



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

KÁTIA SOARES DE OLIVEIRA

**PREVALÊNCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* E VÍRUS EPSTEIN-BARR EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Belém- Pará

2013

KÁTIA SOARES DE OLIVEIRA

**PREVALÊNCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* E VÍRUS EPSTEIN-BARR EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano.

BELÉM-PARÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde-UFPA

Oliveira, Kátia Soares de.

Prevalência de *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein-Barr em crianças e adolescentes / Kátia Soares de Oliveira; orientador, Rommel Mario Rodrigues Burbano — 2013

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2013.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Vírus *Epstein-Barr*. 3. Criança. 4. Adolescente. I. Título.

CDD 22.ed. : 616.92

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kátia Soares de Oliveira

PREVALÊNCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* E VÍRUS EPSTEIN-BARR EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Sergio de Carvalho Amorim

Instituição: Universidade Federal do Pará

Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha

Instituição: Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Pará.

Dra. Patrícia Danielle Lima de Lima

Instituição: Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

Instituição: Universidade Federal do Pará

Belém, 13 de março de 2013

DEDICATÓRIA

Aos pacientes portadores de *Helicobacter pylori*, vírus Epstein-Barr e comorbidades associadas aos mesmos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a quem devo tudo que tenho e sou.

Aos meus familiares que souberam entender minha ausência em vários momentos, e sempre me deram forças para concluir essa jornada.

Aos colegas de profissão Marcelo Y. Yokoyama, Zilvana P. Macedo e Renata Valério pela coleta das biópsias para o estudo.

A Profa. Mestre Dilma Neves e ao Prof. Dr. Cezar Caldas pelas valiosas sugestões técnico científicas.

As Profas. Vania Bonucci e Alayde Vieira por compreenderem minha ausência em diversos momentos.

Ao Laboratório de Citogenética Humana da UFPA pela realização e interpretação dos métodos de PCR e Hibridização *in situ*.

Ao Prof. Dr. Rommel M. Rodrigues Burbano, pela orientação, paciência e estímulo constante na realização deste trabalho.

“Até aqui nos ajudou o Senhor.”

(I Samuel 7:12)

“Bendize ó minha alma ao Senhor e
tudo que há em mim bendiga
ao seu Santo Nome.”

(Salmos 103:1)

RESUMO

Introdução: Infecções por *Helicobacter pylori*(HP) e vírus Epstein-Barr (VEB) são comuns no mundo todo, embora o HP seja o maior fator em doenças gastroduodenais, seu percentual de associação com VEB é incerto. Tanto o VEB quanto o HP são classificados como carcinógenos classe 1 pela Organização Mundial de Saúde, e uma substancial fração de indivíduos se tornam co-infectados na adultice. Esses dois patógenos podem potencializar sinergicamente para causar gastrite crônica perpetua. O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência de HP e do vírus Epstein-Barr em crianças e adolescentes. **Material e Método:** Estudo descritivo, do tipo transversal. Foram analisadas amostras de mucosa gástrica de 64 crianças e adolescentes através do Teste da Urease para diagnóstico do HP, da técnica de PCR para detecção da cepa *cagA* de *H. pylori*, da técnica de hibridização *in situ* para detecção do EBV e da análise patológica para determinação de características histopatológicas. **Resultados:** A prevalência de HP nas crianças e adolescentes em estudo foi de 53,1% enquanto a prevalência de VEB foi 3,1%. Entre os pacientes infectados por HP, a maioria (94,3%) apresentava gastrite a endoscopia digestiva alta, sendo gastrite enantemática a mais comumente encontrada. Na análise histopatológica, também a maioria (97,1%) dos pacientes apresentava algum grau de gastrite, com 80% classificados com gastrite crônica moderada. Cepas *cagA* positivas foram encontradas em 64,7% dos infectados com HP e entre estes todos tinham gastrite, com predomínio de gastrite crônica moderada (54%), no entanto não se observou correlação com significância estatística entre esses achados. Em adição, também não houve significância estatística para a associação entre infecção por HP e por VEB na população estudada, a baixa prevalência de VEB nesta análise sugere que esse vírus não é um agente etiológico das lesões da mucosa gástrica. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que relaciona estes dois agentes infecciosos na mucosa gástrica de crianças e adolescentes do norte do Brasil. **Conclusão:** A maioria dos achados deste estudo se assemelha aos relatos da literatura, contudo evidenciou-se a necessidade de estudos com maior casuística, envolvendo a população pediátrica imunocompetente afim de melhor esclarecer se há ou não correlação entre a infecção por HP e VEB em nossa região.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, vírus Epstein-Barr, criança e adolescente.

ABSTRACT

Introduction: Infections by *Helicobacter pylori* (HP) and *Epstein-Barr* virus (EBV) are common worldwide, although HP is the highest factor in gastroduodenal diseases, its percentage of association with EBV is uncertain. Both EBV and HP are classified as class 1 carcinogens by the World Health Organization, and a substantial number of individuals become co-infected in adulthood. These two pathogens may have synergic potential to cause perpetual chronic gastritis. The purpose of this paper was to verify the prevalence of HP and Epstein-Barr virus in children and adolescents. **Material and Methods:** Transversal descriptive study. The gastric mucosa of 64 children and adolescents was analyzed through the Urease Test to diagnose HP and the PCR technique to detect *H. pylori*'s *cagA* strain, the *in situ* hybridization technique to detect EBV and the pathological analysis to determine the histopathological characteristics. **Results:** The prevalence of HP and EBV found by this study was 53.1% and 3.1, respectively. Most of the patients infected by HP (94.3%) presented gastritis in the upper gastrointestinal endoscopy, with enanthemathous gastritis being the most commonly found type. In the histopathological analysis, most patients (97.1%) presented some level of gastritis, 80% of which classified as moderate chronic gastritis. Positive *cagA* strains were found in 64.7% of the patients infected with HP and all of them had gastritis, with predominance of moderate chronic gastritis (54%); however, there was no statistically significant correlation between these findings. There was also no statistically significant association between infection by HP and EBV in the studied population. The low prevalence of EBV in this analysis suggests that this virus is not an etiological agent in gastric mucosa lesions. To our knowledge, this is the first study that relates these two infectious agents in the gastric mucosa of children and adolescents in northern Brazil. **Conclusion:** Most of the findings in this study are in line with the literature; however, it is necessary to conduct larger studies, involving immunocompetent pediatric population in order to determine whether there is a correlation between infection by HP and EBV in our region.

Key words: *Helicobacter pylori*, *Epstein-Barr* virus, children and adolescents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- História natural da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	15
Figura 2- <i>Helicobacter pylori</i> : resposta imune e supressão.....	18
Figura 3- Infecção por <i>Helicobacter pylori</i> revelada por Endoscopia (Gastropatiano-dular)...	19
Figura 4- Infecção por VEB em indivíduos saudáveis.....	25
Figura 5- Cinética dos anticorpos VEB específicos e carga viral na mononucleose infecciosa.....	27
Figura 6- Fluxograma da coleta dos dados.....	31
Quadro 1- Oligonucleotídeos utilizados na determinação dos genes urease e cagA.....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -Características demográficas dos pacientes em estudo, Belém/PA.....	35
TABELA 2 -Prevalência de <i>Helicobacterpylori</i> nos pacientes em estudo.....	35
TABELA 3 -Prevalencia do Vírus Epstein-barr nos pacientes em estudos.....	35
TABELA 4 -Achados endoscópicos e histopatológicos nos pacientes em estudo.....	36
TABELA 5 -Prevalencia de cepas de HP <i>cagA</i> positivo nos pacientes em estudo.....	37
TABELA 6 -Associação de cepas de HP <i>cagA</i> positivo e histopatológicos nos pacientes em estudo.....	37
TABELA 7 -Características dos pacientes em estudo, infectados comVEB.....	38
TABELA 8 -Correlação da infecção por vírus Epstein-barr e HP nos pacientes em estudo....	38
TABELA 9 -Características dos pacientes com cepas de HP <i>cagA</i> positivo.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

HP: *Helicobacter pylori*

VEB: Vírus Epstein-barr

ESPGHAN: European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition

MALT: Tecido linfoide associado à mucosa

DRGE: Doença do Refluxo Gastroesofágico

PTI: Púrpura Trombocitopênica Idiopática

DUP: Doença Ulcerosa Péptica

AINH: Anti-inflamatório não hormonal

CG: Câncer Gástrico

PCR: Reação em cadeia de polimerase

DNA: Ácido dextrorribonucléico

BZLF: Left-ward open reading frame 1

BHRF1: Right-ward open reading frame 1

VCA: antígeno de capsídeo viral

ROS: espécies reativas de oxigênios

LB: Linfoma de Burkitt

CDC: Center for Disease Control and Prevention

UFPA: Universidade Federal do Pará

EDA: Endoscopia digestiva alta

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CONEP: Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

OMS: Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Helicobacter pylori.....	14
1.1.1 Considerações gerais.....	14
1.1.2 Fisiopatogenia.....	15
1.1.3 Doenças relacionadas ao HP.....	18
1.1.4 Transmissão.....	21
1.1.5 Diagnóstico.....	22
1.1.6 Tratamento.....	22
1.2 Vírus Epstein-barr.....	23
1.2.1 Considerações gerais.....	23
1.2.2 Fisiopatogenia.....	24
1.2.3 Doenças relacionadas ao VEB.....	26
1.2.4 Diagnóstico.....	27
1.2.5 Tratamento.....	28
1.3 Justificativa.....	28
1.4 Objetivos.....	29
2 Casuística e Métodos.....	30
2.1 Tipo de pesquisa.....	30
2.2 Local.....	30
2.3 População e amostra do estudo.....	30
2.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	30
2.5 Coleta de dados.....	30
2.6 Análise dos dados.....	34
3 RESULTADOS.....	35
4 DISCUSSÃO.....	40
5 CONCLUSÃO.....	46
REFERENCIAS.....	47
APÊNDICES.....	56
ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Infecções por *Helicobacter pylori* (HP) e vírus Epstein-Barr (VEB) são comuns no mundo todo, embora o HP seja o maior fator em doenças gastroduodenais, seu percentual de associação com VEB é incerto (SHUKLA *et al.*, 2011). Tanto o HP quanto o VEB compartilham mecanismos imunológicos de reação do hospedeiro que envolvem os linfócitos T, particularmente os CD8+. Sabe-se que a resposta linfocitária em alguns casos, deixa de ser protetora e passa ser responsável por uma resposta imunologicamente mediada e exacerbada (CARVALHO, 2006).

O HP é uma bactéria Gram negativa, microaerófila e espiralada, e causa inflamação crônica da mucosa gástrica em mais da metade da população do mundo (AMJAD *et al.*, 2010). A infecção por HP pode ser adquirida em qualquer faixa etária. Entretanto, a maioria dos estudos epidemiológicos indica a infância como o período mais frequente de aquisição da bactéria. Como esta infecção pode durar décadas, um diagnóstico ainda na infância pode diminuir o risco de uma possível evolução para patologias gástricas mais graves na fase adulta (BARILE *et al.*, 2009).

A via de transmissão mais provável do HP é a fecal-oral, por indivíduos infectados ou, indiretamente, pela água contaminada. Nível socioeconômico baixo, densidade populacional elevada na família, baixo grau de escolaridade e condições precárias de higiene contribuem para aumentar as taxas de transmissão. A doença acomete mais frequentemente indivíduos do grupo sanguíneo O e com história familiar positiva (PENNA *et al.*, 2008).

Embora a infecção não tenha repercussões clínicas significativas na maioria dos indivíduos infectados, em 15 a 20% dos casos ela resulta em complicações. Marcadores de virulência do HP, como, por exemplo, o gene *cagA*, codificam proteínas relacionadas à aderência da bactéria, à resposta inflamatória mais acentuada e a outros efeitos sobre as células gástricas, determinando a virulência da bactéria (PENNA *et al.*, 2008). Os efeitos do HP na mucosa são múltiplos, após iniciar uma infecção os pacientes apresentam gastrite aguda, que pode resolver espontaneamente, no entanto a maioria evolui para gastrite crônica ativa. Uma proporção de pacientes desenvolverá gastrite antral e pode, subsequentemente, progredir com úlcera duodenal e raramente Linfoma, outra proporção desenvolverá gastrite atrófica multifocal e se tornará grupo de risco para úlcera gástrica, câncer gástrico e raramente Linfoma (TAN; WONG, 2011).

Há vários métodos para o diagnóstico da infecção pelo HP, incluindo métodos invasivos e não invasivos. Para um diagnóstico mais acurado, tem se recomendado o uso de pelo menos dois testes (KOLETZKO *et al.*, 2011).

Conforme o último *Guideline* da Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN, 2011), no caso de doença ulcerosa gástrica ou duodenal associada a infecção por HP, o tratamento da infecção está indicado. Para os demais casos os benefícios e riscos do tratamento devem ser considerados, bem como os potenciais riscos da infecção bacteriana (KOLETZKO *et al.*, 2011). O regime terapêutico de primeira linha é composto de Inibidor de bomba de prótons, Imidazol e Amoxicilina ou inibidor de bomba prótons, Imidazol e Claritromicina (KOLETZKO *et al.*, 2011; KUO, 2012).

O vírus Epstein-Barr é um gamaherpesvírus que infecta a maioria das pessoas no mundo e é mantido por toda a vida em forma latente e lítica em linfócitos B e células epiteliais (SIVACHANDRAN; WANG & FRAPPIER, 2012). A taxa de endemicidade para o vírus Epstein-Barr varia conforme a região geográfica, sendo extremamente elevada no Norte da África (Argélia e Tunísia) e extremamente baixa no Norte da Europa (Dinamarca e Holanda). O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária entre aquelas duas regiões (SILVA & ZUCOLOTO, 2003). Muitas crianças são infectadas com VEB, e essa infecção usualmente é assintomática ou indistinguível de outros tipos de infecção. Quando a infecção ocorre durante a adolescência ou vida adulta, então ocorre a mononucleose infecciosa em 35 a 50% dos casos (CDC, 2012).

Após a infecção primária o vírus permanece indefinidamente nos linfócitos B e somente reativam quando a imunidade celular é alterada. Em indivíduos imunocomprometidos, desordens relacionadas ao VEB estão associadas a morbi-mortalidade. Até 15% de pacientes receptores de transplantes desenvolvem doença linfoproliferativa pós-transplante, um grupo heterogêneo de desordens caracterizadas por transformação de linfócito B pelo VEB (LAY *et al.*, 2010). O diagnóstico clínico é baseado nos sintomas e em testes laboratoriais, os quais incluem testes específicos e testes não específicos. Não há tratamento específico para a mononucleose, apenas se trata os sintomas. Nenhuma droga antiviral ou vacina é recomendada (CDC, 2012).

