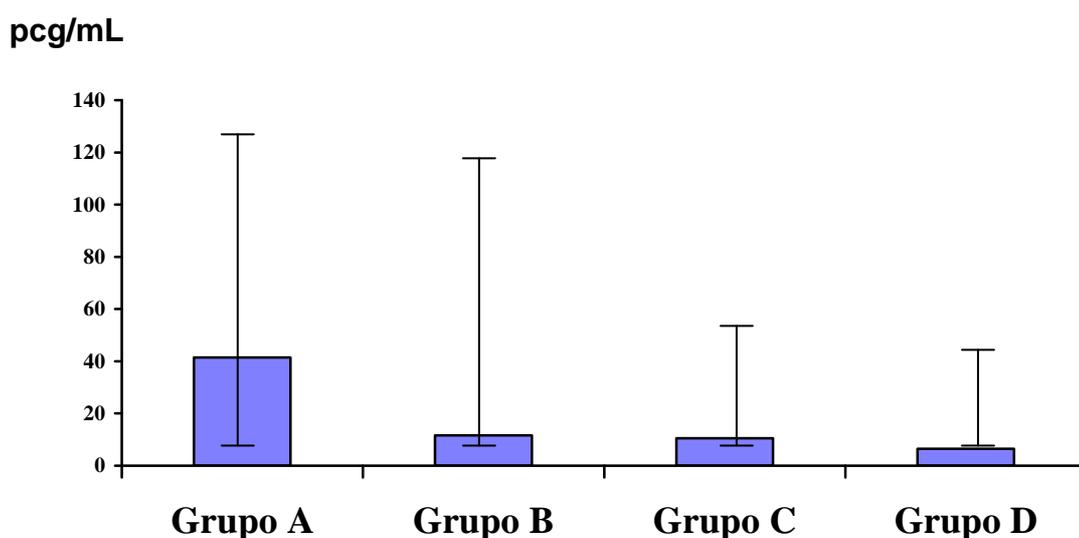


Gráfico 5 – Mediana da dosagem da gastrina sérica pós-prandial de gerbis infectados ou não com o *Helicobacter pylori* e submetidos ou não a vagotomia com piloro-plastia. p=n.s.

## **7 DISCUSSÃO**

A infecção gástrica por bactérias espiraladas desencadeia alterações fisiopatológicas que estão associadas com doenças como dispepsia, ulcera péptica (UP) e câncer gástrico. Porém, os substratos fisiológicos e histológicos desta relação ainda não estão totalmente elucidados.

O HP coloniza o epitélio gástrico humano, vivendo dentro da camada de muco em contato íntimo com a superfície epitelial, a 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 a liberação de mediadores pró-inflamatórios derivados dessas células epiteliais (quimiocinas como interleucina-8 e fator de recrutamento e ativação de neutrófilos). Em um segundo momento, os produtos derivados da infecção podem atingir a mucosa, estimulando assim, diretamente, respostas imunes específicas ou inespecíficas do hospedeiro e causando a liberação de uma variedade de citocinas (fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucinas 1 e 6). A superfície celular danificada produz alterações na permeabilidade da mucosa e maior exposição aos antígenos. A aderência do microorganismo às células da mucosa gástrica é acompanhada de perda das microvilosidades, irregularidades nas bordas luminais e nas trocas intracelulares, incluindo perda do citoplasma, edema e vacuolização. Outro fator importante no dano celular são as enzimas por ele produzidas, sendo a urease a mais importante. A urease produz amônia, que além de proteger o HP do ácido gástrico, tem graves efeitos tóxicos sobre a mucosa (BLASER *et al.*, 1992; BODGER & CRABTREE, 1998) .

Dentre as afecções associadas ao HP a UP é a mais prevalente na população geral e foi, durante vários anos, tratada através de método operatório, até que o tratamento clínico se impôs, com melhores resultados por não alterar a fisiologia gástrica como ocorre nas cirurgias comumente realizadas para tratamento da UP. Dessas cirurgias, a mais realizada era a denervação do antro, através da vagotomia, acompanhada da drenagem do estômago com uma piloroplastia. Essa cirurgia não é isenta de complicações, estando associada a alterações hormonais e motoras gástricas, que poderiam explicar complicações pós-operatórias como atonia gástrica e diarreia (BRAASCH & BROOKE-COWDEN, 1976). Outras alterações vistas após essa cirurgia são a hipergastrinemia e o refluxo duodenogástrico.

Nos pacientes operados por esta técnica, não era habitual a erradicação do HP. Se tomarmos como fato que a maioria dos pacientes submetidos a vagotomia com piloroplastia estejam colonizados com o HP, a ocorrência das duas situações poderia resultar em afecções

clínicas decorrentes de alterações histológicas, motoras e hormonais que, em longo prazo, comprometessem o estado de saúde do indivíduo.

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 são o modelo experimental ideal para estudo da úlcera péptica, pois a evolução da doença pode ser acompanhada por endoscopia e as respostas histopatológicas e hormonais são semelhantes às aquelas observadas em seres humanos (DUBOIS *et al.*, 1994). 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* (DRAZEK *et al.*, 1994).

Os primeiros modelos experimentais bem sucedidos na infecção pelo HP foram porcos gnotobióticos, onde se identificaram vários fatores bacterianos responsáveis por sua virulência (KRAKOWKA *et al.*, 1987; LAMBERT *et al.*, 1987). 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 (LEE, 1998).

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 (LEE, 1998). 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 (LEE, 1998).

O camundongo seria outro modelo experimental bastante 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 digestivo com seres humanos (LEE, 1998). Entretanto, a dificuldade de infectar camundongos convencionais com amostras bacterianas isoladas de seres humanos restringe o uso desses roedores (CANTORNA & BALISH, 1990). 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*, bactéria que infecta naturalmente suínos com úlcera gástrica. Nesse modelo, os animais infectados desenvolvem um infiltrado inflamatório de células mononucleares, alguns neutrófilos e poucos eosinófilos,

principalmente no terço inferior da mucosa antral e oxíntica, e a infecção permanece por longo período, semelhante ao que ocorre em seres humanos (MOURA *et al.*, 1993). 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.

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 (LEE *et al.*, 1997). Atualmente o gerbil é atualmente o animal mais utilizado no estudo da interação microorganismo-hospedeiro e respostas terapêuticas ao HP.

O gerbil (*Meriones unguiculatus*) é um roedor de hábitos diurnos, ventre branco, pelagem variando entre o cinza ao marrom escuro ou preto e cauda peluda, que geralmente termina em tufo de pêlos (FIG.1). É originário da Mongólia, e encontra-se distribuído naturalmente por toda a Ásia Central, Oriente Médio, noroeste da Índia e norte da África, onde habitam savanas, estepes, desertos quentes e regiões semi-áridas. O animal adulto mede entre 15 cm e 30 cm (incluindo a cauda, que representa metade do seu comprimento), pesa entre 70g a 100 g e atinge sua maturidade sexual entre 10 a 12 semanas de vida, que se estende até 18 a 24 meses. São animais monogâmicos, que vivem em pequenas comunidades e, apesar de sociáveis, devem se conhecer desde jovens, pois não toleram indivíduos estranhos. (CCAC, 1984)

A espécie é conhecida desde o início do século XIX, sendo catalogada em 1867 por Edwards (1867) e criada em cativeiro a partir de 1930 pelo zoologista japonês C. Kasugo e pelo Kitasato Institute, responsável por toda a linhagem utilizada atualmente como animal de estimação e experimentação. Na América, tem sido utilizado em pesquisa desde 1954 quando o Dr. Victor Schwentker, um dos pioneiros do uso de modelos animais em experimentação (WOLFLE, 2003), importou alguns exemplares da linhagem japonesa e iniciou reprodução na fazenda Tumblebrook, em Brant Lake, New York.

