



Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

Tese de Doutorado

Potencial Relação de Eosinófilos nos Vilos Duodenais com o *Helicobacter pylori* e com a Dispepsia Funcional: Análise Secundária de Ensaio Clínico Randomizado

Felipe Mazzoleni

Orientador: Professor Doutor Luiz Edmundo Mazzoleni

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

**Potencial Relação dos Eosinófilos nos Vilos Duodenais com o *Helicobacter pylori* e com a
Dispepsia Funcional: Análises Secundárias de Ensaio Clínico Randomizado**

Felipe Mazzoleni

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação:
Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni

Colaboradores: Tobias Cancian Milbradt
Dr. Diego de Mendonça Uchoa
Dr. Carlos Thadeu Schmidt Cerski
Alexandra Cauduro Ponso Fernandes
Daniel Simon
Fernanda de Miranda Schmitz
Rafaela Pivato Fonseca
Gabriela Remonatto

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Mazzoleni, Felipe
Potencial Relação de Eosinófilos nos Vilos
Duodenais com o *Helicobacter pylori* e com a Dispepsia
Funcional: Análise Secundária de Ensaio Clínico
Randomizado / Felipe Mazzoleni. -- 2024.
58 f.
Orientador: Luiz Edmundo Mazzoleni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Eosinófilos. 2. *Helicobacter pylori*. 3.
Dispepsia Funcional. 4. Eosinófilos duodenais. I.
Mazzoleni, Luiz Edmundo, orient. II. Título.

FELIPE MAZZOLENI

Potencial Relação de Eosinófilos nos Vilos Duodenais com o *Helicobacter pylori* e com a Dispepsia Funcional: Análise Secundária de Ensaio Clínico Randomizado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Gastroenterologia e Hepatologia.

Aprovado em: 30 de setembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Relator:

Professor Doutor Alexandre de Araujo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avaliador 1:

Professor Doutor Rafael da Veiga Chaves Picon
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avaliador 2:

Doutor Matheus Truccolo Michalczuk
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Agradecimentos

Agradeço:

à minha família, em especial minha esposa Renata Ortiz Pedrini, e meus filhos Lucas, Julia e Nina pelo apoio;

ao meu pai e orientador, Professor Luiz Edmundo Mazzoleni, não apenas pelos ensinamentos constantes, mas pela disponibilidade e grande capacidade didática;

aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, que me proporcionaram e me auxiliaram nessa importante etapa da minha formação acadêmica;

aos patologistas Diego de Mendonça Uchoa, Carlos Thadeu Schmidt Cerski e Alexandra Cauduro Ponso Fernandes, pela expertise e disponibilidade na avaliação das lâminas;

ao Tobias Cancian Milbradt, ao Daniel Simon e à Gabriela Remonato, sempre disponíveis para doar seu tempo e conhecimentos;

às acadêmicas da faculdade de medicina da UFRGS, Fernanda de Miranda Schmitz e Rafaela Pivato da Fonseca por sua dedicação e esforço no auxílio da coleta dos dados;

à banca examinadora, pela colaboração e pelos conhecimentos.

RESUMO

Base teórica e Objetivos: Os eosinófilos duodenais têm sido implicados como um potencial fator etiológico da dispepsia funcional, e sua associação com *Helicobacter pylori* é pouco compreendida. Este estudo tem como objetivo avaliar a potencial associação dos eosinófilos nos vilos duodenais com sintomas dispépticos, e avaliar a influência do tratamento do *H. pylori* nos eosinófilos dos vilos duodenais.

Métodos: Um total de 32 pacientes dispépticos funcionais, de acordo com os critérios de Roma III, *H. pylori* positivos, foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos de tratamento: 16 receberam tratamento para *H. pylori* com antibióticos e 16 receberam placebos. Os pacientes foram submetidos a duas endoscopias gastrointestinais superiores com biópsias gástricas e duodenais, uma basal e outra 12 meses após o tratamento. A positividade para o *H. pylori* foi avaliada com teste de urease e histologia gástrica (Hematoxilina-eosina e Giemsa). Amostras duodenais foram coradas com Hematoxilina-eosina, e a contagem de eosinófilos nas vilosidades duodenais foi realizada em um campo de grande aumento (Eos/CGA). Um questionário validado (PADYQ) foi utilizado para avaliar a intensidade dos sintomas dispépticos antes do tratamento e ao final do acompanhamento. A variação dos eosinófilos nos vilos duodenais, antes e 12 meses após o tratamento, foi comparada entre os dois grupos de tratamento para o *H. pylori* e entre pacientes com e sem melhora dos sintomas dispépticos. A contagem dos eosinófilos duodenais também foi avaliada com relação a variáveis demográficas.