1.1 *Helicobacter pylori* (HP)

1.1.1 Considerações Gerais

Em 1984 Marshall e Warren publicaram sua investigação inicial a respeito do cultivo em mucosa gástrica humana de uma bactéria Gram negativa, conhecida atualmente como *Helicobacter pylori* (HP) e demonstrou seu efeito patogênico na úlcera péptica. Seu trabalho revolucionou a compreensão e o tratamento de patologias digestivas importantes como úlcera péptica e Câncer gástrico, pelo que foram premiados com o Nobel em Fisiologia e Medicina 2005 (ESPINO E., 2010). Desde então, um grande número de relatos sobre o HP e sua potencial patogenicidade tem sido produzidos (SANTACROCE & BUTHANI, 2010).

O HP é um dos patógenos mais comuns de infecções crônicas no homem, sendo considerado um importante problema de saúde pública (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Apesar do progresso fenomenal relacionado ao HP no mundo todo, um mistério em torno de sua patogênese gástrica permanece, particularmente em crianças (SINGH *et al.*, 2003).

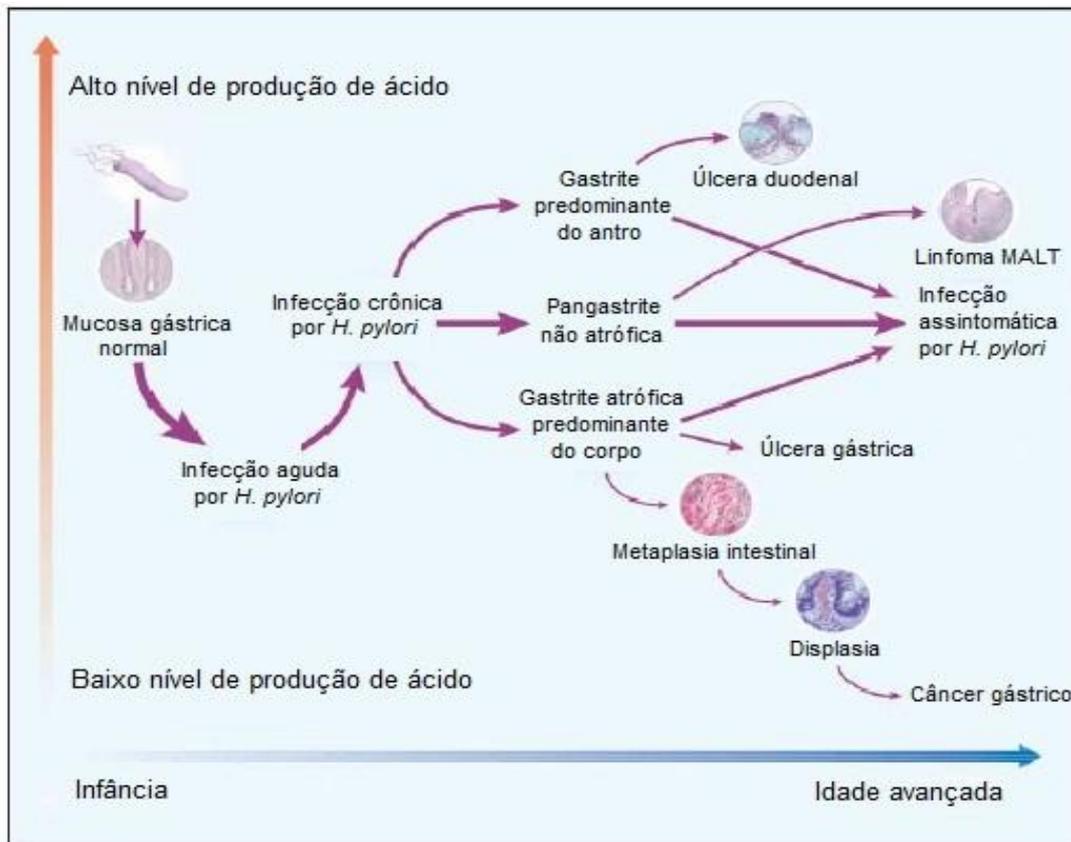
O HP é um bacilo Gram-negativo, de crescimento lento (SULTAN; LI & GREENE, 2009), com capacidade de colonizar e replicar no estômago e/ou duodeno humano (KAWAKAMI & MACHADO, 2003). O gênero *Helicobacter* é composto atualmente de, no mínimo, 27 espécies que compartilham propriedades comuns, especialmente aquelas relacionadas com a vida no estômago, onde podem localizar-se no fundo e no corpo, mas é principalmente no antro onde as bactérias são encontradas em maior densidade. Até o presente, a biotipagem, a análise do genoma e a diversidade plasmídica permitiram a identificação de cerca de quarenta cepas da bactéria não-relacionadas epidemiologicamente (LADEIRA; SALVADORI & RODRIGUES, 2003). As variações genômicas das cepas podem ser responsáveis pela codificação de diferentes fatores de virulência, capazes de determinar diversos tipos de lesão no hospedeiro (MALFERTHEINER, 2013). Assim, as diferentes cepas da bactéria com padrões de virulência distintos devem atuar no hospedeiro, levando a variados graus de inflamação da mucosa gástrica (SANTACROCE & BUTHANI, 2010; MALFERTHEINER *et al.*, 2013).

A bactéria tem distribuição universal e coloniza a mucosa gástrica de mais da metade da população mundial (HISHIDA *et al.*, 2010; BUCKER *et al.*, 2012). Sua prevalência não é uniforme entre as sociedades, varia conforme a região geográfica, situação socioeconômica e grupo étnico (MIRANDA *et al.*, 2010).

A prevalência estimada da infecção por HP em crianças de países desenvolvidos é baixa, no entanto na maioria dos países em desenvolvimento existe alta prevalência de

infecção por HP em crianças, que contribui para infecção crônica na maioria dos adultos jovens e população mais velha (SINGH *et al.*, 2003).

1.1.2 Fisiopatogenia



Fonte: SUERBAUM & MICHETTI *et al.*, 2002. Traduzido por Kátia Soares de Oliveira

Figura 1. História natural da infecção por *Helicobacter pylori*. O HP é usualmente adquirido na infância. Infecção aguda por HP causa hipocloridria transitória e é raramente diagnosticada. Gastrite crônica se desenvolve virtualmente em todas as pessoas persistentemente colonizadas, mas 80 a 90% nunca terão sintomas. A evolução clínica é altamente variável e depende de fatores do hospedeiro e da bactéria. Pacientes com alta produção de ácido são propensos a ter gastrite predominantemente antral, que predispõe a úlcera duodenal. Pacientes com baixa produção ácida são mais propensos a ter gastrite de corpo, o que predispõe a úlcera e pode iniciar a sequência de eventos que, em raros casos, leva ao carcinoma gástrico. Infecção por HP induz a formação de tecido linfóide associado a mucosa (MALT). Linfoma MALT é outra rara complicação da infecção por HP.

O HP é quase sempre adquirido na infância e se a infecção não for tratada permanece por toda a vida (DAS & PAUL, 2006). Os efeitos do HP na mucosa são múltiplos, após iniciar uma infecção os pacientes apresentam gastrite aguda, que pode resolver espontaneamente, no entanto a maioria evolui para gastrite crônica ativa (Figura 1).

Uma proporção de pacientes desenvolverão gastrite antral e pode, subsequentemente, progredir com úlcera duodenal e raramente Linfoma, outra proporção desenvolverá gastrite atrófica multifocal e se tornará grupo de risco para úlcera gástrica, câncer gástrico e raramente Linfoma (TAN& WONG,2011).A bactéria é caracterizada por um alto nível de diversidade genética que pode ser importante para a adaptação no estômago do hospedeiro e no prognóstico clínico da infecção. Diferenças genéticas em HP isolados de pacientes Mexicanos com várias patologias gástricas, incluindo câncer gástrico mostram padrões de genes associados às doenças (COSTA; FIGUEIREDO & TOUATI, 2009).

Fatores que determinam o desenvolvimento de doenças em pacientes infectados comparados com portadores permanecem não claros, no entanto fatores do hospedeiro e da bactéria contribuem para as diferenças na patogenicidade (DAS & PAUL, 2006). Dentre os múltiplos mecanismos de patogenicidade, se podem agrupar aqueles dependentes da bactéria, do hospedeiro e do meio. Entre os fatores de virulência da bactéria se destacam os fenótipos *cagA* e *vacA* (ESPINO E., 2010; DELAHAY & RUGGE 2012).

O sucesso da infecção gástrica por HP deve-se ao fato de possuir flagelo, ser capaz de produzir enzimas tóxicas, especialmente lipase, urease e proteases, desregulando os fatores defensivos do epitélio, além de apresentar alguns fatores que ajudam na aderência à célula hospedeira (LIMA & RABENHORST, 2009). A enzima urease, é uma proteína de alto peso molecular (500 a 600 KDa), atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia. Esta atua como receptor de íons H⁺, gerando pH neutro no interior da bactéria, o que confere ao HP resistência à acidez gástrica (LADEIRA; SALVADORI & RODRIGUES, 2003).

A camada de muco do estomago é formada por um gel viscoelástico que confere proteção química e mecânica ao revestimento epitelial, inclusive contra bactérias. No entanto lípases e proteases sintetizadas pelo HP degradam a camada de muco, facilitando a progressão da bactéria. Além disso, o HP move-se facilmente devido à morfologia em espiral e aos flagelos e, assim, atravessa a camada de muco, estabelecendo íntimo contato com as células epiteliais de revestimento.

Outras enzimas, sintetizadas pela bactéria como superóxido dismutase, catalase e arginase conferem proteção contra atividade lítica dos macrófagos e neutrófilos impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (LADEIRA; SALVADORI & RODRIGUES, 2003).

Dentre os fatores de virulência da bactéria, se destacam os fenótipos *vacA* e *cagA*, dois dos mais importantes genes do HP (KAWAKAMI & MACHADO, 2003; WANG, YUAN & HUNT, 2007; ESPINO, 2010).

O gene *vacA* codifica a produção da citotoxina vacuolizante (SINGH *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2010), um importante fator de virulência na patogênese da ulceração péptica e câncer gástrico. Esta toxina pode levar a múltiplas atividades celulares, induzindo a vacuolização celular, formação de canal de membrana, disruptura da função do endossomo/lisossoma, apoptose e imunomodulação (WANG; YUAN & HUNT, 2007; COSTA; FIGUEIREDO & TOUATI, 2009; LIMA & RABENHORST, 2009;). O gene *vacA* está presente em todas as cepas do HP, mas a atividade citotóxica tem se mostrado ocorrer somente em 50% das mesmas (CHUNG *et al.*, 2010).

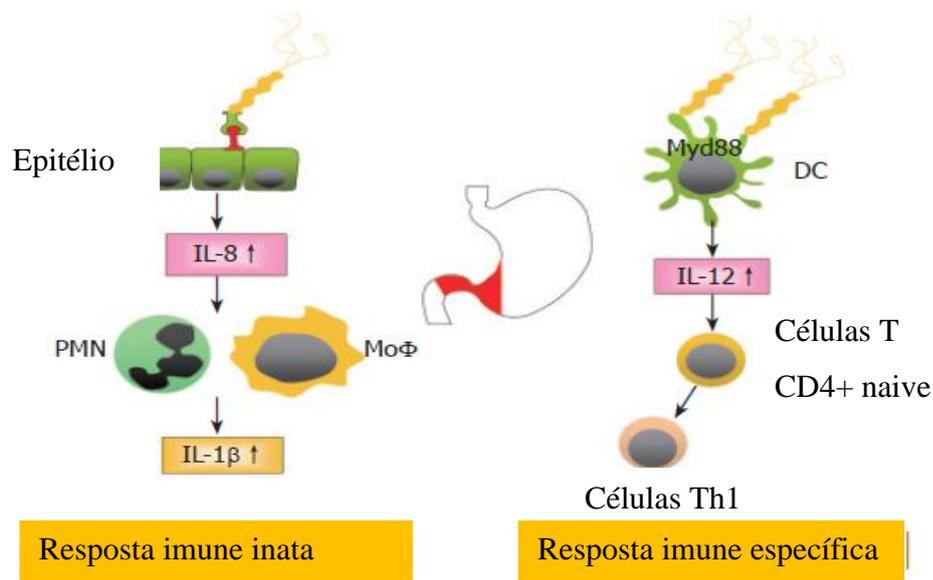
O gene *cagA* foi identificado em 1989, é encontrado na ilha de patogenicidade *cag* (PAI), um elemento insercional de 40 kb que contém cerca de 31 genes, presente em 60% a 90% das cepas mundiais, 60% das cepas ocidentais e está formalmente associada ao risco para desenvolvimento de câncer gástrico (COSTA; FIGUEIREDO & TOUATI, 2009; LIMA & RABENHORST, 2009). Codifica a proteína *cagA*, que estimula a produção de fatores quimiotáticos para neutrófilos pelo epitélio gástrico do hospedeiro (WANG; YUAN & HUNT, 2007). A proteína *cagA* de HP atua como antígeno altamente imunogênico (LIMA & RABENHORST, 2009). Translocação da proteína *cagA* dentro das células do epitélio gástrico causam rearranjo do citoesqueleto do hospedeiro e altera a sinalização celular, perturbando o controle do ciclo celular (COSTA; FIGUEIREDO & TOUATI, 2009). Além do mais, cepas *cagA*-positiva são conhecidamente indutoras da expressão da DNA-*editing enzyme*, que leva ao acúmulo de mutações na P53, proteína supressora tumoral. (DELAHAY & RUGGE 2012). Um estudo mostrou significativa associação entre soropositividade *cagA* e eventos coronarianos agudos (MALFERTHEINER, 2013).

Conforme Vitoriano *et al.* (2011), fatores de virulência, como *cagA*, além de outros, estão associados à doença ulcerosa péptica em crianças e podem determinar o desfecho clínico da infecção.

As diferenças quanto ao potencial patogênico do gene *cagA* podem ser devidas a variações na sua estrutura gênica. A estrutura do gene *cagA* apresenta uma região 5' altamente conservada, mas com uma região 3' com número variável de sequências repetitivas, sendo subtipado de acordo com seu tamanho: *cagA* subtipo A (621-651 pb), subtipo B (732-735pb), subtipo C (525 pb) e subtipo D (756 pb). As cepas *cagA* positivas tendem a ser mais virulentas, induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como: IL-1b e IL-8

(LIMA & RABENHORST, 2009) e estão associadas com alto risco para câncer gástrico (PRINZ, SCHWENDY & VOLAND, 2006; MBULAITEYE, HISADA & EL-OMAR, 2010).