Anatomicamente, o estômago do gerbil apresenta a divisão convencional do estômago de mamíferos: cárdia, fundo, corpo e antro (KAPUR, 1982). É constituído por uma parte não-glandular formada pela 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 a curvatura maior e a curvatura 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 túnica muscular por uma camada circular interna espessa e uma camada longitudinal externa mais delgada, com células ganglionares entre elas; a túnica serosa é fina (GHOSHAL & BAL, 1989). 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 e são inervadas por fibras vagais. De modo semelhante às células G, têm forma poliédrica e apresentam numerosos microfilamentos que se organizam em forma de trouxa (KAPUR, 1982).

Os gerbis apresentam pH gástrico similar ao de seres humanos, com valores basais médios em torno de 1,4 (SCOTT *et al.*, 2007). Quando infectados pelo HP desenvolvem duodenite, metaplasia gástrica e úlceras duodenais, sendo assim um bom modelo animal para estudar o agente etiológico, de acordo com os requisitos postulados por Koch (OHKUSA *et al.*, 2003). Além disso, esse modelo tem despertado especial interesse devido à facilidade no desenvolvimento de neoplasia gástrica.

Logo após a inoculação intragástrica do HP, a bactéria migra através da camada de muco, aderindo-se intimamente ao epitélio do corpo e antro e iniciando a produção de urease, que leva à criação de um meio ideal para o estabelecimento de colonização vigorosa. Inicialmente, há poucas mudanças macroscópicas na mucosa, que são notados apenas no segundo mês, especialmente na junção antro-pilórica. Entretanto, quando estudado por meio de microscopia intravital, vários eventos fisiopatológicos já são observados na rede microvascular. No terceiro mês podem ser notadas lesões erosivas no antro, recobertas por tecido necrótico, associadas a esfoliação de células mucosas e estagnação do fluxo sanguíneo microvascular. Histologicamente, são notados grande número de leucócitos, principalmente na submucosa gástrica. Depois do quinto mês de infecção, às lesões erosivas se expandem para outras áreas e há aumento da esfoliação causado por apoptose. Os leucócitos, antes na submucosa, emergem pela mucosa desencadeando as respostas humorais. Um grande infiltrado inflamatório associado à presença de folículos linfóides na submucosa é observado especialmente na zona de transição antro-corpo. Logo após a infecção, os animais apresentam

diminuição da secreção ácida gástrica, acompanhada da elevação da gastrina sérica e da diminuição dos níveis de somatostatina no suco gástrico, semelhante ao observado na infecção em seres humanos. Essas alterações têm sido associadas tanto ao aumento dos fatores de supressão ácida, como os lipossacárides, quanto às citocinas inflamatórias, especialmente IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (BRZOZOWSKI *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2003).

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, tem tornado a infecção do gerbil pelo HP o modelo mais utilizado pelos pesquisadores no estudo da úlcera péptica.

As alterações na fisiologia gástrica induzidas pela infecção são, em última análise, 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.

NAKAGAWA *et al* (2005) ao infectar gerbis de quatro semanas de idade com uma cepa cagA e vacA obtida de material de biopsia de paciente com úlcera gástrica e duodenal, observou após dois meses de infecção a presença de infiltrado de neutrófilos e linfócitos, hiperplasia regenerativa do epitélio da lâmina própria da mucosa, além de alguns folículos linfóides, sendo que, no período entre três e seis meses alguns animais (dois em sete) apresentaram algum grau de metaplasia. Apesar disso, concluiu que, do ponto de vista da gravidade da infecção, não há diferença histopatológica no período entre dois e seis meses. Segundo OHKUSA *et al* (2003), a presença das lesões gástricas não tem relação com a idade do animal, enquanto que as lesões duodenais estão relacionadas aos animais mais velhos. Ao final de 12 meses ele observou que animais infectados com cinco e quatorze semanas de idade apresentavam lesões gástricas, mas somente alguns dos últimos desenvolviam úlceras duodenais.

Outro estudo realizado por OHNITA *et al* (2005) utilizando animais infectados por cepa contendo Cag PAI ou pela mesma cepa sem expressão do Cag PAI, demonstrou que os animais do primeiro grupo apresentavam lesões erosivas no antro associadas a sangramento a partir da oitava semana. Já nos animais sem expressão de Cag PAI, as alterações inflamatórias macroscópicas não foram observadas antes de 24 semanas e a presença de lesões erosivas leves no antro e região de transição só foram notadas em alguns animais a partir de 48 semanas de infecção. Isso mostra a importância da virulência da cepa na resposta inflamatória.

A infecção pelo HP induz 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 (BLASER, 1987; BODGER & CRABTREE, 1998; BLASER *et al.*, 1992) . Apesar disso, muitos eventos relacionados às alterações patogênicas da bactéria ainda permanecem desconhecidos, em particular, as alterações histológicas observados após o tratamento operatório da úlcera péptica, associado ou não à sua erradicação e as modificações hormonais que ocorrem nessa situação.

As alterações histológicas na fase aguda da infecção são pobres, sendo a gastrite neutrofílica a única evidência. Outras alterações observadas em alguns indivíduos, como a presença de pequenos agregados linfóides na base da muscular da mucosa, não têm subsídios histológicos, sorológicos ou clínicos consistentes que evidenciem infecção aguda (GRAHAM *et al.*, 2004) . Já na fase crônica, os achados histológicos são típicos, caracterizados pela presença de infiltrado inflamatório moderado a acentuado, constituído de células mononucleares e a presença de agregados linfóides organizados, sobretudo no antro.

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 estômago humano, além da semelhança das alterações da mucosa na vigência da infecção (WIRTH *et al.*, 1998; NAKAGAWA *et al.*, 2005) . Entre as vantagens deste modelo, estão a alta frequência e estabilidade da infecção, a grande colonização pelo HP, o longo período de infecção, o que possibilita o estudo da infecção crônica e a similaridade das alterações patológicas (YAN *et al.*, 2004). Porém, algumas diferenças podem ser notadas como a hiperplasia dos folículos linfóides da camada submucosa e a gastrite cística profunda, observada em gerbis e ausente em seres humanos (KODAMA *et al.*, 2004) . Outro ponto polêmico neste modelo refere-se ao tempo de aparecimento das lesões histológicas. Estudos demonstram a presença de alterações histológicas na fase aguda inicial (SUZUKI *et al.*, 2003), ou a partir do segundo mês (NAKAGAWA *et al.*, 2005) enquanto em outros, essas alterações são observadas somente na infecção crônica (YAN *et al.*, 2004) ou mesmo na fase crônica tardia, após 32 semanas (WIRTH *et al.*, 1998). O tempo de aparecimento dessas alterações relaciona-se a múltiplos fatores como virulência, carga bacteriana, cepa, entre outros, como abordado anteriormente. No presente estudo, observou-se que as alterações histológicas são diferentes em cada área anatômica do estômago e influenciada de acordo com o fator etiológico. No corpo, tanto a infecção aguda pelo HP quanto a vagotomia com piloroplastia na

fase inicial não se associaram à inflamação; na junção corpo-antral a associação da infecção à vagotomia relacionou-se à presença de infiltrado inflamatório leve; no antro, tanto a infecção pelo HP quanto a vagotomia com piloroplastia associaram-se à presença de infiltrado inflamatório leve, o que não ocorreu na concomitância das duas situações; na junção antroduodenal, de modo semelhante à junção corpo-antral, a infecção associada à vagotomia levou ao aparecimento de um infiltrado inflamatório leve. No período estudado tanto a infecção pelo HP quanto a vagotomia com piloroplastia não levaram ao aparecimento significativo de infiltrado inflamatório moderado ou intenso, bem como aparecimento de folículos linfóides.