Resultados: Do total de pacientes, 87,5% eram do sexo feminino e a idade média foi de 44,75 anos. No final do acompanhamento, não houve diferença significativa na variação dos eosinófilos nos vilos duodenais entre os dois grupos de tratamento para o *H. pylori* [Antibióticos: $-1,56 (\pm 1,66)$ Eos/CGA vs Placebo: $1,13 (\pm 1,45)$ Eos/CGA, $p = 0,232$]. Também não houve diferença na variação dos eosinófilos nas vilosidades duodenais entre pacientes com e sem melhora dos

sintomas dispepticos [com melhora dos sintomas: $-2,38 (\pm 1,86)$ Eos/CGA vs sem melhora dos sintomas: $-0,61 (\pm 1,33)$ Eos/CGA, $p = 0,417$]. Análise de regressão linear multivariada observou tendência indicando associação entre idade avançada e níveis mais altos de eosinófilos nos vilos duodenais ($p = 0,086$).

Conclusão: Os resultados deste estudo demonstraram que o tratamento para *H. pylori* não teve impacto significativo nos eosinófilos dos vilos duodenais. E, melhora dos sintomas dispépticos não se correlacionou com alterações dos eosinófilos nos vilos duodenais.

Palavras chave: Eosinófilos; *H. pylori*; dispepsia funcional; eosinófilos duodenais.

ABSTRACT

Background and Aims: Duodenal eosinophils have been implicated as a potential factor on the etiology of functional dyspepsia, and their association with *Helicobacter pylori* is poorly understood. This study aims to evaluate the potential association of eosinophils infiltration in duodenum with dyspeptic symptoms and evaluated the influence *H. pylori* treatment in duodenal villi eosinophils.

Methods: A total of 32 functional dyspeptic patients, according to the Rome III criteria, *H. pylori* positive, were randomly assigned to 2 treatment groups: 16 received *H. pylori* treatment with antibiotics and 16 received placebo. Patients underwent two upper gastrointestinal endoscopies with gastric and duodenal biopsies, one at baseline and another 12 months after treatment. *H. pylori* positivity was assessed with urease test and gastric histology (Hematoxylin-eosin and Giemsa). Duodenal samples were stained with Hematoxylin-eosin, and duodenal villi eosinophil count was performed in one high-power field (Eos/HPF). A validated questionnaire (PADYQ) was used to assess the severity of dyspeptic symptoms before treatment and at the end of follow-up. The variation in duodenal villi eosinophils before and 12 months after treatment was compared between the two *H. pylori* treatment groups and between patients with and without improvement in dyspeptic symptoms. Duodenal eosinophil counts were also assessed in relation to demographic variables.

Results: Of the patients, 87.5% were female and the mean age was 44.75 years. At the end of the follow-up, there was no significant difference in the variation of eosinophils in the duodenal villi between the two *H. pylori* treatment groups [Antibiotics: $-1.56 (\pm 1.66)$ Eos/HPF vs Placebo: $1.13 (\pm 1.45)$ Eos/HPF, $p = 0.232$]. Also, there were no difference in the variation of eosinophils in the duodenal villi between patients with and without improvement in dyspeptic symptoms [with symptom improvement: $-2.38 (\pm 1.86)$ Eos/HPF vs without symptom improvement: $-0.61 (\pm 1.33)$ Eos/HPF, $p = 0.417$]. Multivariate linear regression analysis

observed a trend indicating an association between advanced age and higher eosinophil levels in the duodenal villi ($p = 0.086$).

Conclusion: The results of this study demonstrated that treatment for *H. pylori* had no significant impact on duodenal villi eosinophils. And the improvement of dyspeptic symptoms did not correlate with changes in eosinophils in the duodenal villi.

Keywords: Eosinophils; *H. pylori*; functional dyspepsia; duodenal eosinophils.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é composta de uma introdução, que aborda os principais tópicos do estudo que são: os eosinófilos, a infecção gástrica pelo *H. pylori*, a dispepsia funcional e as associações entre essas variáveis, através de revisão bibliográfica. Após, será apresentada a justificativa, a hipótese e os objetivos do estudo.

O artigo em inglês irá detalhar os materiais e métodos, os resultados, a discussão e as conclusões, seguido das referências bibliográficas e do anexo, que detalha o questionário de sintomas dispépticos utilizado nesse estudo (PADYQ).