No que se refere ao hospedeiro, conforme Ladeira, Salvadori & Rodrigues (2003), durante a infecção pelo HP há predomínio de células Th1 (Figura 2), enquanto as Th2 estão praticamente ausentes, o que resulta em uma resposta imune inadequada que não consegue eliminar o microrganismo. Essas células Th1 induzem a produção de anticorpos e citocinas que contribuem para o aumento do processo inflamatório, com consequentes danos ao hospedeiro. Segundo Bittencourt *et al* (2006) , na infecção, especialmente por amostras *cagA* positivas, há aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-8, IL-1beta e TNF-alfa.



Fonte: PRINZ; SCHWEND & VOLAND *et al.*, 2006.

Figura 2: *Helicobacter pylori*: resposta imune e supressão.

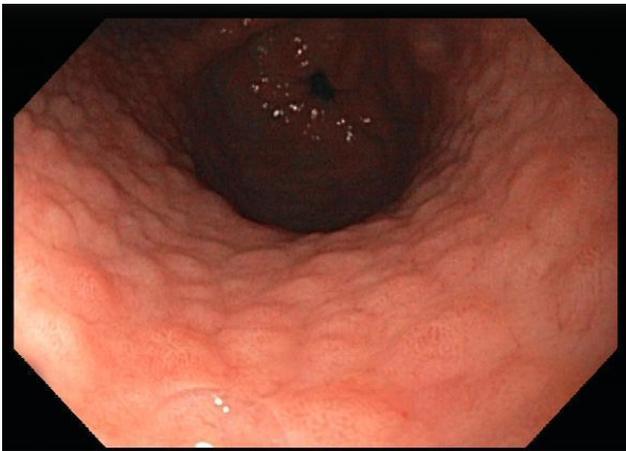
A bactéria contraída primariamente na infância e a infecção precoce na vida parece aumentar o risco de carcinogênese (CANDELLI *et al.*, 2004). O risco de evolução para câncer gástrico está relacionado ao genótipo do HP (SANTACROCE & BHUTANI, 2008; CABEBE & MEHTA, 2009), no entanto, o curso da progressão da inflamação para o câncer permanece obscuro (SULTAN *et al.*, 2009).

1.1.3 Doenças relacionadas ao HP

Tem-se demonstrado uma forte associação, sustentada em provas epidemiológicas, clínicas e experimentais, entre a infecção por HP, gastrite crônica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma gástrico de tecido associado a mucosa (MALT) (ESPINO

E., 2010). Recentemente, uma potencial associação da infecção por HP com outras doenças digestivas como doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), bem como patologias extra digestivas, anemia ferropriva, retardo do crescimento, púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), asma e desordens alérgicas tem sido sugeridas. A hipótese da associação do HP com tais manifestações extra digestivas, baseia-se no fato de que a bactéria provoca efeitos sistêmicos, a infecção é um processo crônico que pode levar décadas e ainda que a infecção persistente induz a inflamação crônica e a resposta imune que é capaz de causar lesões tanto no sítio da infecção quanto à distancia (PACIFICO *et al*, 2010).

Após a infecção inicial com HP, os pacientes, geralmente desenvolvem gastrite aguda, que pode resolver espontaneamente com o desaparecimento da infecção, no entanto a maioria progride para gastrite crônica ativa (TAN & WONG, 2010).



Fonte: SANTACROCE & BHUTANI, 2008.

Figura 3: Infecção por *Helicobacter pylori* revelada por Endoscopia (Gastropatia nodular).

Gastrite aguda resulta histologicamente em gastrite neutrofílica, acompanhada por infiltração gradual por todas as classes de células inflamatórias. Após a gastrite aguda, dois padrões de gastrite crônica são observados com diferentes topografias associadas a diferentes doenças (TAN & WONG, 2010). Durante a infância, a infecção com HP está associada geralmente a gastrite antral (Figura 3) e úlcera duodenal. Uma análise de relatos de 1983 a 1994 mostrou um percentual de gastrite antral em crianças de 1,9 a 71,0% . Há evidências que suportam uma associação entre infecção a longo prazo e gastrite atrófica, metaplasia, com desenvolvimento de adenocarcinomas indiferenciados e de tipo intestinal em adultos. Contudo, gastrite atrófica e metaplasia intestinal, de fato tem sido descrita em crianças vivendo em países com alta incidência para câncer gástrico, e às vezes são encontradas em indivíduos muito jovens (PACIFICO *et al*, 2010). Uma variedade dos polimorfismos tanto

da bactéria, quanto do hospedeiro está associada à severidade e/ou tipo de gastrite (FURUTA & DELCHIER, 2009).

Doença ulcerosa péptica (DUP) afeta 10% da população no mundo e o HP e o uso de AINH são os dois principais fatores associados com à mesma. Com a descoberta do HP, causas, patogênese e tratamento da DUP têm sido redefinidos nos últimos 25 anos (UYANIKOGLU *et al.*, 2012). A erradicação do HP reduz marcadamente o percentual de recorrência da úlcera duodenal em crianças infectadas. Têm sido publicados poucos estudos envolvendo crianças para investigar a prevalência do HP em úlcera péptica (PACÍFICO *et al.*, 2010).

O percentual preciso de infecção por HP como causa de Dispepsia não-ulcerosa ou funcional tem sido um dos debates mais controversos na comunidade médica, desde a sua descoberta (PACIFICO *et al.*, 2010). Os genótipos das cepas de HP que infectam a população pediátrica com e sem dor abdominal na ausência de úlcera são largamente desconhecidos no mundo (SINGH *et al.*, 2003).

O câncer gástrico (CG) é o quarto tipo de câncer mais comum no mundo, é a segunda causa mais comum de morte por câncer (700.000 casos por ano); Quase 2/3 desses casos ocorrem em países em desenvolvimento, sendo 42% somente na China (PARKIN *et al.*, 2005). Embora, nos últimos anos, venha ocorrendo um declínio na incidência do CG em vários países, inclusive no Brasil, ele ainda causa a morte de aproximadamente um milhão de pessoas e é considerado um sério problema de saúde pública (CALCAGNO *et al.*, 2008). O câncer gástrico é uma doença multifatorial, entre os fatores envolvidos na carcinogênese gástrica, destaca-se a infecção por HP (LIMA & RABENHORST, 2009; MALFERTHEINER *et al.*, 2013), que desde 1994 é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um agente carcinogênico do tipo I (LIMA & RABENHORST, 2009). A infecção por HP aumenta cerca de seis vezes a incidência desse tipo de câncer (VENKATESHWARI *et al.*, 2011). Entre os fatores patogênicos da bactéria que aumentam o risco de câncer gástrico os mais importantes são o *cagA* e *vacA* (MALFERTHEINER *et al.*, 2013). Em relação às malignidades gástricas associadas ao HP na infância, tem poucos casos de Linfoma gástrico (MALT) e em relação ao adenocarcinoma não há relato (PACIFICO *et al.*, 2010).

A relação entre HP e DRGE é controversa. A maioria dos estudos mostra que a infecção com HP protege contra o desenvolvimento da DRGE ou pode reduzir sua severidade, no

entanto, alguns poucos estudos sugerem que o HP pode agravar a DRGE (GHOSHAL & CHOURASIA, 2010).

Após uma descrição pioneira por Gasbarrini *et al.* (1998) a associação entre HP e PTI obtiveram formal reconhecimento com recomendação de que o HP deve ser investigado e tratado em pacientes com PTI (PELLICANO *et al.*, 2009). Os efeitos da erradicação do HP em crianças com PTI são diferentes daqueles observados nos adultos. Em revisão por Pacifico *et al.* (2010), conclui-se que a relação entre PTI e HP em crianças requer futuras investigações com estudos controlados e randomizados com suficiente amostra, controle e diferentes grupos étnicos populacionais.

A ligação entre HP e retardo de crescimento permanece tênue (MOURAD-BAARS, HUSSEI & JONES, 2010). Estudos mais recentes mostram que há discussão em andamento sobre a associação entre HP e retardo do crescimento. Nos últimos anos 2 estudos foram adicionados a esse tema, ambos não sustentam um percentual de HP na falha de crescimento na criança (KINDERMANN & LOPES, 2009).

Em adição às causas já conhecidas de anemia ferropriva, nas últimas décadas a associação entre HP e anemia ferropriva tem se estabelecida (PACIFICO *et al.*, 2010). Em revisão realizada por Huang *et al.* (2010), concluiu-se que a erradicação do HP associada a administração de ferro é mais efetiva que administração somente de ferro para o tratamento da anemia ferropriva em pacientes com infecção por HP e, ainda que pacientes com anemia ferropriva refratária devem ser considerados para investigação e tratamento de HP.

Revisões sistemáticas indicando o efeito da terapia com antibiótico para pacientes com urticária crônica e infectados com HP revelaram que a resolução da urticária foi mais eficiente quando a terapia para HP foi realizada com sucesso (WEDI *et al.*, 2009).

Conforme Pacífico *et al.* (2010), parece existir uma relação inversa entre a infecção por HP e asma, especialmente em crianças, no entanto mais estudos são necessários para esclarecer a associação entre asma e o comportamento do HP em crianças de países desenvolvidos e em desenvolvimento.

1.1.4 Transmissão

A infecção pelo HP, em países desenvolvidos, ocorre após os três ou cinco anos de idade; já em países em desenvolvimento, crianças com menos de um ano podem estar contaminadas (LADEIRA, SALVADORI & RODRIGUES, 2003; CANDELLI *et al.*, 2004).

Estudos tem demonstrado que a família tem uma importante função na transmissão da infecção. Conforme Azevedo, Huntington & Goodman (2009), a transmissão intrafamiliar por

contato direto pessoa-pessoa tem sido o maior modo de transmissão (LADEIRA, SALVADORI & RODRIGUES, 2003).

A transmissão direta pessoa-pessoa pode ocorrer via fecal-oral, gastro-oral ou ora-oral. As tonsilas têm sido propostas como um reservatório extra-gastro-duodenal para a bactéria, mas um único estudo demonstrou que a remoção das tonsilas não afetou o risco de transmissão do HP (AZEVEDO, HUNTINGTON, GOODMAN, 2009). Atualmente os mecanismos de transmissão favoráveis parecem ser a via fecal-oral e gastro-oral (TAN & WONG, 2011).

1.1.5 Diagnóstico

Uma variedade de testes para detecção do HP tem sido descritos, eles são divididos em testes invasivos e testes não invasivos. Os métodos não invasivos compreendem a pesquisa de anticorpos anti HP em amostras de soro, urina e saliva, a pesquisa de antígenos de HP nas fezes e o teste respiratório com uréia marcada com carbono-13, isótopo não radioativo. Métodos diagnósticos invasivos requerem biópsias endoscópicas e incluem teste rápido da urease, exame histológico e cultura (MONTEIRO *et al.*, 2009; KOLETZKO *et al.*, 2011).

Métodos auxiliares incluem imunohistoquímica, hibridização *in situ* e reação em cadeia de polimerase (PCR) (ZSIKLA *et al.*, 2006). Os métodos baseados em biologia molecular são considerados testes altamente sensíveis e específicos, e muitas técnicas de PCR tem sido desenvolvidas para detecção do DNA do HP na saliva, fezes e em biópsias gástricas (RIBEIRO *et al.*, 2007).

A PCR permite a detecção direta da presença do HP a partir de biópsias gástricas a fresco, congeladas ou fixadas em parafina (FRANCISCO JÚNIOR *et al.*, 2004; ZSIKLAS, 2006). Nos últimos anos, a PCR tem sido usada, também, para genotipagem do HP, o que tem contribuído para discriminação das diferentes cepas (MONTEIRO *et al.*, 2010).

1.1.6 Tratamento

Vários *guidelines* para o tratamento da infecção por HP estão disponíveis no mundo (SHIOTA & YAMAOKA, 2010). Conforme Asaka, *et al.* (2009), a erradicação para o HP não é somente nos casos de úlcera gástrica ou duodenal, mas também para tratamento e prevenção de doenças associadas à bactéria como câncer gástrico, bem como para impedir a extensão da infecção.

No entanto, após mais de 20 anos de experiência em tratamento do HP, ainda não há um Esquema terapêutico ideal. O regime medicamentoso mais utilizado é a terapia com

claritromicina, amoxicilina e um inibidor de bomba de prótons (MACHADO, SILVA & VIRIATO, 2008). Porém, grandes estudos de triagem clínica e metanálises tem mostrado que a maioria dos esquemas de primeira linha usados tem falhado em mais de 20% dos pacientes, devido a intervenção de fatores como aderência ao tratamento e à resistência antibiótica (GISBERT, 2009; O'CONNOR, GISBERT & O' MORAIN, 2009). Em metanálise por Suzuki et al, citado por Amjad et al.(2010), observou-se que a falha terapêutica foi mais elevada nos pacientes *cagA* positivo quando comparados aos pacientes *cagA* negativo.

1.2 Vírus Epstein-Barr (VEB)

1.2.1 Considerações Gerais

O VEB é um vírus da família herpesviridae com genoma composto de fita dupla de ácido desoxirribonucleico (DNA) e cosmopolita (TANAKA, 2012). É uma das viroses mais comuns em humanos, aproximadamente 90% da população mundial é infectada, predominantemente estabelece infecção latente em linfócitos B e células epiteliais (ELZBIETA; BRONIARCZYK & GOZDZICKA-JOZEFIAK, 2011). O VEB foi originalmente descrito por Epstein e colaboradores (1964) a partir de investigações realizadas em cultivo *in vitro* de amostras suspeitas de linfomas enviadas por Burkitt, nos quais através da microscopia eletrônica, foi possível identificar a presença de um vírus com morfologia típica dos vírus do grupo Herpes. Coube a Henle & Henle (1966) a utilização da técnica de imunofluorescência indireta nos primeiros estudos soropidemiológicos com VEB. Em 1968, com base na soroconversão, esses autores descreveram a associação do vírus à mononucleose infecciosa, achado que, posteriormente, seria confirmado por outros estudos (MONTEIRO, 2010). Na década de 1980, o VEB foi associado ao linfoma não Hodgkin e à leucemia de células pilosas, em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Desde então, o VEB tem sido identificado em vários tumores, incluindo as síndromes linfoproliferativas de células B, o linfoma de células T e a doença de Hodgkin. Em 1997, o VEB foi classificado pela *International Agency for Research on Cancer*, como um carcinógeno de grau I (SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

Dois tipos de VEB já foram isolados e caracterizados, inicialmente designados A e B com base na expressão de sequência gênica e habilidade de transformação do linfócito B infectado, posteriormente uma nova classificação foi proposta, denominando-os de tipos 1 e 2 com base na nomenclatura dos herpesvírus (MONTEIRO, 2010).