A infecção aguda pelo HP resulta em hipocloridria enquanto que a infecção crônica pode causar tanto hipercloridria quanto hipocloridria dependendo da distribuição da infecção e do grau da gastrite do corpo (SCHUBERT, 2002). Em relação à gastrina, pouco se sabe sobre os níveis basais deste hormônio na fase aguda da infecção pelo HP devido a inexistência de estudos em seres humanos, já que é muito rara a identificação e caracterização segura da infecção nesse período. Este estudo experimental não observou alteração nos níveis de gastrina pós-prandiais na fase aguda da infecção de gerbis pelo HP. Situação inversa ocorre na fase crônica, onde inúmeros trabalhos têm demonstrado uma clara associação com hipergastrinemia. Porém, as causas desta hipergastrinemia têm sido justificadas de várias maneiras: aumento na densidade e/ou volume das células G, diminuição da densidade das células D, supressão da função e diminuição da somatostatina, ação das citocinas derivadas do processo inflamatório, entre outros, sem contudo haver uma explicação precisa.

Apesar de interdependentes, na maioria dos trabalhos da literatura o foco recai sobre um ou dois desses parâmetros. No presente estudo, buscou-se fazer a inter-relação de dois desses parâmetros, a histologia e a secreção gástrica, e na fase aguda da infecção, em organismos em que a infecção se sobrepõem às alterações promovidas pela denervação gástrica e refluxo duodenogástrico.

Observou-se que, nos animais em que foi feita a vagotomia e onde não existiu a infecção pelo HP, a reação inflamatória leve ocorreu em um grupo pequeno de animais e localizou-se basicamente no antro e junção antroduodenal, caracterizando-se por um infiltrado misto, compatível com uma inflamação aguda. Neste grupo, as alterações das células hormonais não mostraram alteração do número de células G ou D, nem tampouco na gastrinemia. Portanto, aparentemente, a vagotomia associada à piloroplastia, em sua fase inicial, não alterou significativamente a fisiologia gástrica. Experimentalmente tem-se observado hiperplasia das células G associada à vagotomia (ALUMETS *et al.*, 1980). Estudo realizado em ratos em um período de tempo semelhante ao deste trabalho demonstrou que a

denervação do plexo mioentérico do estômago causou um aumento significativo na população de células G e D (SOBREIRA *et al.*, 2002). Porém, quando o procedimento foi associado a piloroplastia, esse aumento não foi observado, indicando que, após a denervação, a distensão e estase gástrica seriam o maior estímulo para o aumento da densidade das células G e D. Em seres humanos, num período tardio, têm-se observado este mesmo aumento da densidade de células G após a vagotomia (ELFBERG *et al.*, 1989) .

A infecção pelo HP em gerbis mostrou infiltrado inflamatório leve desde a junção corpo/antro, mas com característica celular diferente, ao exibir predominância de mononucleares. A repercussão dessa inflamação, de característica diversa daquela dos animais com denervação gástrica e refluxo duodenogástrico, pode ter afetado a população de células endócrinas gástricas, que mostraram aumento significativo das células G e D, quando feita a comparação com os animais não infectados (grupo A). Apesar do aumento do número de células G, aparentemente sua função foi suprimida pelo aumento do número de células D. Talvez isso tenha ocorrido pelas características da inflamação, de tempo mais curto, sendo possível que, em um primeiro momento no estabelecimento da gastrite predomine o componente de inibição da secreção de gastrina e, conseqüentemente, redução da acidez gástrica. De um modo geral, a literatura tem demonstrado um aumento na concentração de células G na infecção crônica pelo HP, tanto em adultos (LIU *et al.*, 2005), quanto em crianças (MACIORKOWSKA *et al.*, 2006) e uma diminuição do número de células D (PARK *et al.*, 1999; HARUMA *et al.*, 2000; TZANEVA, 2001). Apesar disso, alguns autores apresentam evidências contrárias, onde não se observa alteração no número de células G e D quando comparados pacientes com gastrite crônica associada ao HP, pacientes com gastrite não associada ao HP e pacientes sem gastrite, tornando a relação células G/D estável (CZAJA *et al.*, 2007). É importante lembrar que todos os dados relatados referem-se à infecção crônica, permanecendo a infecção aguda pouco elucidada.

## **8 CONCLUSÕES**

Os resultados desse estudo permitem concluir que no período inicial:

- a. a infecção pelo *Helicobacter pylori* em gerbis não alterou a gastrinemia pós-prandial, porém, aumentou a densidade de células G e células D, bem como a relação G/D e promoveu alterações histológicas no epitélio gástrico caracterizada por inflamação leve na junção antro-corpo, no antro e na junção antro duodenal.
- b. a vagotomia associada a piloroplastia em gerbis não alterou a gastrinemia pós-prandial, bem como a densidade das células G e D ou a relação G/D e não promoveu alterações histológicas no epitélio gástrico.
- c. a associação da infecção pelo *Helicobacter pylori* com vagotomia e piloroplastia não alterou a gastrinemia pós-prandial, nem a densidade das células G e D ou a relação G/D; entretanto, observou-se maior inflamação classificada como leve nas zonas transicionais corpo-antro e antro-duodeno) com predomínio de mononucleares.

# 9 REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Oliveira, Luiz Cláudio Vieira; Corrêa, Osvaldo Manoel. Normas para redação de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses. Belo Horizonte: Editora I-net, 2007. 143 p.

ALUMETS J., EL MUNSHID H.A., HAKANSON R., HEDENBRO J., LIEDBERG G., OSCARSON J., REHFELD J.F., SUNDLER F., VALLGREN S. Gastrin cell proliferation after chronic stimulation: effect of vagal denervation or gastric surgery in the rat. **J. Physiol.**, Bethesda, n. 298, p. 557-69, jan. 1980.

ALVARES, M.M.D.; MARINO, M.; OLIVEIRA, C.A.; MENDES, C.C., COSTA, A.C.F; GUERRA, J.; QUEIROZ, D.M.M.; NOGUEIRA, A.M.M.F. Características da gastrite crônica associada a *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o *status cagA*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 51-9, fev. 2006.

AMI, M.; DOI, R.; INOUE, K.; CHOWDHURY, P.; RAYFORD, P.L. The influence of vagotomy on basal and postprandial pancreatic secretion and plasma levels of gastrointestinal hormones in conscious rats. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v. 177, n. 6, p. 577-82, dez. 1993.

ARNOLD, R., HULST M.V.; NEUHOF C.H.; SCHWARTING, H.; BECKER, H.D.; CREUTZFELDT, W. Antral gastrin-producing G-cells and somatostatin-producing D-cells in different states of gastric acid secretion. **Gut**, London, v. 23, n. 4, p. 285-91, abr. 1982.

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.**, Oxford, v. 12, supl.1, p. 9-15, fev. 1998. Revisão.

BARBUTO, R.C. Alterações do esvaziamento gástrico e da gastrinemia induzidas pela vagotomia associada à piloroplastia em ratas infectadas ou não pelo *Helicobacter heilmannii* tipo 1. 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Centro de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

BEALES, I.L. Effect of platelet-activating factor on gastrin release from cultured rabbit G-cells. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v.46, n. 2, p. 301-6, fev. 2001.