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Eosinófilos duodenais. Coloração Hematoxilina-Eosina (amostra do estudo)- **Pg. 17**

Figura 2. Eosinófilos duodenais e dispepsia funcional- **Pg. 20**

Figura 3. Mecanismo de ativação dos eosinófilos- **Pg. 21**

Tabela 1. Eosinófilos duodenais por status *H. pylori* (estudos prévios)- **Pg. 22**

Figura 4. Eosinófilos duodenais de acordo com o status do *H. pylori*- **Pg. 23**

Figura 5. Três métodos de contagens de eosinófilos avaliados por Ceulemans et al- **Pg. 25**

Figura 6. Eosinófilos nos vilos duodenais, de acordo com intensidade dos sintomas dispépticos- **Pg. 26**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICC-C	Coeficiente de correlação intraclasse
ICC-A	Coeficiente de concordância absoluta
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGA	Campos de Grande Aumento
DF	Dispepsia Funcional
DPM	Desvio Padrão da Média
FAP	Fator de Ativação Plaquetária
FCT	Fator de Crescimento Tumoral
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
H2	Receptor Histamínico tipo 2
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H&E	Hematoxilina e Eosina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IC	Intervalo de Confiança
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
LICP	Leuven Intestinal Counting Protocol
LT	Leucotrienos
M2	Receptor Muscarínico tipo2
Md	Mediana

P25–75	Percentis 25 e 75
PBP	Proteína Básica Principal
SDE	Síndrome da Dor Epigástrica
SDPP	Síndrome do Desconforto Pós-Prandial
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	T-helper (linfócito)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (INGLÊS)

BMI	Body mass index
EPS	Epigastric pain syndrome
Eos	Eosinophil
Heroes	<i>Helicobacter</i> Eradication Relief Of dyspeptic Symptoms
HPF	High power fields
ICF	Informed Consent Form
MPB	Major Basic Protein
PADYQ	Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire
PPDS	Postprandial distress syndrome
SD	Standard Deviation
SE	Standard Error
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
Eosinófilos.....	16
Figura 1. Eosinófilos duodenais. Coloração Hematoxilina-Eosina (amostra do estudo).	17
<i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>).....	18
Dispepsia Funcional.....	18
Dispepsia funcional e eosinófilos duodenais	19
Figura 2. Eosinófilos duodenais e dispepsia funcional. ²⁴	20
Figura 3. Mecanismo de ativação dos eosinófilos. ²⁵	21
Infecção gástrica pelo <i>H. pylori</i> e eosinófilos duodenais	21
Tabela 1. Eosinófilos duodenais por status <i>H. pylori</i> (estudos prévios).....	22
Figura 4. Eosinófilos nos vilos duodenais de acordo com o status do <i>H. pylori</i>	23
Figura 5. Três métodos de contagens de eosinófilos avaliados por Ceulemans et al. ³²	25
Figura 6. Eosinófilos nos vilos duodenais, de acordo com intensidade dos sintomas dispépticos	26
REFERÊNCIAS	26
JUSTIFICATIVA	31
QUESTÃO DA PESQUISA.....	31
HIPÓTESE.....	31
OBJETIVOS.....	32
ARTIGO EM INGLÊS	33
CONCLUSÃO.....	57
PERSPECTIVAS / CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
ANEXO	58
Anexo I (PADYQ) - Questionário de Sintomas Dispépticos	58

Introdução

Apesar da fisiopatologia da dispepsia funcional ainda ser pouco compreendida, vários mecanismos vêm sendo implicados, como alterações no eixo cérebro-intestino, motilidade gástrica prejudicada, hipersensibilidade visceral, fatores psicossociais e aumento de secreção ácida. Infiltrados inflamatórios na mucosa duodenal, com eosinófilos e mastócitos duodenais, mesmo em baixas densidades, têm sido implicados como fatores fisiopatológicos dessa doença, mas ainda com resultados controversos na literatura.¹⁻⁴ Esses infiltrados inflamatórios geralmente não são acompanhados por alterações endoscópicas significativas, nem por alterações estruturais microscópicas das vilosidades e criptas duodenais.