Como outros herpesvírus, o VEB tem a capacidade de produzir infecção latente, que periodicamente se reativa, produzindo três formas de latência. A importância dessa reativação de latência está no fato da maioria dessas infecções serem adquiridas na infância e na hipótese do surgimento, no futuro, de câncer nos adultos (CARVALHO, 2006).

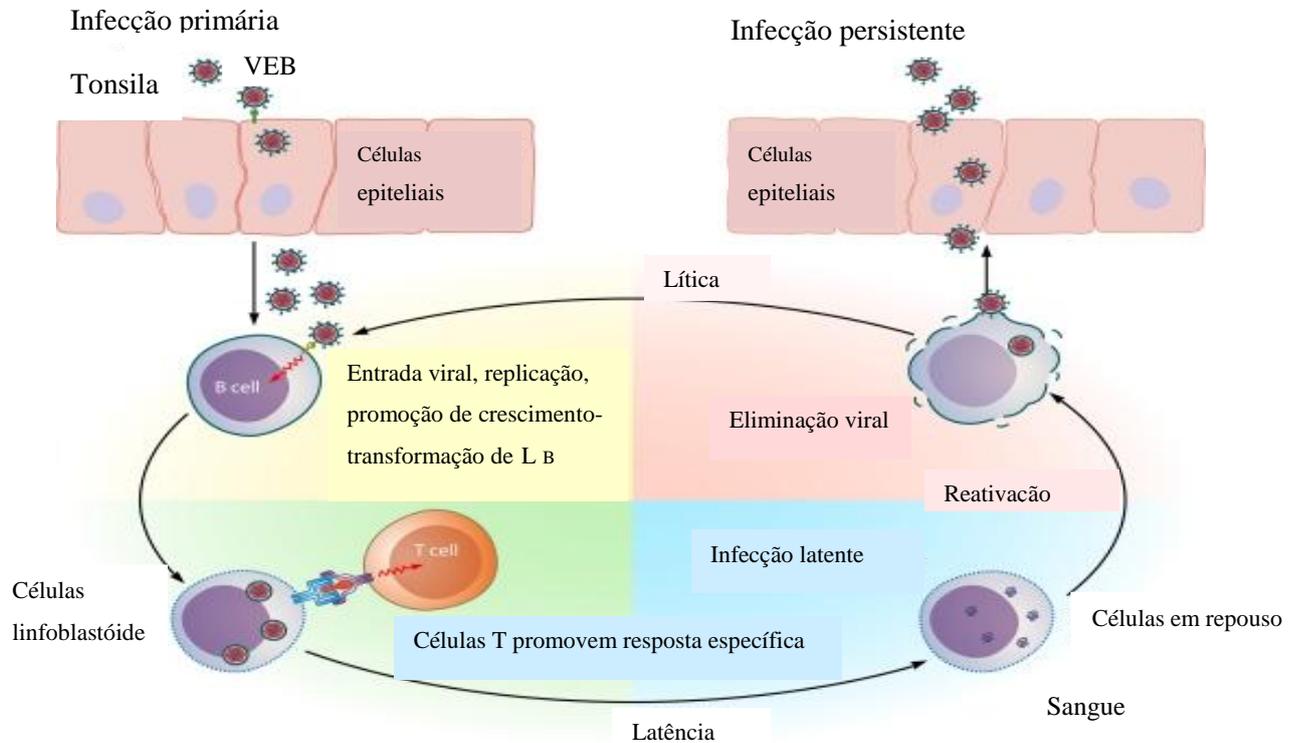
A transmissão é mediada pela saliva, principalmente pelo beijo, possivelmente por perdigotos. Inicialmente, o VEB infecta células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares. Posteriormente, os vírus disseminam-se para os tecidos linfóides subjacentes infectando o linfócito B, que representa o principal reservatório viral. Durante a infecção primária, os vírus presentes na saliva podem também penetrar nas criptas de estruturas linfoepiteliais, atravessando uma fina camada superficial de células epiteliais para alcançar diretamente os linfócitos subjacentes (LIMA, 2006). Em contraste com estudos realizados *in vitro*, ainda não se estabeleceu *in vivo*, o local da replicação do VEB. A mononucleose infecciosa e a leucoplasia pilosa oral são utilizados como modelos para estudo do mecanismo de replicação do vírus. As tonsilas parecem ser candidatas para o sítio de replicação do VEB (DIAS *et al.*, 2009).

A exposição ao VEB via secreção oral ou sangue é um gatilho para o início da infecção de linfócitos B da cavidade oral e células epiteliais. A manifestação clínica da mononucleose acontece 5 a 7 semanas após o contato. Porém existem poucos dados sobre os eventos virais e imunológicos durante o período de incubação (TANAKA, 2012).

1.2.2. Fisiopatogenia

A infecção primária começa na cavidade oral (Figura 4). Com a entrada do vírus a célula segue a ocorrência de duas possíveis formas de infecção denominada de infecção lítica e infecção latente. O VEB se liga a células B via ligação da proteína viral GP350 para CD21 sobre as células B. Em células epiteliais que faltam CD21, a proteína BMRF-2 do VEB interagem com integrinas (205, 219, 220), e proteínas gH/gL do vírus desencadeando a fusão via interação com integrinas $\alpha\beta 6/8$ (ODUMADE, HOGQUIST & BALFOUR JÚNIOR, 2011). Durante a infecção lítica o DNA do VEB incorpora-se ao genoma do linfócito, sendo transcrito e replicado no núcleo. O primeiro gene a ser expresso é o BZLF (*Left-ward open reading frame 1, BamHI Z*) que age como gatilho para a replicação viral, resultando na produção de outras proteínas como BHRF1 (*Right-ward open reading frame 1, BamHI*), que é responsável pela produção das enzimas DNA-polimerase e timidina-quinase. Outras proteínas são produzidas, tais como os antígenos do capsídeo viral (*Capsid viral antigen-VCA*), antígenos precoces (*Early antigen-EA*) capazes de romper células latentemente infectadas

pelo VEB e iniciar a replicação viral lítica. Após a infecção inicial, o DNA do VEB permanece no núcleo do linfócito como DNA epissomal, circular. Em infecções *in vitro* ocorre a transformação dos linfócitos B em linhagens linfoblásticas de crescimento permanente (MONTEIRO, 2010).



FONTE: ODUMADE AO et., 2011. Traduzido por Kátia Soares de Oliveira

Figura 4. Infecção por VEB em indivíduos saudáveis. A infecção primária começa na cavidade oral. VEB usa diferentes glicoproteínas para infectar as células epiteliais e células B *naive*. A entrada viral resulta em transporte do genoma VEB dentro do núcleo das células B, onde ocorre a replicação por polímeros de DNA viral e celular. Os produtos de genes do VEB ativam o crescimento de células B resultando em proliferação de células linfoblásticas, ativação de células T pela presença de antígenos ocorre em paralelo. Normalmente, estas células linfoblásticas são destruídas pelos linfócitos T citotóxicos. Uma vez na circulação, células B de memórias previamente ativadas podem continuar com a replicação lítica ou entrar em fase de latência. Por último, como as células recirculam entre compartimentos oral e periféricos, células B podem ser ativadas, resultando reativação viral e replicação.

No estado epissomal, o VEB é descrito como latente, sendo replicado apenas durante a mitose da célula hospedeira. Apesar de seu genoma poder codificar cerca de 100 genes, pode-se verificar a expressão de até 12 genes durante a latência, dependendo do tipo celular ou do estado imunológico do hospedeiro (LIMA, 2006). Os produtos desses genes incluem seis antígenos nucleares do VEB (EBNAs 1, 2, 3A, 3B e 3C e EBNA-LP), três proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-2A e LMP-2B), duas pequenas moléculas de RNA (EBER-1 e 2) (IWATA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012). A detecção dos marcadores de infecção latente

varia de doença para doença, seguindo 4 tipos de expressão, a latência I que é encontrada no Linfoma de Burkitt e carcinoma mamário, é limitada aos genes EBNA1 com ou sem a expressão dos genes EBERs, a latência II que é característica do Linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, inclui LMP 1 e 2 adicionalmente, a latência III que está associado às desordens linfoproliferativas pós transplantes, é definida pela expressão do gene EBER e todos as seis proteínas EBNA e as duas proteínas LMP e a latência IV que se associa ao portador saudável e é definida pela expressão do LMP 1 e 2 e os genes EBERs (SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

O EBNA1 é essencial para a persistência e replicação do genoma do VEB em células com infecção latente, é também a única proteína viral consistentemente expressa em todos os tecidos malignos associados ao VEB (CHEN *et al.*, 2012). A proteína do antígeno nuclear 1 (EBNA-1) liga-se ao DNA viral fazendo com que o genoma do vírus permaneça na célula infectada como um epissomo circular e a expressão da LMP-1 em indivíduos imunodeprimidos pode induzir a transformação de linfócitos B e o surgimento de processos linfoproliferativos (DIAS *et al.*, 2009). Recentemente tem sido mostrado que a EBNA1 induz instabilidade genômica e a lesão de DNA mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHEN *et al.*, 2012).

1.2.3. Doenças Associadas ao VEB

O VEB causa um variado espectro de doenças desde a mononucleose infecciosa até o linfoma de células B (ZELLOS *et al.*, 2013): A mononucleose infecciosa é causada pela infecção aguda do VEB. Tem sido relatado que aproximadamente 90% dos casos de mononucleose são causados pelo VEB. Em países industrializados há grande possibilidade de desenvolver mononucleose se a infecção por VEB ocorre na segunda década de vida. Em países em desenvolvimento a primeira infecção é mais frequente na primeira década de vida (SALDAÑA *et al.*, 2012).

Além da mononucleose, o VEB está associado ao Linfoma de Burkitt (LB), carcinoma faríngeo, linfoma de células T e células Natural Killer e carcinoma gástrico, doenças autoimunes como lúpus eritematoso e esclerose múltipla. (DIAS *et al.*, 2009; ELZBIETA, BRONIARCZYK & GOZDZICKA-JOZEFIAK, 2011).

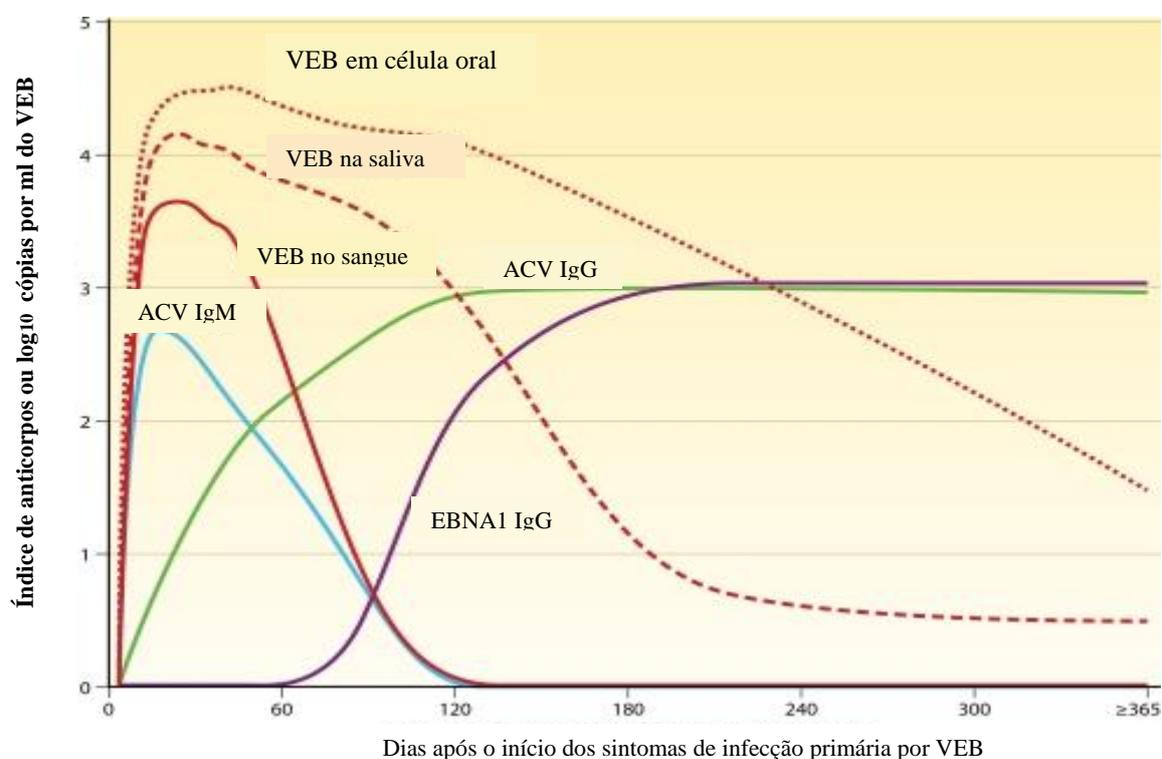
O LB foi a primeira neoplasia em humanos associada a um vírus oncogênico e desde então é considerado um paradigma na etiopatogenia dos linfomas. Apresenta duas formas distintas: a forma endêmica e a esporádica (KLUMB, 2001). Em países africanos como

Uganda, no cinturão do linfoma, a associação de LB com VEB é muito forte (97%), na França e Estados Unidos 10 a 15 % dos LB estão associados ao VEB (WHO, 2013).

Carcinoma gástrico associado ao VEB representa aproximadamente 10% dos carcinomas no mundo, no entanto a proporção varia de um país para outro, sendo o percentual de 1,3 a 20,1% (CHEIN, 2012). No Brasil, a frequência da infecção por VEB varia de 8 a 11,3% nas amostras de Câncer Gástrico estudadas (LIMA, 2006).

1.2.4. Diagnóstico

Na maioria dos casos de Mononucleose infecciosa, o diagnóstico é feito com base na tríade febre, faringite e linfonodomegalia por 1 a 4 semanas. Testes sorológicos incluem testes específicos e não específicos (CDC, 2012).