BECKER, H.D.; REEDER, M.D.; THOMPSON, J.C. Influence of vagotomy on tissue gastrin levels in stomach and pancreas in rats. **Surgery**, St. Louis, v. 74, n. 5, p. 778-82, nov. 1973.

BECKER, H.D. Hormonal changes after gastric surgery. **Clin. Gastroenterol.**, London, v. 9, n. 3, p. 755-71, set. 1980.

BELL, G.D.; POWELL, K.U. Eradication of *Helicobacter pylori* and its effect in peptic ulcer disease. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, Oslo, v. 196, p. 7-11, 1993.

BESWICK, E.J.; SUAREZ, G.; REYES, V.E. *H pylori* and host interactions that influence pathogenesis. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 12, n. 35, p. 5599-605, 21 set. 2006. Revisão.

BLASER, M.J. Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 93, n. 2, p. 371-83, ago. 1987.

BLASER, M.J. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* induced inflammation. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 102, n. 2, p. 720-7, fev. 1992.

BODGER, K.; CRABTREE, J.E. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. **Br. Med. Bull.**, London, v. 54, n. 1, p. 139-50, 1998.

BRAASCH, J.W.; BROOKE-COWDEN, G.L. Disability after gastric surgery. **Surg. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 56, n. 3, p. 607-13, jun. 1976.

BRAZEAU, P.; VALE, W.; BURGUS, R.; LING, N.; BUTCHER, M.; RIVIER, J.; GUILLEMIN, R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. **Science**, Washington, v. 179, n. 68, p. 77-9, 5 jan. 1973.

BRODY, F.J.; TRAD, K.S. Comparison of acid reduction in anti-ulcer operations. **Surg. Endosc.**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 123-5, fev. 1997.

BRZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KWIECIEN, S.; KONTUREK, S.J.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D.; PTAK, A.; PAWLIK, M.; STACHURA, J.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Triple eradication therapy counteracts functional impairment associated with *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. **J. Physiol. Pharmacol.**, Kraków, v. 54, n. 1, p. 33-51, mar. 2003.

BUCKLEY, M.J.M.; O'MORAIN, C.A. *Helicobacter* biology – discovery. **Br. Med. Bull.**, London, v. 54, n. 1, p. 7-16, 1998. Revisão.

CALABUIG, R.; CARRIO, I.; MONES, J.; PUIG LA CALLE, J.; VILARDELL, F. Gastric emptying after truncal vagotomy and pyloroplasty. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 23, n. 6, p. 659-64, ago. 1988.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). **Guide to the care and use of experimental animals**. Ottawa, v. 2, 1984. 347 p.

CANTORNA, M.T.; BALISH, E. Inability of human clinical strains of to colonize the alimentary tract of germ-free rodents. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 36, n. 4, p. 237-41, abr. 1990.

CLAYTON, C.L.; KLEANTHOUS, H.; COATES, P.J.; MORGAN, D.D.; TABAQCHALI, S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 1, p. 192-200, jan. 1992.

COGHLAN, J.G.; GILLIGAN, D.; HUMPHRIES, H.; MEKENNA, D.; DODEY, C.; SWEENEY, E.; KEANE, C.; O'MORAIN, C. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers. **Lancet**, London, v.14, n. 2, p. 1109-11, nov. 1987.

CUSCHIERI, A. Surgical management of severe intractable postvagotomy diarrhoea. **Br. J. Surg.**, Bristol, v. 73, n. 12, p. 981-4, dez. 1986.

CZAJA, M.; SZARSZEWSKI, A.; KAMIŃSKA, B.; BOGOTKO-SZARSZEWSKA, M.; LUCZAK, G.; KOZIELSKA, E.; DELIŃSKA-GALIŃSKA, A.; KORZON, M. Serum gastrin concentration and changes in G and D cell densities in gastric antrum in children with chronic gastritis. **Int. J. Clin. Pract.**, Oxford, 15 jun. 2007. Artigo “on-line”. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1742-1241.2007.01311.x>> Acesso em: 5 fev. 2008.

DEBONGNIE, J.C.; DONNAY, M.; MAIRESSE, J. *Gastrospirillum hominis* (“*Helicobacter heilmanni*”): a cause of gastritis, sometimes transient, better diagnosed by touch cytology? **Am. J. Gastroenterology**, New York, v. 90, n. 3, p. 411-6, mar. 1995.

DeCROSS, A.J.; MARSHALL, B.J. The role of *Helicobacter pylori* in acid-peptic disease. **Am. J. Med. Sci.**, Philadelphia, v. 306, n. 6, p. 381-92, dez.1993.

DOOLEY, C.P.; COHEN, H. The clinical significance of *Campylobacter pylori*. **An. Int. Med.**, Philadelphia, v. 108, n. 1, p. 70-9, jan.1988. Revisão.

DRAZEK, E.S.; DUBOIS, A.; HOLMES, R.K. Characterization and presumptive identification of *Helicobacter pylori* isolates from rhesus monkeys. **J. Clin. Microbiol.** , Washington, v. 32, n. 7, p. 1799-804, jul. 1994.

DUBOIS, A; FIALA, N; HEMAN-ACKAH, L. M.; DRAZEK, E.S.; TARNAWSKI, A. FISHBEIN, W.N.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J. Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 106, n. 6, p. 1405-17, jun. 1994.

EDWARDS A.M. Observations sur quelques mammifères du nord de la Chine. **Ann. Sci. Nat. (Zool.)**, Paris, vol. 7, p. 375–7, 1867.

ELFBERG, B.A.; NILSSON, F.; SELKING, O. Parietal cell vagotomy and truncal vagotomy in elective duodenal ulcer surgery-results after six to twelve years. **Ups. J. Med. Sci.**, Stockholm, v. 94, n. 2, p. 129-36, 1989.

FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; SHEN, Z.; FENG, Y.; TAYLOR, N.S.; PASTER, B.J.; ERICSON, R.L.; LAU, C.N.; CORREA, P.; ARAYA, J.C.; ROA, I. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 114, n. 4, p. 755-63, abr. 1998.

FOX, J.G.; WANG, T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, Michigan, v. 117, n. 1, p. 60-69, jan. 2007. Revisão.

GHOSHAL, N.G.; BAL, H.S. Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. **Lab Anim.**, New York, v. 23, n. 1, p. 21-9, jan.1989.

GISBERT, J.P.; BOIXEDA, D.; VILA, T.; De RAFAEL, L.; BALERIOLA, I.A.; MOREIRA, V.; ARGILA, C.M.; AROCENA, C.; PLAZA, A.G. Descenso de los niveles basales de gastrina tras la erradicación de *H. pylori*. **Rev. Esp. Enf. Digest.**, Madrid, v. 87, n. 2, p. 99-107, fev. 1995.

GRAHAM, D.Y.; LEW, G.M.; LECHAGO, J. Antral G-Cell and D-Cell numbers in *Helicobacter pylori* infection: effect of *H. Pylori* eradication. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 104, n. 6, p. 1655-60, jun. 1993.

GRAHAM, D.Y.; OPEKUN, A.R.; OSATO, M.S.; EL-ZIMAITY, H.M.; LEE, C.K.; YAMAOKA, Y.; QURESHI, W.A.; CADOZ, M.; MONATH, T.P. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. **Gut**, London, v. 53, n. 9, p. 1235-43, set. 2004.