Eosinófilos duodenais estão associados a parasitoses intestinais e alergias alimentares,⁵ e têm sido implicados como potenciais fatores na etiologia da dispepsia funcional,^{6,7} possivelmente devido à sua capacidade de causar alterações na motilidade e sensibilidade do trato digestivo, conforme observado em estudos com modelos animais.⁸ A relação entre eosinófilos duodenais e *H. pylori* é pouco compreendida, tendo sido avaliada apenas como um achado secundário em alguns estudos, que apresentaram resultados controversos.^{1,9,10}

Revisão bibliográfica

Eosinófilos

Eosinófilos são leucócitos da linhagem dos granulócitos, envolvidos na resposta imune a infecções, remodelamento tecidual, vigilância tumoral e manutenção de outras células imunológicas.¹¹ Os eosinófilos representam 1-3% dos leucócitos circulantes e apresentam ciclo vital de 13 dias. Durante a metade deste período permanecem nos tecidos, em especial timo, glândulas mamárias e lâmina própria do trato gastrointestinal (exceto no esôfago). Deslocam-se para estes locais em processos inflamatórios, mas já estão alojados nos tecidos em pequeno número desde o período pré-natal, independente de estímulo antigênico. Após este período, citocinas presentes nas células endoteliais, denominadas eotaxinas, são os principais reguladores da carga eosinofílica local.¹²

Os eosinófilos do intestino delgado são considerados como contribuintes ativos para a homeostase intestinal, permitindo ao hospedeiro lidar com a constante e intensa exposição a micro-organismos potencialmente patogênicos e antígenos alimentares. Após a exposição do intestino a algum alérgeno ou parasita, o antígeno é fagocitado, processado e exposto pelas células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T helper 2 (TH2). Tais células produzem IL-5, que estimula a diferenciação, a liberação pela medula óssea e a ativação dos eosinófilos.¹² Estes polimorfonucleares são atraídos ao foco inflamatório pelas eotaxinas, principalmente do tipo 1 e 3.¹³ Eles também, quando necessário, promovem a mudança de classe para secreção de IgA, componente envolvido na neutralização e regulação de microrganismos intestinais.¹⁴

Os eosinófilos influenciam a motilidade e sensibilidade do aparelho digestivo. A proteína básica principal, liberada pelos eosinófilos quando ativados (eosinófilos degranulados), gera disfunção em receptores muscarínicos do tipo M2, levando à hipereatividade da musculatura lisa.¹⁵ Também estimula a síntese de leucotrienos (via do ácido araquidônico), os quais geram contração muscular visceral, vasoconstrição, edema e recrutamento de mais eosinófilos. Tais

células também foram relacionadas à necrose axonal, que gera distúrbio motor.¹⁶ A contração de musculatura lisa, isoladamente gera cólica por dor visceral. No caso de contrações lentificadas ou desordenadas provoca a dismotilidade, que pode estar relacionada com sintomas dispépticos.

Na mucosa gástrica, os eosinófilos participam da resposta inflamatória contra a infecção pelo *H. pylori*, com o papel de modular a capacidade da mucosa de manter, ou recuperar, sua integridade.¹⁷

Figura 1. Eosinófilos duodenais. Coloração Hematoxilina-Eosina (amostra do estudo).



Helicobacter pylori (*H. pylori*)

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa, com formato em espiral e é uma das mais prevalentes infecções da humanidade. Estima-se que 4,4 bilhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo.¹⁸

A reação inflamatória causada pelo *H. pylori* (gastrite por *H. pylori*) pode apresentar alterações de inflamação gástrica aguda e/ou crônica, com infiltração de neutrófilos, linfócitos, mastócitos e células plasmáticas.¹⁹ Os neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e células dendríticas podem infiltrar diretamente o epitélio faveolar, enquanto a lâmina própria é permeada por células mononucleares, tais como linfócitos, macrófagos e células plasmáticas.²⁰

Eosinófilos são encontrados em grande densidade no estômago, nas gastrites crônicas causadas pelo *H. pylori*. Particularmente, podem ser encontrados em uma densidade aumentada na camada superficial da lâmina própria. Infiltrado eosinofílico intraepitelial também pode ocorrer, e esse achado deve sempre ser interpretado como não usual.