FONTE: ODUMADE AO et., 2011. Traduzido por Kátia Soares de Oliveira

Figura 5. Cinética dos anticorpos VEB específicos e carga viral na mononucleose infecciosa. O gráfico mostra a evolução da replicação viral e anticorpos VEB específicos mensurados por ELISA durante a infecção primária. Na apresentação, o VEB pode não ser detectado no sangue, mas é geralmente encontrado em grande quantidade na cavidade oral. O vírus desaparece do sangue mais rapidamente que no compartimento oral. A replicação viral oral pode persistir por meses e recuar intermitentemente por anos na maioria dos adultos saudáveis. No início da doença, a maioria dos pacientes tem anticorpos IgM para o ACV do VEB; Estes declinam entre 2 e 6 meses após a infecção. Os anticorpos IgG para o ACV podem ser detectados tão precocemente como durante as 2 primeiras semanas de doença. Essencialmente 100% dos pacientes tem IgG para o ACV detectáveis durante a convalescência e persiste por toda a vida. Anticorpos IgG para EBNA1 não se desenvolvem até 3 a 6 meses após a infecção mas persiste por toda a vida.

Dentre os testes específicos para detectar o VEB encontra-se a imunofluorescência indireta que distingue infecção aguda, período de convalescência e infecção prévia. Na infecção aguda há anticorpos IgM contra o antígeno do capsídeo e ausência de anticorpos IgG contra o antígeno latente EBNA1. Os anticorpos IgG contra o antígeno do capsídeo viral podem estar presentes mas em menor quantidade do que o IgM. Na convalescência há diminuição do anticorpo IgM e aumento do IgG, que podem persistir indefinidamente (Figura 5) (TANAKA, 2012).

Diversas técnicas moleculares estão sendo utilizadas para a demonstração da presença do VEB, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a HIS. A HIS para detecção do RNA viral EBERs é o padrão ouro para detectar VEB em tecidos (ODUMADE *et al.*, 2011).

1.2.5. Tratamento

Não há tratamento específico para a mononucleose, apenas se trata os sintomas. Nenhuma droga antiviral ou vacina é recomendada (CDC, 2012).

1.3 Justificativa

Apesar da descoberta recente do HP, seu estudo tem sido considerado um dos mais importantes temas da atualidade. Sua descoberta revolucionou o tratamento da doença ulcerosa péptica, no entanto, muitos aspectos sobre seu diagnóstico e tratamento continuam obscuros. Além disso, o potencial carcinogênico do HP, demonstrado em diversos estudos, o torna objeto de grande importância para pesquisas científicas.

A descoberta de fatores de virulência distintos, levando a diferentes graus de inflamação da mucosa gástrica abre a perspectiva de investigação a fim de conhecer os mais prevalentes em crianças, haja vista que a infecção primária, geralmente, ocorre na infância. No Brasil, onde a aquisição de HP ocorre, na maioria das vezes, precocemente na infância, em especial na população de baixo nível sócio econômico, estudos dessa natureza são escassos. Com relação ao VEB, em virtude de suas conhecidas implicações é importante conhecer sua prevalência na faixa etária pediátrica e sua correlação com a prevalência de *Helicobacter pylori*.

1.4 Objetivos

1.4.1 Geral

- Verificar a prevalência de infecção pelo Vírus Epstein-Barr e por *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes.

1.4.2 Específicos

- Correlacionar os achados endoscópicos e histopatológicos a infecção por *Helicobacter pylori*;
- Verificar a prevalência do fator de virulência *cagA* positivo nos pacientes com *Helicobacter pylori*;
- Correlacionar o fator de virulência *cagA* aos achados histopatológicos nos pacientes com *Helicobacter pylori*;
- Verificar a correlação entre infecção por *Helicobacter pylori* e vírus Epstein-Barr em crianças e adolescentes.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Tipo de pesquisa

Estudo descritivo, do tipo transversal tendo sido submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (UFPA), (Protocolo 35/2010) (ANEXO A). A coleta das amostras foi iniciada após aprovação do CEP e autorização dos pais ou responsáveis dos pacientes estudados, por meio de termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

2.2 Local e período do estudo

A pesquisa foi realizada no Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Amazônia e ENDOCLINE, em Belém-Pará, no período de julho/10 a junho/11.

2.3 População e amostra do estudo

A população foi composta de pacientes atendidos no Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Amazônia e ENDOCLINE. Foram utilizados fragmentos de mucosa gástrica de pacientes com faixa etária entre 12 meses e 19 anos de idade atendidos nos referidos Serviços.

A amostra foi composta pelos pacientes que preencheram os critérios de inclusão.

2.4 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com idade de 12 meses a 19 anos de idade, encaminhados para endoscopia digestiva alta (EDA) para esclarecimento de manifestações clínicas relativas ao trato digestivo alto. Foram excluídos os pacientes com idade inferior a 12 meses ou maior ou igual a 20 anos; pacientes que receberam terapia antimicrobiana, bloqueador de receptores de H₂, inibidores de bomba de prótons e/ou anti-inflamatórios não hormonais nos últimos 30 dias antes da biópsia; pacientes com hipertensão portal recebendo injeção de escleroterapia ou ligadura de varizes; pacientes com impedimento anatômico à EDA, com distúrbios da coagulação, com doenças graves ou com sedação insuficiente ou apresentando reações colaterais graves às drogas utilizadas para a sedação ou anestesia.

2.5 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada durante onze meses, seguindo o cronograma definido para seu desenvolvimento. Para o estudo foi elaborado formulário de pesquisa (APÊNDICE

B) com as seguintes variáveis: nome, idade, sexo, procedência, diagnóstico endoscópico, histopatológico, Teste da Urease, *cagA*, hibridização *in situ* para VEB. Foram coletados 2 fragmentos de mucosa antral e duodenal obtidos por EDA sendo os mesmos armazenados em meio ALLPROTECT, acondicionados em caixa térmica até a chegada ao Laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA), quando foram armazenados em Freezer (Figura 6). Posteriormente 01 fragmento foi usado para pesquisa do HP e outro para pesquisa do VEB.

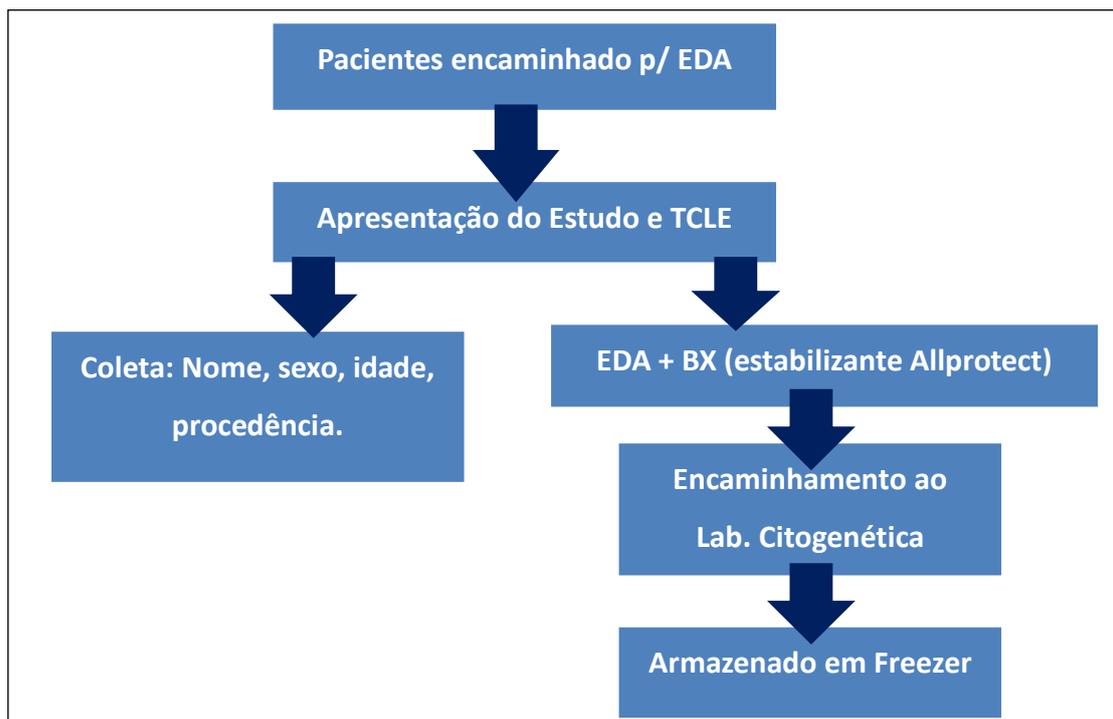


Figura 6: Fluxograma da coleta dos dados

Para classificação quanto a faixa etária, foram considerados lactentes, os pacientes menores de 2 anos ; pré-escolar foi considerado como indivíduo entre 2 e 6 anos de idade; escolar como indivíduo entre 7 e 10 anos exclusive (PUCCINI & HILÁRIO, 2008) e adolescente foi definido como indivíduo entre 10 e 19 anos de idade (WHO, 2013).

2.5.1. Endoscopia digestiva alta

Os achados endoscópicos foram classificados conforme Sistema de Sydney (APÊNDICE C).

2.5.2. Histopatologia

Os achados histopatológicos foram classificados em gastrite crônica leve, moderada e acentuada sendo a avaliação realizada por um único Patologista de um Serviço Privado em Fortaleza-Ceará.

2.5.3. Lâminas com cortes histológicos

Os cortes histológicos foram fixados em lâminas para microscopia devidamente limpas em acetona e tratadas com silano a 4%. Duas lâminas de cada bloco foram obtidas para estudo pelo método de HIS.

2.5.3.1. Hibridização *in situ*

O método utilizado neste estudo foi adaptado do descrito por Bacchi *et al.* (1996). A sonda utilizada, descrita por Shibata *et al.* (1991), apresenta uma seqüência oligonucleotídica de 30pb, biotinalada na extremidade 3' (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA-3'), complementar ao RNA viral EBER1. O método segue os seguintes procedimentos:

a) Desparafinação e hidratação das lâminas – as lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida a 60°C, durante 120 minutos. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em xilol aquecido a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, foram submetidas a uma bateria de xileno (I, II e III) – álcool 100% (I, II e III) – álcool 80% – água;

b) Bloqueio da Peroxidase endógena – as lâminas foram mergulhadas em um borel contendo peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 minutos;

c) Digestão enzimática com proteinase K – a proteinase K em concentração final de 0,02 µg/µL, por 13 minutos;

d) Lavagem em água com DEPC 0,1%;

e) Desidratação em gradiente de água e de álcool em concentração de 80%, 100% (I, II e III);

f) Incubação com solução de pré-hibridização – a solução de pré-hibridização consiste em Solução de Denhardt (3,5 X); SSC (4,5X); EDTA (0,0075M); SDS (0,35%); DNA desnaturado de esperma de salmão (75µg/µL); NaH₂PO₄ (0,75%M); Sulfato de Dextrano (10%), as lâminas foram incubadas por 60 minutos à 37°C.

g) Incubação em solução de hibridização – a solução de hibridização consiste em Solução de Denhardt (2X); Formamida (50%); Sulfato de Dextrano (2%); NaH₂PO₄ (0,002M); e sonda (0,3 ng/µL), por 16 horas em estufa à 37°C.

- h) Incubação das lâminas com anticorpo anti-biotina (DakoCytomation®) (diluição 1:20), por 30 minutos;
- i) Incubação com anticorpo anti-imunoglobulina (DakoCytomation®) (diluição 1:100), por 45 minutos;
- j) Revelação com cromógeno DAB líquido (3,3'-diaminobenzidine) (DakoCytomation®), preparado conforme recomendações do fabricante;
- k) Contra-coloração – as lâminas foram mergulhadas em um borel contendo Hematoxilina de Harris a 40%;
- l) Desidratação em gradiente de água – álcool – xilol;
- m) Montagem com lamínulas utilizando Bálsamo do Canadá.

Como controle foi utilizado lâmina de fragmento gástrico sabidamente positiva para VEB.

2.5.3.2. Critérios para análise das lâminas

Na análise das lâminas foi admitida como marcação positiva a presença de uma coloração marrom característica, adquirida pelo cromógeno após oxidação, situadas nas regiões celulares previstas para cada alvo avaliado em contraste com o azul/violeta conferido pela hematoxilina, constatada por microscopia óptica.

Na técnica de HIS, considerou-se positivo qualquer marcação nuclear em células gástricas, independente do percentual de células marcadas.

2.5.4. Extração de DNA

A extração de DNA a partir das amostras de tecido gástrico foi realizada conforme o protocolo estabelecido pelo kit da QiaAmp (Qiagen®). Posteriormente, o DNA extraído foi armazenado no freezer -80°C.

2.5.5. Diagnóstico de *Helicobacter pylori*

Para o diagnóstico do HP foi realizado o teste de Urease em fragmentos de biópsia gástrica de todos os pacientes envolvidos no estudo. Uma biópsia de antro de cada paciente

foi colocada em frasco contendo ágar uréia o qual permaneceu incubado à 37° C, por no máximo 24 horas. O resultado positivo foi caracterizado pela mudança da cor do meio de âmbar para rósea.

2.5.6. Determinação da presença do gene *cagA*

A detecção da presença do gene *cagA* foi realizada em fragmentos de mucosa gástrica de todos os pacientes com HP, com a utilização dos oligonucleotídeos descritos por Covacci *et al.* (1993) (Quadro 1). A reação de PCR foi realizada em 35 ciclos de amplificação, a etapa de desnaturação ocorreu por 1 minuto a 95°C, o anelamento por 1 minuto a 57°C e a extensão por 1 minuto a 72°C, com uma extensão final de 15 minutos a 72°C.

Quadro 1: Oligonucleotídeos utilizados na determinação dos genes urease e *cagA*

Gene	Sequência
<i>ureA</i> (sense)	5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3'
<i>ureA</i> (antisense)	5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'
<i>cagA</i> (sense)	5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3'
<i>cagA</i> (antisense)	5'TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3'

2.6. Análise de dados

Os resultados obtidos foram armazenados e organizados em planilhas do Microsoft Excel® 2003 e foram analisadas nos programas Epi Info versão 3.5.2 e SPSS Statistics 17.0.

Para análise estatística foram aplicados métodos descritivos e inferenciais. A estatística descritiva foi aplicada através da apresentação de frequência absoluta, frequência relativa e medidas de tendência central (média aritmética, mediana, moda, mínimo e máximo) e medidas de dispersão (desvio-padrão).

Realizou-se análise estatística inferencial para duas amostras, através dos testes Exato de Fisher e G com correção de Williams. Fixou-se como nível alfa de significância valores iguais ou menores a 0,05 (5%) para rejeição da hipótese de nulidade.