HARUMA, K.; KAMADA, T.; KAWAGUCHI, H.; OKAMOTO, S.; YOSHIHARA, M.; SUMII, K.; INOUE, M.; KISHIMOTO, S.; KAJIYAMA, G.; MIYOSHI, A. Effect of age and *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, Melbourne, v. 15, n. 3, p. 277-83, mar. 2000.

HERRINGTON Jr. J.L.; SAWYERS, J.L. Results of elective duodenal ulcer surgery in women: comparison of truncal vagotomy and antrectomy, gastric selective vagotomy and pyloroplasty, proximal gastric vagotomy. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 187, n. 5, p. 576-82, maio 1978.

HOLCK, S.; INGEHOLM, P.; BLOM J; NORGAARD, A.; ELSBORG, L.; ADAMSEN, S.; ANDERSEN, L.P. The histopathology of human gastric mucosa inhabited by *Helicobacter heilmannii*-like (*Gastrospirillum hominis*) organisms, including the first culturable case. **APMIS**, Copenhagen, v. 105, n. 10, p. 746-56, out.1997.

HOLLE G.E.; BUCK, E.; PRADAYROL, L.; WUNSCH, E.; HOLLE, F. Behavior of somatostatin-immunoreactive cells in the gastric mucosa before and after selective proximal vagotomy and pyloroplasty in treatment of gastric and duodenal ulcers. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 89, n. 4, p. 736-45, out. 1985.

INMAN, L.; LEE, S. K.; SHAH, I. A.; THIRLBY, R. C.; FELDMAN, M. Effect of truncal vagotomy on parietal cell mass and antral gastrin cell mass in dogs. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 99, n. 6, p. 1581-92, dez. 1990.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Infection with *Helicobacter pylori*. In: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.**, Lion, França, v. 61, p. 177-240, 7-14 jun. 1994.

JORDAN Jr., P.H. Surgery for peptic ulcer disease. **Curr. Probl. Surg.**, St. Louis, v. 28, n. 4, p. 265-330, abr. 1991. Revisão.

KAPUR, S.P. An ultrastructural and cytochemical study of enteroendocrine cells of the pyloric antrum in the gerbil, *Meriones unguiculatus*. **Acta Anat. (Basel)**, Basel, v. 112, n. 3, p. 220-32, 1982.

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.**, Beijing, v. 11 n. 45, p. 7063-71, 7 dez. 2005. Revisão.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J. Role of *Helicobacter pylori* infection in gastro-duodenal secretion and in pathogenesis of peptic ulcer and gastritis. **J. Physiol. Pharmacol.**, Kraków, v. 45, n. 3, p. 333-50, set.1994.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, W.W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. **J. Physiol. Pharmacol.**, Kraków, v. 56, n. 4, p. 507-30, dez. 2005. Revisão.

KRAKOWKA, S.; MORGAN, D. R.; KRAFT, W. G.; LEUNK, R. D. Establishment of *Campylobacter pylori* infection in neonatal gnotobiotic piglet. **Infect. Immun.**, Washington, v. 55, n. 11, p. 2789-96, nov. 1987.

LAMBERT, J. R.; BORRAMEO, M.; PINKARD, K. J.; TURNER, H.; CHAPMAN, C. B.; SMITH, M. L. Colonization of gnotobiotic piglets with *Campylobacter pyloridis* – an animal model? **J. Infect. Dis.** Chicago, v. 155, n. 6, p. 1344, jun. 1987.

LARSSON, L.I. Gastrointestinal cells producing endocrine, neurocrine and paracrine messengers. **Clin. Gastroenterol.**, London, v. 9, n. 3, p. 485-16, set. 1980.

LEE, A.; O'ROURKE, J.; DE UNGRIA, M.C.; ROBERTSON, B.; DASKALOPOULOS, G.; DIXON, M.F. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 112, n. 4, p. 1386-97, abr. 1997. Errata in: **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 113, n. 2, p. 732, ago. 1997.

LEE, A. Animals models for host-pathogen interaction studies. **Br. Med. Bull.**, London, v. 54, n. 1, p. 163-73, 1998. Revisão.

LIPOAF, T.; SHAPIRO, D.; KOZOL, R.A. Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 12, n. 20, p. 3248-52, maio 2006. Revisão.

LIU, Y.; VOSMAER, G.D.; TYTGAT, G.N.; XIAO, S.D.; TEN KATE, F.J. Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: *Helicobacter pylori* associated and non-associated gastritis. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 58, n. 9, p. 927-31, set. 2005.

LUKASIEWICZ, S.; JONDERKO, K. A comparative study on gastric emptying and secretory status in the early postoperative period after truncal vagotomy with two pyloroplasty variants performed for peptic ulcer disease. II. Heineke-Mikulicz pyloroplasty and comparison with the cassimally routine. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, Isehara, v. 15, n. 6, p. 467-76, nov. 1990.

MACIORKOWSKA, E.; PANASIUK, A.; KONDEJ-MUSZYŃSKA, K.; KACZMARSKI, M.; KEMONA, A. Mucosal gastrin cells and serum gastrin levels in children with *Helicobacter pylori* infection. **Adv. Med. Sci.**, Białystok, v. 51, p. 137-41, 2006.

MIYATA, A.; OKAZAKI, K.; YAMAMOTO, Y. Involvement of capsaicin-sensitive neurons in gastrin release provoked by intragastric administration of bile salts in the rat. **J. Gastroenterol.**, Kraków, v. 30, n. 1, p. 1-7, fev. 1995.

MOURA, S. B.; QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N.; NOGUEIRA, A. M. M. F.; ROCHA, G. A. The inflammatory response of the gastric mucosa of mice experimentally infected with '*Gastrospirillum suis*'. **J. Med. Microbiol.**; London, v. 39, n. 1, p. 64-8, jul. 1993.

MURAKAMI, S.; NAKAYAMA, I.; UCHIDA, Y. Alteration of gastrin-producing cells in rat antral mucosa after truncal vagotomy. **Acta Pathol. Jpn.**, Tokyo, v. 38, n. 7, p. 841-52, jul. 1988.

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.**, Washington, v. 12, n. 2, p. 347-53, fev. 2005.

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.**, London, v. 52, n. 6, p. 797-803, jun. 2003.

OHNITA, K.; ISOMOTO, H.; HONDA, S.; WADA, A.; WEN, C.Y.; NISHI, Y.; MIZUTA, Y.; HIRAYAMA, T.; KOHNO, S. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric

inflammation in Mongolian gerbils. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 11, n. 10, p. 1549-53, 14 mar. 2005.

OWEN, R.J. *Helicobacter* – species classification and identification. **Br. Med. Bull.**, London, v. 54, n. 1, p. 17-30, 1998. Revisão.

PARK, S.M.; LEE, H.R.; KIM, J.G.; PARK, J.W.; JUNG, G.; HAN, S.H.; CHO, J.H.; KIM, M.K. Effect of *Helicobacter pylori* infection on antral gastrin and somatostatin cells and on serum gastrin concentrations. **Korean J. Intern. Med.**, Seoul, v. 14, n. 1, p. 15-20, jan. 1999.

QUEIROZ, D.M.M.; MOURA, S.B.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; BARBOSA, A.J.; DE CARVALHO, A.S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on G-cell and D-cell density in children. **Lancet**, London, v. 343, n. 8907, p. 1191-3, 14 maio 1994.

SALES, A.O.; RODRIGUES, S.J.P.; BACCHI, C.E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB®+ e Herceptest® para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 265-71, ago. 2004.