3. RESULTADOS

Tabela 1 - Características demográficas dos pacientes em estudo, Belém/PA.

Variáveis demográficas	Frequência absoluta	Frequência relativa %
Sexo		
Masculino	26	40,6
Feminino	38	59,4
Total	64	100,0
Faixa etária		
Pré-escolar	18	28,1
Escolar	16	25,0
Adolescente	30	46,9
Total	64	100,0
Procedência		
Belém	58	90,6
Interior do Estado	5	7,8
Macapá	1	1,6
Total	64	100,0

Tabela 2- Prevalência de *Helicobacter pylori* nos pacientes em estudo.

Variáveis	Frequência absoluta	Frequência relativa %
Teste da Urease		
Positivo	34	53,1
Negativo	30	46,9
Total	64	100,0

Tabela 3- Prevalência de Vírus Epstein-Barr nos pacientes em estudo.

Variáveis	Frequência absoluta	Frequência relativa %
EBV		
Positivo	2	3,1
Negativo	62	96,9
Total	64	100,0

Tabela 4- Achados endoscópicos e histopatológicos nos pacientes com HP.

Variáveis endoscópicas e histopatológicas	Frequência absoluta	Frequência relativa %
Gastrite à EDA		
Sim	32	94,1
Não	2	5,9
Total	34	100,0
Classificação à EDA		
Gastrite enantematososa	25	73,5
Gastrite nodular	3	8,8
Gastrite erosiva	2	5,8
Gastrite erosiva e nodular	1	2,9
Gastrite enantematososa e nodular	1	2,9
Total	34	100,0
Úlcera à EDA		
Sim (duodenal)	1	2,9
Não	33	97,1
Total	34	100,0
Duodenite à EDA		
Sim	3	8,8
Não	31	91,2
Total	34	100,0
Histopatológico de mucosa gástrica		
Normal	1	2,9
Gastrite	33	97,1
Total	34	100,0
Estadiamento ao histopatológico		
Gastrite leve	8	24,3
Gastrite moderada	18	54,5
Gastrite acentuada	7	21,2
Total	33	100,0

Nota: EDA - Endoscopia Digestiva Alta.

Tabela 5 – Prevalência de cepas de HP *cagA* positivo nos pacientes com HP.

Variáveis	Frequência absoluta	Frequência relativa %
cagA		
Positivo	22	64,7
Negativo	12	35,3
Total	34	100,0

Tabela 6 – Associação entre cepas de HP *cagA* positivo e achados histopatológicos.

Variáveis	<i>cagA</i>		<i>P</i>
	Positivo	Negativo	
Gastrite ao histopatológico			0,3529*
Sim	22 (100,0)	11 (91,7)	
Não	-	1 (8,3)	
Total	22 (100,0)	12 (100,0)	
Estadiamento ao histopatológico			0,3525**
Gastrite leve	4 (18,2)	4 (36,4)	
Gastrite moderada	12 (54,5)	6 (54,5)	
Gastrite acentuada	6 (27,3)	1 (9,1)	
Total	22 (100,0)	11 (100,0)	
Estadiamento ao histopatológico 2			0,3915*
Gastrite leve	4 (18,2)	4 (36,4)	
Gastrite moderada/acentuada	18 (81,8)	7 (63,6)	
Total	22 (100,0)	11 (100,0)	

Nota: *Teste Exato de Fisher; **Teste G com correção de Williams.

Tabela 7- Características dos pacientes em estudo, infectados com VEB.

Pacientes			H pylori	
Idade (anos)	Sexo	Histopatológico	Urease	<i>CagA</i> +
16	M	Gastrite acentuada	positivo	negativo
18	F	Mucosa normal	negativo	negativo

Tabela 8 – Correlação entre infecção por Vírus Epstein-Barr e HP nos pacientes em estudo.

Teste da Urease	EBV	
	Positivo	Negativo
Positivo	1 (50,0)	33 (53,2)
Negativo	1 (50,0)	29 (46,8)
Total	2 (100,0)	62 (100,0)

Nota: *Teste Exato de Fisher; $p = 1,00$.

Tabela 9- Características dos pacientes com cepas de HP *cagA* positivo.

Pacientes			H pylori	
Idade (anos)	Sexo	Histopatológico	Urease	<i>CagA</i> +
15	M	Gastrite moderada	positivo	Positivo
17	F	Gastrite acentuada	positivo	Positivo
17	M	Gastrite acentuada	positivo	Positivo
17	M	Gastrite moderada	positivo	Positivo
15	F	Gastrite acentuada	positivo	Positivo
13	F	Gastrite moderada	positivo	Positivo
13	F	Gastrite leve	positivo	Positivo
7	M	Gastrite acentuada	positivo	Positivo
18	M	Gastrite acentuada	positivo	Positivo
19	M	Gastrite acentuada	positivo	Positivo
19	M	Gastrite moderada	positivo	Positivo
6	M	Gastrite moderada	positivo	Positivo
18,3	F	Gastrite leve	positivo	Positivo
11	M	Gastrite leve	positivo	Positivo
12	M	Gastrite moderada	positivo	Positivo
10	F	Gastrite moderada	positivo	Positivo
12	F	Gastrite moderada	positivo	Positivo
13	F	Gastrite moderada	positivo	Positivo
4	F	Gastrite moderada	positivo	Positivo
9	M	Gastrite leve	positivo	Positivo
11	M	Gastrite moderada	positivo	Positivo
11	M	Gastrite moderada	positivo	Positivo

4. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram a prevalência de infecção por HP de 53,1% e de infecção por VEB de 3,1%. O HP infecta aproximadamente 50% da população mundial resultando no desenvolvimento de gastrite (AGUDO, 2010; TALARICO; MALFERTHEINER *et al.*, 2013), dados esses semelhantes aos observados nesta pesquisa (Tabela 2 e 3). Em estudo no Brasil, Gatti (2006), encontrou 47 % de prevalência de infecção por HP em crianças e adolescentes, corroborando nossos achados. A infecção é comumente adquirida na infância, antes dos 5 anos de idade tanto em países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento. Razões porque crianças parecem ter maior risco para adquirir a infecção que os adultos são desconhecidas (BURKER *et al.*). Conforme este autor o tipo de refeição ingerida pela criança entre 1 ano de idade até a faixa etária escolar, associado à presença da mãe ou os pais infectados seriam os principais fatores que facilitariam uma maior infecção na infância.

A infecção pelo HP em crianças é frequentemente associada com o aspecto normal da mucosa gástrica à endoscopia, contrariando os achados sempre encontrados na população adulta. A falta de resultados na EDA em crianças evidencia, portanto, a necessidade da realização da biópsia, mesmo em áreas de mucosa gástrica aparentemente normais (SOUZA *et al.*, 2001). Contudo, no presente estudo, a maioria dos pacientes com HP (94,1%) apresentavam algum grau de gastrite, resultado semelhante ao observado em estudo de Rodrigues *et al.* (2009), em que 96 % dos pacientes com HP apresentavam lesão na mucosa gástrica.

O achado endoscópico mais frequentemente observado em crianças com HP é uma lesão de aspecto nodular, localizada predominantemente no antro gástrico e caracterizado por irregularidade, que se torna mais evidente quando recoberta por sangue oriundo do local da biópsia (BITENCOURT *et al.*, 2006). Entretanto, discordando desse relato, em nossa casuística o achado endoscópico mais frequente foi a gastrite enantematosa (73,5 %) (Tabela 4). Duodenite foi detectada em 8,8 % dos pacientes e apenas um paciente apresentava úlcera duodenal. Souza *et al.* (2001) em estudo em Porto Alegre, encontrou 15,5% de prevalência de duodenite em crianças com HP. Duodenite é frequente em paciente com gastrite por HP, e pode preceder o desenvolvimento de úlcera (KAWAKAMI & MACHADO, 2002). Infecção por HP é a principal causa de úlcera duodenal em crianças (BITENCOURT *et al.*, 2006).

Após infecção inicial por HP, o paciente desenvolve gastrite aguda que pode resolver espontaneamente, mas a maioria progride para gastrite crônica (TAN & WONG, 2011). Em estudo de Rodrigues *et al.*, (2009), 87,5% dos pacientes com HP tinham gastrite na análise histopatológica, sendo 80% do tipo crônica moderada, resultados semelhantes aos detectados no presente estudo (Tabela 4). A associação significativa entre a infecção pelo HP e os achados anatomopatológicos tem sido evidenciada pela maioria dos estudos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

O resultado clínico da infecção pelo HP é determinado pela complexa interação entre fatores do hospedeiro e da bactéria (LADEIRA *et al.*, 2003). O *cagA* é provavelmente o mais importante fator de virulência (SULTAN, 2009), foi o primeiro gene cepa-específico identificado na bactéria e está fortemente associado ao risco para desenvolvimento de câncer gástrico (LADEIRA *et al.*, 2003). A relação entre o genótipo do HP e associação com a evolução clínica ainda não é completamente entendida, as cepas predominantemente encontradas em uma localização geográfica diferem quanto a estrutura genômica. Diversidade genética nas cepas pode afetar a função e antigenicidade dos fatores de virulência associados a infecção bacteriana e conseqüentemente ao desfecho da doença (AMJAD *et al.*, 2010).

Em estudo de Gatti *et al.* (2006) no Brasil, em crianças, a prevalência de cepas de HP *cagA* positiva ficou entre 64 e 69 % , resultado similar ao encontrado no atual estudo (64,7%) (Tabela 5). Na Europa, Hoaman *et al.*, (2009), observou prevalência de *cagA* positivo de 22% em Portugal e 76% na Finlândia. Talarico *et al.*, (2009) nos EUA, detectou prevalência de cepas *cagA* positivo de 41%. Diferenças quanto à distribuição geográfica dos fatores genéticos do HP tem sido estabelecida, o que pode explicar as diferentes prevalências, no entanto há escassos estudos nas diversas regiões geográficas envolvendo a população pediátrica. Apesar do interesse considerável na epidemiologia molecular dos fatores de virulência do HP, poucos estudos existem em crianças. Sabe-se que o genótipo básico adquirido na infância permanece por toda a vida (YAMAOKA, REDDY & GRAHAM, 2010).

O *cagA*, fator de virulência que recebe maior atenção, possui efeitos celulares que podem explicar porque pacientes com cepas *cagA* positivas desenvolvem maior resposta inflamatória e citocinas pró-inflamatórias (RICK *et al.*, 2010). Essa proteína é injetada na célula hospedeira, via sistema de secreção do tipo IV, induzindo alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas que estimulam a célula a se espalhar e

se alongar de maneira idêntica à produzida pelo fator de crescimento de hepatócitos da célula hospedeira (LIMA & RABENHORST, 2009). Estudos sugerem que infecções com cepas *cagA* positivas induzem uma resposta inflamatória com grande densidade de células polimorfonucleares na mucosa gástrica e altos níveis de fator de necrose tumoral alfa e gastrina, os quais são importantes marcadores na infecção por HP quando comparadas com cepas *cagA* negativa (GAT *et al.*, 2006). As cepas *cagA* positivo se associam a maior intensidade de inflamação, maior densidade bacteriana, assim como evolução para atrofia gástrica, úlcera péptica e câncer gástrico (KAWAKAMI & MACHADO, 2002).

Neste estudo, todos os pacientes com cepas *cagA* positivo tinham alteração da mucosa gástrica, com predomínio de gastrite crônica moderada (Tabela 6). Esses achados são similares aos encontrado por Gatti *et al.* (2006), Brasil, onde detectou-se maior prevalência de *cagA* positivo em pacientes com gastrite em relação aos pacientes com mucosa gástrica normal. Com relação a úlcera péptica, apenas um caso foi observado nos pacientes em estudo, sendo este *cagA* negativo, apesar de teste da urease positivo, diferindo pois, dos dados da literatura. Em estudo de Vitoriano *et al.*(2011), Portugal, todas as crianças com doença ulcerosa péptica tinham cepas positivas para algum importante fator de virulência incluindo o *cagA*, enquanto as crianças com doença não ulcerosa tinham cepas negativas para os mesmos. Em estudo de Rick *et al.* (2010), EUA, a prevalência de *cagA* positiva foi consideravelmente mais elevada nos pacientes com doença ulcerosa quando comparado àqueles com endoscopia normal ou com gastrite, sendo que os pacientes com gastrite tiveram maior prevalência de *cagA* positivo que os pacientes com mucosa normal.

A variação na prevalência do HP e cepas *cagA* positiva tem implicações na incidência das desordens associadas ao HP, incluindo doença ulcerosa péptica e câncer gástrico. A carcinogênese gástrica é complexa e multifatorial, mas o percentual de colonização por HP em crianças pode provavelmente predispor a prevalência de ocorrência de lesões pré-malignas gástrica no futuro, em diferentes coortes (HOED *et al.*, 2011).

Amoxicilina, tetraciclina, metronidazol e claritromicina são frequentemente usados, combinados com inibidor de bomba de prótons ou sais de bismutos, para o tratamento da infecção por HP. No entanto resistência antibiótica é frequentemente associado com falha na erradicação (GARCIA *et al.*, 2010). Muitos fatores tem sido implicados como causa da falha de tratamento, incluindo penetração inefetiva do antibiótico à mucosa gástrica, inativação antibiótica em baixo pH gástrico, falta de adesão ao tratamento e emergência de resistência adquirida dos antibióticos ao HP (AGUDO *et al.*, 2010). Em estudo de Khan *et al.*(2012),

com população adulta, houve baixa prevalência de resistência ao metronidazol, ofloxacina e amoxicilina em pacientes *cagA* positivo versus pacientes *cagA* negativo e maior prevalência de resistência à claritromicina em pacientes *cagA* positivo versus pacientes *cagA* negativo. Poucos são os estudos correlacionando resistência antimicrobiana e cepas do HP em crianças, mais estudos são necessários para melhor esclarecimento. O conhecimento das cepas mais frequentes nessa faixa etária poderá contribuir para a criação de protocolos clínicos de rastreio e tratamento da infecção, haja visto que as indicações de tratamento, atualmente, ainda não estão totalmente estabelecidas. Conforme o último *Guideline* da Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN, 2011), são indicações de tratamento os casos de doença ulcerosa gástrica ou duodenal associada a infecção por HP, para os demais casos os benefícios e riscos do tratamento devem ser considerados, bem como os potenciais riscos da infecção bacteriana (KOLETZKO *et al.*, 2011). Adicionalmente, o conhecimento das cepas mais prevalentes, poderá cooperar para as pesquisas envolvendo o desenvolvimento de uma vacina contra a bactéria.

Com relação ao VEB, a prevalência encontrada neste estudo foi inferior a relatada na literatura (Tabela 3). Em estudo em crianças com gastrite crônica em Moscou, Volynets *et al.* (2004) observou 36,1% de positividade para o vírus com a técnica de PCR. Ryan *et al.* (2012), nos EUA em estudo com crianças pela técnica de HIS, encontrou 30% de prevalência de VEB em mucosa gástrica com gastrite. Por outro lado, Carvalho (2006), em estudo no Rio de Janeiro com 129 crianças através da imuno-histoquímica com o anticorpo anti-LMP1 observou negatividade na totalidade da amostra para o vírus. O vírus Epstein-Barr infecta mais de 90% da população mundial, tem variações geográficas na prevalência, sendo extremamente elevada no Norte da África e baixa no Norte da Europa. O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária entre aquelas duas regiões (SILVA & ZUCOLOTO, 2003). O VEB tem sido implicado na patogênese de uma variedade de doenças, incluindo 10% dos adenocarcinomas gástricos. No entanto sua localização em mucosa gástrica normal ou com gastrite tem sido pouco explorada (RYAN *et al.*, 2012).

Essas diferenças de prevalência mostram a necessidade de futuros estudos com emprego de Técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas em populações pediátricas e imunocompetentes, com maior “n” amostral, afim de se ter a real prevalência do vírus em nossa região. As diferentes metodologias empregadas nos estudos prejudica comparações, bem como o conhecimento da exata prevalência do VEB. Conforme Silva e Zucoloto (2003), a detecção dos marcadores de infecção latente varia de doença para doença, seguindo 4 tipos

de expressão. No caso de portador saudável (latência IV), os marcadores expressos são: LMP1 e 2 e os genes EBERs. Segundo Odumade *et al.* (2011), a HIS para detectar o EBER é o padrão ouro para o diagnóstico do VEB em tecidos. No entanto sua sensibilidade tem sido questionada uma vez que investigadores tem encontrado VEB por técnicas imunohistoquímica e molecular em amostras de tumores negativas para EBER (SHUKLA *et al.*, 2011).

Shukla *et al.* (2011), acredita que as diferenças geográficas sejam mais diferenças metodológicas na detecção do VEB. Outro aspecto a ser considerado é o fato de que o estômago não é o local de escolha para os linfócitos B imortalizados pela infecção pelo VEB. A mucosa gástrica não parece possuir o mecanismo de *homing* necessário para o assentamento desses linfócitos infectados (CARVALHO, 2006).

A associação do VEB com vários tumores tem sido estabelecida desde a década de 70 (SILVA & ZUCOLOTO, 2003), no entanto pouco se sabe sobre a patogenia do vírus em pacientes imunocompetentes (DIAS *et al.*, 2009). Tanto o VEB quanto o HP são classificados como carcinógenos classe 1 pela OMS, e uma substancial fração de indivíduos se tornam co-infectados na adultice. Esses dois patógenos podem potencializar sinergicamente para causar gastrite crônica perpetua (RYAN *et al.*, 2012). O HP pode afetar a carga viral do VEB em pacientes com CG e DUP. Em estudo na Índia, em adultos, foi encontrada importante associação de VEB e infecção por HP em pacientes com CG e DUP, fortalecendo a hipótese do mecanismo sinérgico entre os dois patógenos (SHUKLA *et al.*, 2011).

Entre os pacientes com VEB neste estudo, um apresentava mucosa gástrica com gastrite, com urease positiva para HP enquanto o outro tinha mucosa gástrica normal com urease negativa para HP (Tabela 7). Entretanto não se observou correlação significativa entre a infecção por HP e o vírus Epstein-Barr nos pacientes estudados, a baixa prevalência de VEB nesta análise sugere que esse vírus não é um agente etiológico das lesões da mucosa gástrica. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que relaciona estes dois agentes infecciosos na mucosa gástrica de crianças e adolescentes do norte do Brasil (Tabela 8).

A infecção primária pelo VEB ocorre tipicamente nos primeiros anos de vida ou na adolescência e geralmente é assintomática na maioria dos países não desenvolvidos (PARASKEVAS & DIMITROULOPOULOS, 2005). Neste estudo os dois pacientes com presença de VEB na mucosa gástrica eram adolescentes, embora a pesquisa tenha sido feita para infecção lactente, esses achados corroboram os dados da literatura (Tabela 7).

O fator limitante deste estudo foi a baixa prevalência do VEB, talvez pelo tamanho da amostra. Estudos com maior amostra, abordando presença de HP e VEB em crianças no Brasil são necessários para definir se há ou não correlação e caso haja conhecer as interações entre os dois patógenos gástricos mais comuns.

Referente ao HP, após 29 anos da sua descoberta e uma explosão de estudos a seu respeito, muitas ainda são as dúvidas sobre o mesmo. As indicações de triagem, tratamento e o esquema terapêutico são baseados na apresentação clínica. Um conhecimento mais exato da patogênese da bactéria, incluindo as variadas cepas nas diversas faixas etárias em diferentes regiões do mundo contribuiria para indicações mais precisas de investigação diagnóstica, tratamento bem como o esquema terapêutico a ser usado.

5 CONCLUSÃO

A prevalência de *Helicobacter pylori* nas crianças e adolescentes deste estudo foi de 53%, resultado similar ao da literatura.

A prevalência do Vírus Epstein-Barr nos mesmos pacientes foi 3,1%, inferior ao relatado em outros estudos.

A maioria dos pacientes apresentavam gastrite a EDA e a análise histopatológica (94,1% e 97,1% respectivamente) concordando com a literatura; o tipo de gastrite, a EDA, entretanto diferiu do relatado pela literatura, com maior prevalência de gastrite tipo enantematosa.

Cepas *cagA* positiva foram encontradas em 64,7% dos pacientes infectados com *Helicobacter pylori*, achado semelhante aos encontrados em outras pesquisas no Brasil.

Todos os pacientes com cepas *cagA* positivas apresentavam gastrite ao exame histopatológico, com predomínio de gastrite crônica moderada.

Não houve correlação significativa entre infecção por *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein-Barr nos pacientes estudados.

Embora a maioria dos achados nesse estudo esteja de acordo com os relatos da literatura, evidenciou-se a necessidade de estudos com maior casuística, envolvendo a população pediátrica imunocompetente, afim de melhor esclarecer se há ou não correlação entre a infecção por HP e VEB em nossa região.

REFERÊNCIAS

AGUDO, S. et al. High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, Oct. v.48, n.10, p. 3703–3707, 2010.

AMJD, N.; OSMAN, H. A.; RAZAK, N. A.; KASSIAN,J.; DIN, J.; ABDULLAH, N. B.Clinical significance of *Helicobacter pylori cagA* and *iceA* genotype status. **World J Gastroenterol.**, v.16, n.35, 4443-4447, 2010.

ASAKA, M. et al. Guidelines for the Management of Helicobacter pylori Infection in Japan: Revised Edition. **Helicobacter**. v.15, p.1-20, 2010.

AZEVEDO, N.F., HUNTINGTON, J.; GOODMAN, K.J. The Epidemiology of *Helicobacter pylori* and Public Health Implications **Journal compilation Helicobacter**. v.14 suppl.1, p.1-7, 2009.

BARILE,K.A.S.; MARTINS, L.C.; AMARAL, R.K.C.;LOIOLA,R.S.P.;CORVELO, T.C.O. Prevalência de infecção por *helicobacter pylori* em crianças e mães na Região Norte do Brasil. **Rev Panam Infectol**. V.11, n.4, 6-12, 2009.

BITTENCOURT, P.F.S. et al. Gastroduodenal Peptic and *Helicobacter Pylori* Infection in Children and Adolescents. **J Pediatr**. v.82, n.5, p. 324-334, 2006.

BUCKER, R. et al. *Helicobacter pylori* colonization critically depends on postprandial gastric Conditions. **Scientific Reports**. v. 2 n.994, 2012.

CABEBE, E.C.; MEHTA, V.K. Gastric Cancer. Updated. Nov 25, 2009. [Acesso em 26 jan. 2010]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/278744-overview>.

CALCAGNO, D.Q. et al. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World J Gastroenterol**.v.14, n.39, p. 5962-5968, 2008.

CANCELA, F.G.; CARVALHO, S.D.; NORTON, R.C.; PENNA, F.J. *Helicobacter pylori* na infância: Particularidades clínicas e terapêuticas da infecção em crianças e adolescentes. **Rev Med Minas Gerais**. 18(4 Supl 3), S13-S16, 2008.

CANDELLI, M. et al. *Helicobacter pylori* Eradication Rate and Glycemic Control in Young Patients With Type 1 Diabetes. **Journal Of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 38, p.422-425, 2004.

CARVALHO, A.C.G. **Resposta linfóide em biópsias de gástricas de crianças do hospital Universitário Antonio Pedro: Associação com *Helicobacter pylori* e com virus Epstein Barr**. 69 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia)- Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.

CDC [internet]. USA: Center for Disease Control and Prevention, c 2013[update 2006 may 16]: cited 2013 feb 10 . Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/ebv.htm>

CHEN, J et al. Variations of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in Epstein-Barr Virus Associated Gastric Carcinomas from Guangzhou, Southern China. **Plos One**. Nov., v. 7, n. 11, 2012.

CHUNG, C. et al. Diversity of VacA Intermediate Region among *Helicobacter pylori* Strains from Several Regions of the World. **Journal of Clinical Microbiology**. v.48, n.3, p. 690–696, 2010.

COSTA, A.C.; FIGUEIREDO, C.; TOUATI, E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Journal compilation**. 2009 *Helicobacter* 14 suppl.1, p.15-20.

COVACCI, A. et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci**., v.90, n.12, p.5791-5795, 1993.

DAS, J.C.; PAUL, N. Epidemiology and pathophysiology of *helicobacter pylori* infection children. **Indian journal of pediatrics**. v.74, march., 2007.

DELAHAY, R.M.; RUGGE, M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter** **17**, Suppl. 1, p. 9–15, 2012.

DIAS, E.P. et al. Detecção do Vírus Epstein-Barr em Tonsilites Recorrentes. **Rev Bras Otorrinolaringol.** v.75, n.1, p.30-4, 2009.

ESPINO E., A. Infección por *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol. Latinoam.** v. 21 n. 92, p.323-327, 2010.

ELZBIETA, P.; BRONIARCZYK, J.K.; GOZDZICKA-JOZEFIAK, A. Epigenetic mechanisms in virus-induced tumorigenesis. **Clin Epigenet.** v. 2, p.233–247, 2011.

FRANCISCO JÚNIOR, A. et al. Detecção gástrica de *Helicobacter pylori* em pacientes pediátricos sintomáticos através da reação em cadeia de polimerase (PCR), teste de urease e exame histológico. **Pediatrics (São Paulo).** v.26, n.1, p. 34-42, 2004.

FURUTA, T.; DELCHIER, J.C. *Helicobacter pylori* and Non-malignant Diseases. **Journal compilation.2009 Helicobacter** 14 suppl.1, p.29-35.

GARCIA, G.T. et al. High Prevalence of Clarithromycin Resistance and *cagA*, *vacA*, *iceA2*, and *babA2* Genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian Children. **Journal of Clinical Microbiology**, Nov. v.48, n.11, p. 4266–4268, 2010.

GATTI, L.L. et al. *cagA* Positive *Helicobacter pylori* in Brazilian Children Related to Chronic Gastritis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** v.10, n.4, p. 254-258, 2006.

GHOSHAL, U.C.; CHOURASIA, D. Gastroesophageal Reflux Disease and *Helicobacter pylori*: What May Be the Relationship? **J Neurogastroenterol Motil.** v. 16, n. 3, p.94-98, 2010.

GISBERTO, J.P. Second-line rescue therapy of *Helicobacter pylori* infection. **Therapeutic advances in gastroenterology.** v.2, n.6, p.331-356, 2009.

HISHIDA, A. et al. Genetic predisposition to *Helicobacter pylori* –induced gastric precancerous conditions. **World J Gastrointest Oncol.**vol. 2, n.10, p. 369-379, 2010.

HOMAN, M. et al. Prevalence and Clinical Relevance of *cagA*, *vacA*, and *iceA* Genotypes of *Helicobacter pylori* Isolated From Slovenian Children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** Sept. v. 49, n. 3, 2009.

HOED, C.M. et al. *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence for stabilized colonization rates in childhood. **Helicobacter.** Octob. v. 16, n.5, p.405–409, 2011.

HUANG, X et al. Iron deficiency anaemia can be improved after eradication of *Helicobacter pylori*. **Postgrad Med J.** v.86, p.272-278, 2010.

IWATA, S. et al. Quantitative analysis of Epstein–Barr virus (EBV)- related gene expression in patients with chronic active EBV infection. **Journal of General Virology.** v.91, p. 42–50, 2010.

KAWAKAMI E.; MACHADO R.S. *Helicobacter pylori*. **The Electronic Journal Of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases.** v.10, n.1, 2006.

KHAN, A. et al. Antibiotic resistance and *cagA* gene correlation: A looming crisis of *Helicobacter pylori*. **World J Gastroenterol.** May. v.18, n. 18, p. 2245-2252, 2012.

KINDERMANN, A.; LOPES, A.I. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. Journal compilation. **Helicobacter.** v.14, suppl.1, p. 52-57, 2009.

KLUMB, C.E. Biologia e patogênese dos Linfomas não-Hodgkin de origem B na infância: uma revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia,** v., 47, n.3, p. 291-01, 2001

KOBINGER, A.E.B.A.; IAZZETTI, A.V. Anamnese e Exame Físico em Pediatria. *In:* PUCCINI, R.F.; HILÁRIO, M.O.E. Semiologia da criança e do adolescente. Guanabara Koogan, 2008, p 36.

KOLETZKO, S. et al. Evidence-based Guidelines From ESPGHAN and NASPGHAN for *Helicobacter pylori* Infection in Children. **JPGN,** v.53, n. 2, Aug., 2011.

KUO, C. et al. The Optimal First-Line Therapy of *Helicobacter pylori* Infection in Year. **Gastroenterology Research and Practice.** v.2012 p. 1-8, 2012.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 39, n. 4, p. 335-34, 2003.

LAY, J.M. et al. Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. **Virology Journal**.v.7, n. 252, 2010.

LEITE, K.R.M. et al. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. **São Paulo Med J**. v.123, n. 3.p. 113-8, 2005.

LIMA, V.P.; RABENHORST, S.H.B. Genes associados à virulência de *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, n.4, p.389-396, 2009.