SCOTT, D.R.; MARCUS, E.A.; 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. U.S.A.**, Washington, v. 104, n. 17, p. 7235-40, abr. 2007.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, Hagerstown, v. 18 n. 6, p. 639-49, nov. 2002.

SHIMODA, H.; YOKOYAMA, S.; NAKAYAMA, I; HADAMA, T.; UCHIDA, Y. The proliferative kinetics of somatostatin-producing cells in the rat antral mucosa after truncal vagotomy. **Surg. Today**, Tokyo, v. 22, n. 4, p. 339-45, jul. 1992.

SMITH, M.G.; HOLD, G.L.; TAHARA, E.; EL-OMAR, E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 21, n. 12, p. 2979-90, maio 2006. Revisão.

SOBREIRA, L.F.; ZUCOLOTO, S.; GARCIA, S.B.; TRONCON, L.E. Effects of myenteric denervation on gastric epithelial cells and gastric emptying. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 47, n. 11, p. 2493-9, nov. 2002.

SOKIC-MILUTINOVIC, A.; TODOROVIC, V.; MILOSAVLJEVIC, T.; MICEV, M.; DRNDAREVIC, N.; MITROVIC, O. Gastrin and antral G cells in course of *Helicobacter pylori* eradication: six months follow up study. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 11, n. 27, p. 4140-7, 21 jul.2005.

SUZUKI, H.; MASAOKA, T.; NOMURA, S.; HOSHINO, Y.; KURABAYASHI, K.; MINEGISHI, Y.; SUZUKI, M.; ISHII, H. Current consensus on the diagnosis and treatment of H. pylori-associated gastroduodenal disease. **Keio J. Med.**, Tokyo, v. 52, n. 3, p. 163-73, set. 2003. Revisão.

THAM, T.C.; CHEN, L.; DENNISON, N.; JOHNSTON, C.F.; COLLINS, J.S.; ARDILL, J.E.; BUCHANAN, K.D. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on antral somatostatin cell density in humans. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, London, v. 10, n. 4, p. 289-91, abr. 1998.

THOMPSON, D.G. Modulation of gastric perception and motility in man. Current concepts and correlation with symptoms. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 39, supl 12, p. 48S-50S, dez. 1994.

TZANEVA, M. Light and electron microscopic immunohistochemical investigation on G and D cells in antral mucosa in *Helicobacter pylori*-related gastritis. **Exp. Toxicol. Pathol.**, New York, v. 52, n. 6, p. 523-8, fev. 2001.

VAN ZANTEN, S.J.; DIXON, M.F.; LEE, A. The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 116, n. 5, p. 1217-29, maio 1999. Revisão.

WALSH, J.H.; LAM, S.K. Physiology and pathology of gastrin. **Clin. Gastroenterol.**, London, v. 9, n. 3, p. 567-91, set. 1980.

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

WARREN, J.R.; MARSHALL, B.J. Undentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, London, v. 16, n. 1, p. 1311-5, jun. 1984.

WIRTH, H.P.; BEINS, M.H.; YANG, M.; THAM, K.T.; BLASER, M.J. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4856-66, out. 1998.

WOLFLE, T.L. 50 years of the Institute for Laboratory Animal Research (ILAR): 1953-2003. **ILAR J.**, Washington, v. 44, n. 4, p. 324-37, 2003.

YAN, J.; LUO, Y.H.; MAO, Y.F. Establishment of *Helicobacter pylori* infection model in Mongolian gerbils. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 10, n. 6, p. 852-5, 15 mar. 2004.

YAO, Y.L.; XU, B.; ZHANG, W.D.; SONG, Y.G. Gastrin, somatostatin, and experimental disturbance of the gastrointestinal tract in rats. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 7, n. 3, p. 399-402, jun. 2001.

ZAVROS, Y.; KAO, J.Y.; MERCHANT, J.L. Inflammation and cancer III. Somatostatin and the innate immune system. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, Bethesda, v. 286, n. 5, p. G698-701, maio 2004.

# **10 APÊNDICES**

Apêndice 1 – Cálculo da população das células G do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidas ou não a vagotomia e piloroplastia.

<b>Grupo</b>	<b>Número da Lâmina</b>	<b>Número de Células</b>	<b>Número Campos Avaliados</b>	<b>Extensão do campo</b>	<b>Células/mm</b>
A	Lâmina 15	50	29	0,25 mm	<b>6,90</b>
A	Lâmina 16	152	35	0,25 mm	<b>17,37</b>
A	Lâmina 17	68	30	0,25 mm	<b>9,07</b>
A	Lâmina 18	87	37	0,25 mm	<b>9,41</b>
A	Lâmina 19	193	40	0,25 mm	<b>19,30</b>
A	Lâmina 20	66	30	0,25 mm	<b>8,80</b>
A	Lâmina 21	119	39	0,25 mm	<b>12,21</b>
A	Lâmina 22	100	40	0,25 mm	<b>10,00</b>
A	Lâmina 23	40	33	0,25 mm	<b>4,85</b>
A	Lâmina 24	68	36	0,25 mm	<b>7,56</b>
B	Lâmina 1	212	21	0,25 mm	<b>10,10</b>
B	Lâmina 2	89	23	0,25 mm	<b>3,87</b>
B	Lâmina 3	95	28	0,25 mm	<b>13,57</b>
B	Lâmina 4	43	20	0,25 mm	<b>8,60</b>
B	Lâmina 5	52	18	0,25 mm	<b>11,56</b>
B	Lâmina 6	51	29	0,25 mm	<b>7,03</b>
B	Lâmina 7	-	-	-	-
B	Lâmina 8	-	-	0,25 mm	-
B	Lâmina 9	91	24	0,25 mm	<b>15,17</b>
B	Lâmina 10	75	19	0,25 mm	<b>15,79</b>
B	Lâmina 11	-	-	-	-
B	Lâmina 12	100	37	0,25 mm	<b>10,81</b>
B	Lâmina 13	89	27	0,25 mm	<b>13,19</b>
B	Lâmina 14	47	27	0,25 mm	<b>6,96</b>
C	Lâmina 142	245	35	0,25 mm	<b>28,00</b>
C	Lâmina 143	324	27	0,25 mm	<b>48,00</b>
C	Lâmina 144	278	25	0,25 mm	<b>44,80</b>
C	Lâmina 145	139	26	0,25 mm	<b>21,38</b>
C	Lâmina 146	103	27	0,25 mm	<b>15,26</b>
C	Lâmina 147	197	25	0,25 mm	<b>31,52</b>
C	Lâmina 148	215	26	0,25 mm	<b>33,08</b>
C	Lâmina 149	123	27	0,25 mm	<b>18,22</b>
C	Lâmina 150	171	24	0,25 mm	<b>28,50</b>
C	Lâmina 151	219	28	0,25 mm	<b>31,29</b>
C	Lâmina 152	236	24	0,25 mm	<b>39,33</b>
C	Lâmina 153	131	27	0,25 mm	<b>19,41</b>
D	Lâmina 125	120	24	0,25 mm	<b>20,00</b>
D	Lâmina 126	40	24	0,25 mm	<b>6,67</b>
D	Lâmina 127	146	24	0,25 mm	<b>24,33</b>
D	Lâmina 128	19	14	0,25 mm	<b>5,43</b>
D	Lâmina 129	84	24	0,25 mm	<b>14,00</b>
D	Lâmina 130	74	17	0,25 mm	<b>17,41</b>
D	Lâmina 131	355	26	0,25 mm	<b>54,62</b>
D	Lâmina 132	134	25	0,25 mm	<b>21,44</b>
D	Lâmina 133	225	26	0,25 mm	<b>34,62</b>
D	Lâmina 134	36	26	0,25 mm	<b>5,54</b>
D	Lâmina 135	-	-	-	-
D	Lâmina 136	297	21	0,25 mm	<b>56,57</b>
D	Lâmina 137	134	25	0,25 mm	<b>21,44</b>
D	Lâmina 138	76	22	0,25 mm	<b>13,82</b>
D	Lâmina 139	313	34	0,25 mm	<b>36,82</b>
D	Lâmina 140	380	25	0,25 mm	<b>60,80</b>
D	Lâmina 141	439	23	0,25 mm	<b>76,35</b>

Apêndice 2 – Cálculo da população das células D do estômago de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidas ou não a vagotomia e piloroplastia

<b>Grupo</b>	<b>Número da Lâmina</b>	<b>Número de Células</b>	<b>Número Campos Avaliados</b>	<b>Extensão do campo</b>	<b>Células/mm</b>
A	Lâmina 15	23	27	0,25 mm	3,41
A	Lâmina 16	30	20	0,25 mm	6,00
A	Lâmina 17	-	-	0,25 mm	-
A	Lâmina 18	12	14	0,25 mm	3,43
A	Lâmina 19	-	-	-	-
A	Lâmina 20	65	30	0,25 mm	8,67
A	Lâmina 21	34	29	0,25 mm	4,69
A	Lâmina 22	27	28	0,25 mm	3,86
A	Lâmina 23	11	12	0,25 mm	3,67
A	Lâmina 24	39	27	0,25 mm	5,63
B	Lâmina 1	58	32	0,25 mm	7,25
B	Lâmina 2	79	26	0,25 mm	3,04
B	Lâmina 3	40	29	0,25 mm	5,52
B	Lâmina 4	24	16	0,25 mm	6,00
B	Lâmina 5	67	33	0,25 mm	8,12
B	Lâmina 6	29	26	0,25 mm	4,46
B	Lâmina 7	-	-	0,25 mm	-
B	Lâmina 8	25	26	0,25 mm	3,85
B	Lâmina 9	26	22	0,25 mm	4,73
B	Lâmina 10	40	30	0,25 mm	5,33
B	Lâmina 11	-	-	-	-
B	Lâmina 12	45	27	0,25 mm	6,67
B	Lâmina 13	36	25	0,25 mm	5,76
B	Lâmina 14	20	19	0,25 mm	4,21
C	Lâmina 142	50	30	0,25 mm	6,67
C	Lâmina 143	55	22	0,25 mm	10,00
C	Lâmina 144	53	25	0,25 mm	8,48
C	Lâmina 145	38	21	0,25 mm	7,23
C	Lâmina 146	39	27	0,25 mm	5,78
C	Lâmina 147	81	31	0,25 mm	10,45
C	Lâmina 148	104	28	0,25 mm	14,86
C	Lâmina 149	47	29	0,25 mm	6,48
C	Lâmina 150	39	18	0,25 mm	8,67
C	Lâmina 151	94	29	0,25 mm	12,96
C	Lâmina 152	77	29	0,25 mm	10,62
C	Lâmina 153	54	28	0,25 mm	8,14
D	Lâmina 125	87	28	0,25 mm	12,43
D	Lâmina 126	50	30	0,25 mm	6,67
D	Lâmina 127	33	21	0,25 mm	6,29
D	Lâmina 128	39	29	0,25 mm	5,38
D	Lâmina 129	13	21	0,25 mm	2,48
D	Lâmina 130	34	25	0,25 mm	5,44
D	Lâmina 131	45	24	0,25 mm	7,5
D	Lâmina 132	18	16	0,25 mm	4,5
D	Lâmina 133	74	30	0,25 mm	9,87
D	Lâmina 134	38	29	0,25 mm	5,24
D	Lâmina 135	-	-	-	-
D	Lâmina 136	140	27	0,25 mm	20,70
D	Lâmina 137	51	32	0,25 mm	6,38
D	Lâmina 138	53	31	0,25 mm	6,84
D	Lâmina 139	69	29	0,25 mm	9,52
D	Lâmina 140	-	-	-	-
D	Lâmina 141	88	26	0,25 mm	13,54

Apêndice 3 – Cálculo da relação células G/D de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidas ou não a vagotomia e piloroplastia

<b>Grupo</b>	<b>Lâmina</b>	<b>CélulasG/mm</b>	<b>CélulasD/mm</b>	<b>Relação G/D</b>
A	Lâmina 15	6,9	3,41	2,04
A	Lâmina 16	17,37	6	2,85
A	Lâmina 17	9,07		-
A	Lâmina 18	9,41	3,43	2,77
A	Lâmina 19	19,3	-	-
A	Lâmina 20	8,8	8,67	1,01
A	Lâmina 21	12,21	4,69	2,63
A	Lâmina 22	10	3,86	2,56
A	Lâmina 23	4,85	3,67	1,31
A	Lâmina 24	7,56	5,63	1,35
B	Lâmina 1	10,1	7,25	1,38
B	Lâmina 2	3,87	3,04	1,26
B	Lâmina 3	13,57	5,52	2,43
B	Lâmina 4	8,6	6	1,42
B	Lâmina 5	11,56	8,12	1,42
B	Lâmina 6	7,03	4,46	1,58
B	Lâmina 7	-	-	-
B	Lâmina 8	-	3,85	-
B	Lâmina 9	15,17	4,73	3,22
B	Lâmina 10	15,79	5,33	2,94
B	Lâmina 11	-	-	
B	Lâmina 12	10,81	6,67	1,61
B	Lâmina 13	13,19	5,76	2,72
B	Lâmina 14	6,96	4,21	1,66
C	Lâmina 142	28	6,67	4,16
C	Lâmina 143	48	10	4,76
C	Lâmina 144	44,8	8,48	5,26
C	Lâmina 145	21,38	7,23	2,94
C	Lâmina 146	15,26	5,78	2,63
C	Lâmina 147	31,52	10,45	3,03
C	Lâmina 148	33,08	14,86	2,22
C	Lâmina 149	18,22	6,48	2,77
C	Lâmina 150	28,5	8,67	3,33
C	Lâmina 151	31,29	12,96	2,43
C	Lâmina 152	39,33	10,62	3,70
C	Lâmina 153	19,41	8,14	2,38
D	Lâmina 125	20	12,43	1,61
D	Lâmina 126	6,67	6,67	1,00
D	Lâmina 127	24,33	6,29	3,84
D	Lâmina 128	5,43	5,38	1,01
D	Lâmina 129	14	2,48	5,55
D	Lâmina 130	17,41	5,44	3,22
D	Lâmina 131	54,62	7,5	7,14
D	Lâmina 132	21,44	4,5	4,76
D	Lâmina 133	34,62	9,87	3,44
D	Lâmina 134	5,54	5,24	1,05
D	Lâmina 135	-	-	-
D	Lâmina 136	56,57	20,7	2,70
D	Lâmina 137	21,44	6,38	3,33
D	Lâmina 138	13,82	6,84	2,04
D	Lâmina 139	36,82	9,52	3,84
D	Lâmina 140	60,8	-	-
D	Lâmina 141	76,35	13,54	5,55

Apêndice 4 – Dosagem da gastrina pós-prandial de gerbis infectados ou não pelo HP e submetidas ou não a vagotomia com piloroplastia