LIMA, M.A.P. **Estudo do vírus epstein-barr (ebv) em Adenocarcinoma gástrico: Frequência, associação clinicohistopatológica e relação com a expressão das proteínas BCL-2, BAX E C-MYC**. 147 f. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)- Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2006.

MACHADO, R.S.; SILVA, M.R.; VIRIATO, A.- Furazolidone, tetracycline and omeprazole: a low-cost alternative for *Helicobacter pylori* eradication in children. **J Pediatr (Rio J)**. v.84, n.2, p.160-165, 2008.

MALFERTHEINER, P. et al.Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht IV/Florence Consensus Report. **Gut**. v. 61, p. 646-664, 2012.

MBULAITEYE, M.S.; HISADA, M.; EL-OMAR, E.M. *Helicobacter Pylori* associated global gastric cancer burden. **Front Biosci**. v. 14, p. 1490–1504, 2010.

MIRANDA, A.C.P. et al. Soroprevalencia da infecção por *Helicobacter pylori* em crianças de baixo nível sócio econômico em São Paulo. **São Paulo Med J**. v.128, n.4, p.187-91, 2010.

MONTEIRO, L. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Journal compilation Helicobacter**. v. 14, suppl.1, p. 8-14, 2009.

MONTEIRO,T.A.F. **Detecção do genoma do vírus de Epstein Barr (EBV) em tecidos de pacientes com doença de Hodgkin da Região Norte do Brasil**. 99f. 2010. Dissertação

(Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários)- Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Pará, 2010.

MOURAD-BAARS, P.; HUSSEY, S.; JONES, N.L. *Helicobacter pylori* Infection and Childhood. **Helicobacter**. v.15, Suppl. 1, p. 53–59, 2010.

O'CONNOR, A.; GISBERT, J.; O'MORAIN, C. Treatment of Helicobacter. **Journal compilation Helicobacter**. v. 14, suppl.1, p.46-51, 2009.

ODUMADE, O.A.; HOGQUIST, K.A.; BALFOUR JÚNIOR, H.H. Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. **Clinical microbiology reviews**, Jan., p. 193–209, 2011.

PACÍFICO, L. et al. Consequences of *Helicobacter pylori* infection in children. **World J Gastroenterol**. v. 16, n.41, p. 5181-5194, 2010.

PARASKEVAS,E.; DIMITROULOPOULOS, D. Epstein-Barr virus infection and gastrointestinal diseases. **Annals of gastroenterology** v.18,n.4,386-390, 2005.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002 .**CA Cancer J Clin**.v.55, p.74–108, 2005.

PELLICANO, R. et al. Helicobacters and Extragastric Diseases. **Journal compilation. Helicobacter**. v.14 suppl.1, p.58-68, 2009.

PRINZ, C.; SCHWENDY, S.; VOLAND, P. H pylori and gastric cancer: Shifting the global burden. **World J Gastroenterol**. Sept. 14, v.12, n.34, p. 5458-5464, 2006.

RIBEIRO, M.L. et al. Quantitative real-time PCR for the clinical detection of *Helicobacter pylori*. **Genetics and Molecular Biology**. v.30, n. 2, p. 431-434, 2007.

RICK,J.R. et al. *In situ* expression of *cagA* and risk of gastroduodenal disease in *Helicobacter pylori* infected children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. Febr. V.50, n.2, p. 167–172, 2010.

RYAN, J.L. et al., Epstein-Barr Virus Infection Is Common in Inflamed Gastrointestinal Mucosa. **Dig Dis Sci**, publicado on line em 13 de março de 2012.

SALDAÑA, N.G. et al. Clinical and laboratory characteristics of infectious mononucleosis by Epstein-Barr virus in Mexican children. **BMC Research notes**. v. 5, n.361, p. 1-5, 2012.

SANTACROCE L.; BHUTANI, M. S. *Helicobacter Pylori* Infection Updated: Aug 14, 2008. [Acesso em 25 jan. 2010]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/176938-overview>.

SHIOTA, S.; YAMAOKA, Y. Management of *Helicobacter pylori*. F1000. **Medicine Reports**. V. 2, n.13, p.1-6, 2010.

SHUKLA, S.K.; PRASAD, K.N.; SAXENA, A.; GHOSAL, E.C.; KRISHNANI, N.; HUSAIN, N. Epstein Barr vírus DNA load and its association with *Helicobacter Pylori* infection in gastroduodenal diseases. **Braz J Infect Dis.**, v.15, n.6, p. 583-590, 2011.

SILVA, A.R.; ZUCOLOTO, S.; O papel do Vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. **Medicina, Ribeirão Preto**. jan./mar. v. 36, p. 16-23, 2003.

SILVA, M.R. et al. Identificação dos polimorfismos dos genes IL1B, IL1RN e TNFA na gastrite crônica associada à infecção por *Helicobacter pylori* e no carcinoma gástrico. **J Port Gastrenterol**. v. 15, p. 8-14, 2008.

SINGH, M. et al. *Helicobacter Pylori* And The Gut: Genotypes Of *Helicobacter Pylori* In Children With Upper Abdominal Pain. **Journal Of Gastroenterology And Hepatology**. v.18, p.1018–1023, 2003.

SIQUEIRA, J.S. et al. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori*: Revisão General aspects of *Helicobacter pylori* infections – Review . **RBAC**. v. 39, n.1, p. 9-13, 2007.

SIVACHANDRAN, N.; WANG,X.; FRAPPIER, L. Functions of the Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein in Viral Reactivation and Lytic Infection. **J Virol**. Jun., v.86,n.11, 6146–6158, 2012.

SOUZA, M.B. et al. Prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* em crianças avaliadas no Hospital de clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. **Arq Gastroenterol**. v. 38, n. 2,2001.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. Medical Progress: *Helicobacter pylori* Infection. **The New England Journal of Medicine**. v.347, n.15, Octob,p.1175-1186, 2002.

SULTAN, M.I.; LI, B.UK.; GREENE, M.T. *Helicobacter pylori* Infection. **Division of Gastroenterology and Nutrition, Medical College of Wisconsin, Children's Hospital Updated**. Oct, v. 30, 2009. [Acesso em 25 jan. 2010]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/929452-overview>

TALARICO, S. et al. Pediatric *Helicobacter pylori* Isolates Display Distinct Gene Coding Capacities and Virulence Gene Marker Profiles. **Journal of Clinical Microbiology**. Jun. v.47, n. 6, p. 1680–1688, 2009.

TAN, V.P.Y.; WONG, B.C.Y. *Helicobacter pylori* and gastritis: untangling a complex relationship 27 years on. **Journal of gastroenterology and hepatology**., 26, suppl 1, 42-45, 2011.

TANAKA, P.Y.2012. **Detecção do Vírus Epstein Barr, expressão de FOXP3 e avaliação da carga viral para EBV como marcadores prognósticos nos linfomas relacionados à AIDS**. 2012. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

UYANIKOGLU,A. et al. Etiological factors of duodenal and gastric ulcers. **Turk J Gastroenterol**. v.23, n.2, p. 99-103, 2012.

VENKATESHWARI, A. et al. *Helicobacter pylori* infection in relation to gastric cancer progression. **Indian Journal of Câncer**. v. 48, n.1, p. 94-98, 2011.

VITORIANO, I. et al. Ulcerogenic *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Children: A Contribution to Get Insight into the Virulence of the Bacteria. **Plos One**. oct. v. 6, n. 10, 2011.

VOLYNETS, G.V. et al. Epstein-Barr Virus in Children With Chronic Gastritis. P0887. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**. June v.39, n.PS395, 2004.

WANG, C.; YUAN, Y.; HUNT, R.H. The Association Between *Helicobacter pylori* Infection and Early Gastric Cancer: A Meta-Analysis. **The American Journal of Gastroenterology**. v.102, n. 8, p. 1789-1798, 2007.

WEDI, B. et al. Urticaria and infections. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**. v. 5, n.10, p.1-12, 2009.

WHO, 2013. 10 facts on adolescent health. http://www.who.int/features/factfiles/adolescent_health/en/index.html. Acessado em 28 de março de 2013.

WHO, 2013. Viral cancers: Epstein-barr. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index1.html. Acessado em 28 de março de 2013.

YAMAOKA, Y.; REDDY, R.; GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori* Virulence Factor Genotypes in Children in the United States: Clues about Genotype and Outcome Relationships. **Journal of Clinical Microbiology**. Jul. p. 2550–2551, 2010.

ZELLOS, A. et al. Autoimmune hepatitis type- 2 and Epstein Barr Virus infection in a toddler; art of facts or an artifact. *Annals of Hepatology*. Jan.-Feb., v. 12, n.1, p. 147-151, 2013.

ZSIKLA, V. et al. Increased Rate of *Helicobacter pylori* Infection Detected by PCR in Biopsies With Chronic Gastritis. **Am J Surg Pathol**. v.30, n.2, p.242–248, 2006.

APÊNDICES

APENDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÃO

Helicobacter pylori é uma bactéria que pode infectar adultos e crianças, sendo que na maioria dos pacientes não causará sintomas. No entanto um pequeno número de pacientes apresentará úlcera no estômago (risco de 15%), e uma proporção ainda menor desenvolverá câncer gástrico (risco de 0.1%). O risco de evolução para câncer gástrico depende do tipo (genótipo) de *Helicobacter pylori*.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa a qual tem como objetivo saber a prevalência dos marcadores genéticos do *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes. Para tal, recolheremos alguns dados seus (nome, idade, sexo e procedência), bem como fragmentos de suas biópsias gástricas e duodenais coletados durante a Endoscopia Digestiva Alta (EDA), os quais serão utilizados para o diagnóstico do *Helicobacter pylori* e para pesquisa dos marcadores genéticos associados ao mesmo. Informo que a indicação da EDA será de responsabilidade do médico assistente do paciente, não cabendo aos pesquisadores indicá-la e, portanto, não terão responsabilidade com as complicações relacionadas à mesma. No que se refere à coleta das biópsias, o risco para o paciente será a ocorrência potencial de discreto sangramento local após as mesmas, o que em geral resolve espontaneamente, não necessitando de tratamento. O tratamento do paciente, também, continuará a cargo de seu médico assistente, não tendo pois os pesquisadores quaisquer responsabilidades quanto ao mesmo. Os resultados da pesquisa serão publicados no meio acadêmico e científico, sendo resguardados o seu nome, endereço, filiação e qualquer outro dado relacionado à sua identificação, a qual sob nenhuma hipótese será divulgada.

Esta pesquisa poderá beneficiar primeiramente você- que estará tendo a pesquisa do *Helicobacter pylori* e dos marcadores genéticos associados ao mesmo- e muitas pessoas porque a prevalência destes marcadores será estabelecida, o que poderá contribuir para tomada de medidas preventivas.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, sendo-lhe garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento podendo deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Você terá a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas; e caso sinta necessidade, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPA.

Não existirão despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua

participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Este termo foi elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra arquivada com os pesquisadores responsáveis. Abaixo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

.....
Pesquisador

CONSENTIMENTO

Após ter sido satisfatoriamente informado pelo pesquisador, sobre o trabalho de pesquisa intitulado: “Prevalência de marcadores cagA e alelos vacA em amostras de *Helicobacter pylori* isoladas em crianças e adolescentes submetidas a endoscopia digestiva alta em clínica de endoscopia digestiva em Belém, Pará, Brasil”, realizado sob a responsabilidade do Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano e a Médica Kátia Soares de Oliveira, concordo que....., criança/adolescente pela qual sou responsável, participe do mesmo, sempre que se resguarde minha identidade e a de meu filho (a) se for o caso.

Fui esclarecido(a) sobre a coleta de dados do paciente e de que os fragmentos de biópsias gástricas e duodenais coletados durante a Endoscopia Digestiva Alta (EDA) serão utilizados para o diagnóstico do *Helicobacter pylori*, bem como para pesquisa dos marcadores genéticos associados ao mesmo, e que os resultados destes exames serão utilizados para análise na pesquisa. Estou ciente de que o Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano e a Médica Kátia Soares de Oliveira estarão disponíveis para fornecer informações sobre o desenvolvimento da pesquisa e que posso retirar este meu consentimento a qualquer tempo, sem prejuízos ou perdas. Estou, também, ciente de que o tratamento continuará a cargo do médico solicitante da EDA, não tendo pois o Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano e a Médica Kátia Soares de Oliveira quaisquer responsabilidades em relação ao mesmo.

Belém,de.....de 2010

.....
Assinatura dos pais ou responsável

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP-CCS/UFPA)- Complexo de sala de aula/CCS-sala 13-Campus Universitário, n 01, Guamá-CEP: 66075-110-Belém-Pará. Tel.: 3201-7735. E-mail: cepccs@ufpa.br

APÊNDICE B – FORMULÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR	
Nome:	No.
Idade:	Sexo: Masculino () Feminino ()
Procedência : Interior() Região metropolitana de Belém() Outros ()	
EDA: Úlcera gástrica () Úlcera péptica () Outros () Gastrite: Enantematosa () Erosiva () Nodular ()	
Histopatológico: Gastrite Leve () Moderada () Acentuada () Úlcera péptica () duodenal ()	
Urease: positivo () negativo ()	
HP CagA: positivo () cagA negativo ()	
Pesquisa do EBV : positivo () negativo ()	

APÊNDICE C- DIAGNÓSTICO ENDOSCÓPICO

Estômago - Classificação endoscópica de gastrite - Sistema de Sydney

Corpo

Enantematosa	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Erosiva	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Nodular	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Hemorrágica	(0)	(1+)	(2+)	(3+)

Antro

Enantematosa	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Erosiva	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Nodular	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Hemorrágica	(0)	(1+)	(2+)	(3+)

Duodeno - Classificação endoscópica de duodenite - Sistema de Sydney

Enantematosa	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Erosiva	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Nodular	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Hemorrágica	(0)	(1+)	(2+)	(3+)

ANEXOS

ANEXO A-PARECER DO CEP

Universidade Federal do Pará

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

**Carta Provisória: 066/10 CEP-ICS/UFPA**

Belém, 22 de junho de 2010.

Ao Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa **PREVALÊNCIA DE MARCADORES cagA E ALELOS vacA EM AMOSTRAS DE HELICOBACTER PYLORI ISOLADAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SUBMETIDAS A ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA EM CLÍNICA DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA DE BELÉM, PARÁ, BRASIL** de CAAE 0026.0.073.000-10 e parecer n° 034/10 - CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 09 de junho de 2010.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 20 dezembro de 2011, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Wallace Raimundo Araujo dos Santos.
Coordenador do CEP-ICS/UFPA