<b>Grupo</b>	<b>RÓTULO DO FRASCO</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>DOSAGEM pg/ml</b>
<b>B</b>	01.07	Mic-01	<5
<b>B</b>	02.07	Mic-02	<b>112,0</b>
<b>B</b>	03.07	Mic-03	<b>13,5</b>
<b>B</b>	04.07	Mic-04	<b>9,8</b>
<b>B</b>	05.07	Mic-05	<5
<b>B</b>	06.07	Mic-06	<b>15,8</b>
<b>B</b>	07.07	Mic-07	<b>28,8</b>
<b>B</b>	08.07	Mic-08	<5
<b>B</b>	09.07	Mic-09	<5
<b>B</b>	10.07	Mic-10	<b>7,5</b>
<b>B</b>	11.07	Mic-11	<b>8,9</b>
<b>B</b>	12.07	Mic-12	<b>100,0</b>
<b>B</b>	13.07	Mic-13	<b>117,0</b>
<b>B</b>	14.07	Mic-14	<b>41,2</b>
<b>A</b>	15.07	Mic-15	<b>8,4</b>
<b>A</b>	16.07	Mic-16	<b>104,0</b>
<b>A</b>	17.07	Mic-17	<5
<b>A</b>	18.07	Mic-18	<b>7,5</b>
<b>A</b>	19.07	Mic-19	<b>9,6</b>
<b>A</b>	20.07	Mic-20	<b>58,0</b>
<b>A</b>	21.07	Mic-21	<b>25,1</b>
<b>A</b>	22.07	Mic-22	<b>131,0</b>
<b>A</b>	23.07	Mic-23	<b>68,4</b>
<b>A</b>	24.07	Mic-24	<b>112,0</b>
<b>C</b>	126.06	Mic-126	<b>26,4</b>
<b>D</b>	127.06	Mic-127	<b>8,7</b>
<b>D</b>	128.06	Mic-128	<b>6,8</b>
<b>D</b>	129.06	Mic-129	<5
<b>D</b>	130.06	Mic-130	<5
<b>D</b>	131.06	Mic-131	<b>45,5</b>
<b>D</b>	132.06	Mic-132	<5
<b>D</b>	133.06	Mic-133	<b>32,1</b>
<b>D</b>	134.06	Mic-134	<b>9,7</b>
<b>D</b>	135.06	Mic-135	<5
<b>D</b>	136.06	Mic-136	<5
<b>D</b>	137.06	Mic-137	<5
<b>D</b>	138.06	Mic-138	<b>6,5</b>
<b>D</b>	139.06	Mic-139	<b>5,5</b>
<b>D</b>	140.06	Mic-140	<b>8,3</b>
<b>C</b>	142.06	Mic-142	<b>18,5</b>
<b>C</b>	143.06	Mic-143	<b>6,4</b>
<b>C</b>	144.06	Mic-144	<b>7,9</b>
<b>C</b>	145.06	Mic-145	<b>26,5</b>
<b>C</b>	146.06	Mic-146	<b>8,3</b>
<b>C</b>	147.06	Mic-147	<b>35,8</b>
<b>C</b>	148.06	Mic-148	<5
<b>C</b>	149.06	Mic-149	<b>12,8</b>
<b>C</b>	150.06	Mic-150	<b>23,8</b>
<b>C</b>	151.06	Mic-151	<b>41,1</b>
<b>C</b>	152.06	Mic-152	<5
<b>C</b>	153.06	Mic-153	<5

# **11 ANEXOS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº **024/04** relativo ao projeto "Avaliação do efeito da erradicação do *Helicobacter felis* sobre o esvaziamento gástrico e secreção de gastrina em ratos vagotomizados" que tem como responsáveis Rafael Calvão Barbuto e Ivana Duval Araújo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **05.05.2004**.

Este certificado expira-se em **05.05.2009**

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **024/04** related to the project entitled "Evaluation of the effect of the eradication of *Helicobacter felis* about the gastric emptying and gastrin secretion in vagotomized mice", under the supervision of Rafael Calvão Barbuto and Ivana Duval Araújo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **05.05.04**.

This certificate expires in **05.05.2009**

Belo Horizonte, 05 de maio de 2004

  
**Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE**

Presidente do CETEA/UFMG

Anexo 2 – Protocolo utilizado na obtenção de amostra de tecido gástrico.

Animal nº : \_\_\_\_\_

Grupo:

- ( ) A – Não infectado + Operação simulada  
( ) B – Não infectado + Vagotomia e Píloroplastia  
( ) C – Infectado + Operação simulada  
( ) D – Infectado + Vagotomia e Píloroplastia

Data da Infecção: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data da Cirurgia: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data do Sacrifício: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1) Estenose pilórica : ( ) Sim ( ) Não

2) Distensão Gástrica : ( ) Sim ( ) Não

3) Úlcera gástrica: ( ) Sim ( ) Não

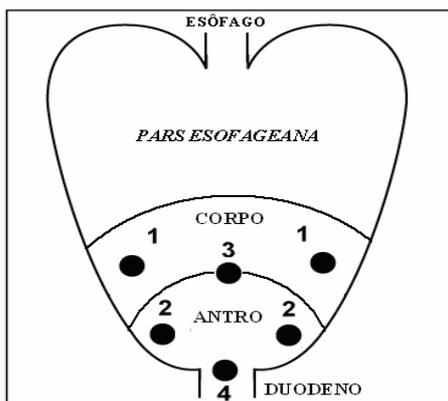
Local: ( ) Antro ( ) Corpo ( ) *Pars esofageana*

4) Lesão Tumoral: ( ) Sim ( ) Não

Local: ( ) Antro ( ) Corpo ( ) *Pars esofageana*

5) Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



Locais de Biópsia:
1 – Corpo
2 – Junção corpo-antro
3 – Antro
4 – Junção antro-duodeno

Anexo 3 – Protocolo utilizado para coleta de dados da Histologia.

Animal nº: \_\_\_\_\_ Grupo \_\_\_\_\_

**CORPO GÁSTRICO (C)**

Infiltrado inflamatório: ( ) ausente ( ) leve ( ) moderado ( ) acentuado

Agregados linfóides: ( ) sim ( ) não

Célula predominante: ( ) mononuclear ( ) polimorfonuclear

Alteração histológica: ( ) inflamação ( ) displasia ( ) metaplasia ( ) neoplasia

Outras alterações: \_\_\_\_\_

---

**JUNÇÃO CORPO/ANTRO (3)**

Infiltrado inflamatório: ( ) ausente ( ) leve ( ) moderado ( ) acentuado

Agregados linfóides: ( ) sim ( ) não

Célula predominante: ( ) mononuclear ( ) polimorfonuclear

Alteração histológica: ( ) inflamação ( ) displasia ( ) metaplasia ( ) neoplasia

Outras alterações: \_\_\_\_\_

---

**ANTRO GÁSTRICO (A)**

Infiltrado inflamatório: ( ) ausente ( ) leve ( ) moderado ( ) acentuado

Agregados linfóides: ( ) sim ( ) não

Célula predominante: ( ) mononuclear ( ) polimorfonuclear

Alteração histológica: ( ) inflamação ( ) displasia ( ) metaplasia ( ) neoplasia

Outras alterações: \_\_\_\_\_

---

**JUNÇÃO ANTRO/DUODENO (4)**

Infiltrado inflamatório: ( ) ausente ( ) leve ( ) moderado ( ) acentuado

Agregados linfóides: ( ) sim ( ) não

Célula predominante: ( ) mononuclear ( ) polimorfonuclear

Alteração histológica: ( ) inflamação ( ) displasia ( ) metaplasia ( ) neoplasia

Outras alterações: \_\_\_\_\_

---