Dispepsia Funcional

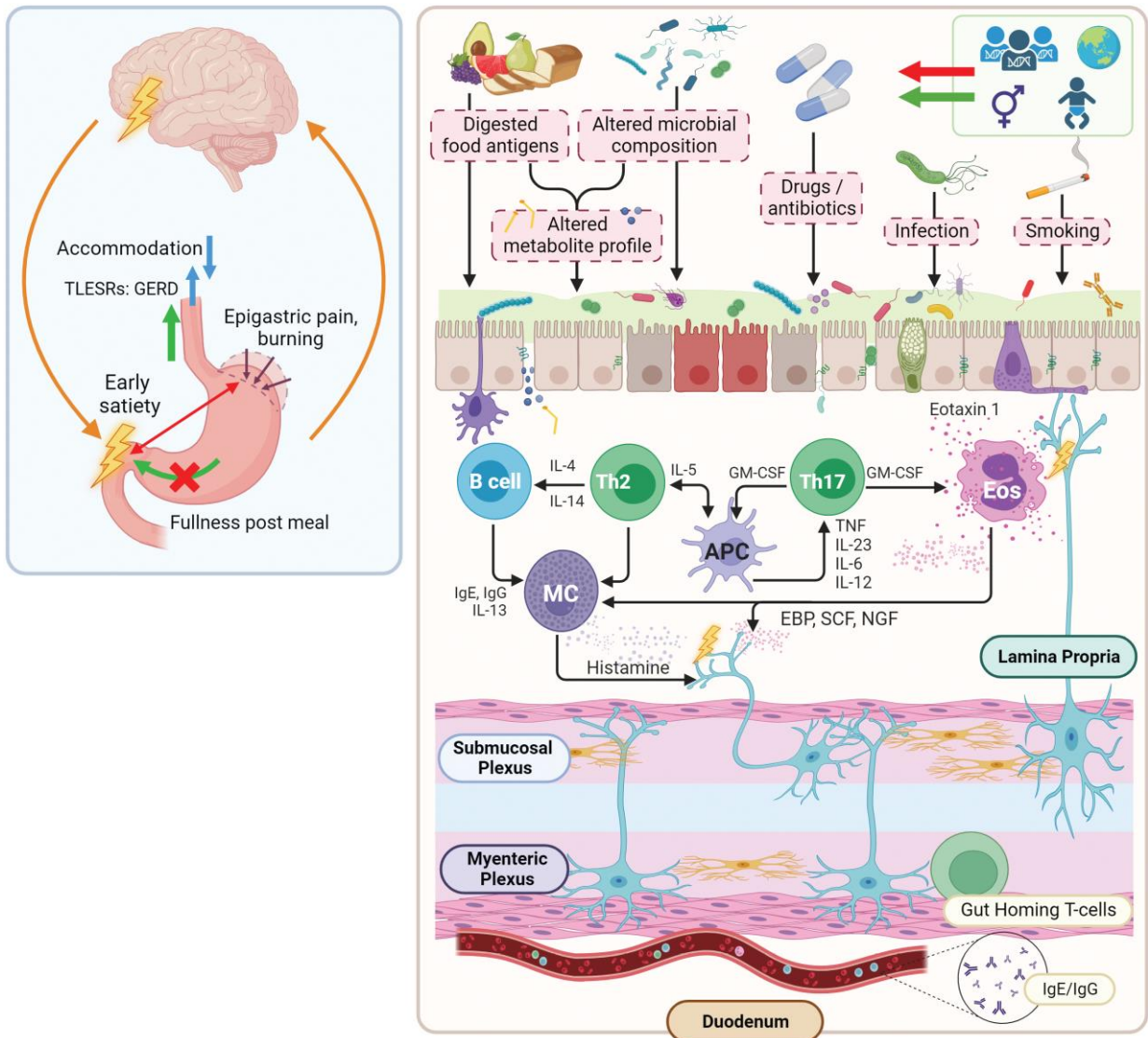
O Consenso Roma III para distúrbios funcionais gastrointestinais,²¹ define dispepsia funcional (DF) como a presença de sintomas que se presumem serem originados da região gastroduodenal na ausência de doença orgânica, sistêmica ou metabólica que os justifiquem. Para o diagnóstico dessa entidade, pelo menos um dos seguintes sintomas deverá estar presente: dor ou queimação epigástrica, plenitude pós-prandial e saciedade precoce. Os sintomas devem estar ativos nos últimos 3 meses, com início dos sintomas (primeira manifestação) pelo menos 6 meses antes do diagnóstico. Recentemente, o Consenso Roma IV reavaliou os critérios para definição de dispepsia funcional, e manteve praticamente inalterados os critérios estabelecidos pelo Consenso Roma III, apenas acrescentando que os sintomas devem causar prejuízo às atividades diárias dos pacientes.²²

A etiologia e a fisiopatologia da dispepsia funcional ainda são pouco compreendidas. Alguns potenciais mecanismos fisiopatogênicos são: alterações na motilidade gástrica e duodenal (capacidade reduzida de acomodação gástrica, hipomotilidade antral), hipersensibilidade gástrica e duodenal, alterações no funcionamento do eixo “cérebro-intestino” e infecção pelo *H. pylori*.²³ A presença de maior densidade de eosinófilos no duodeno também tem sido relacionada como um possível fator etiológico da dispepsia funcional,^{6,7} através da potencial atuação dos eosinófilos na motilidade e sensibilidade do aparelho digestivo.

Dispepsia funcional e eosinófilos duodenais

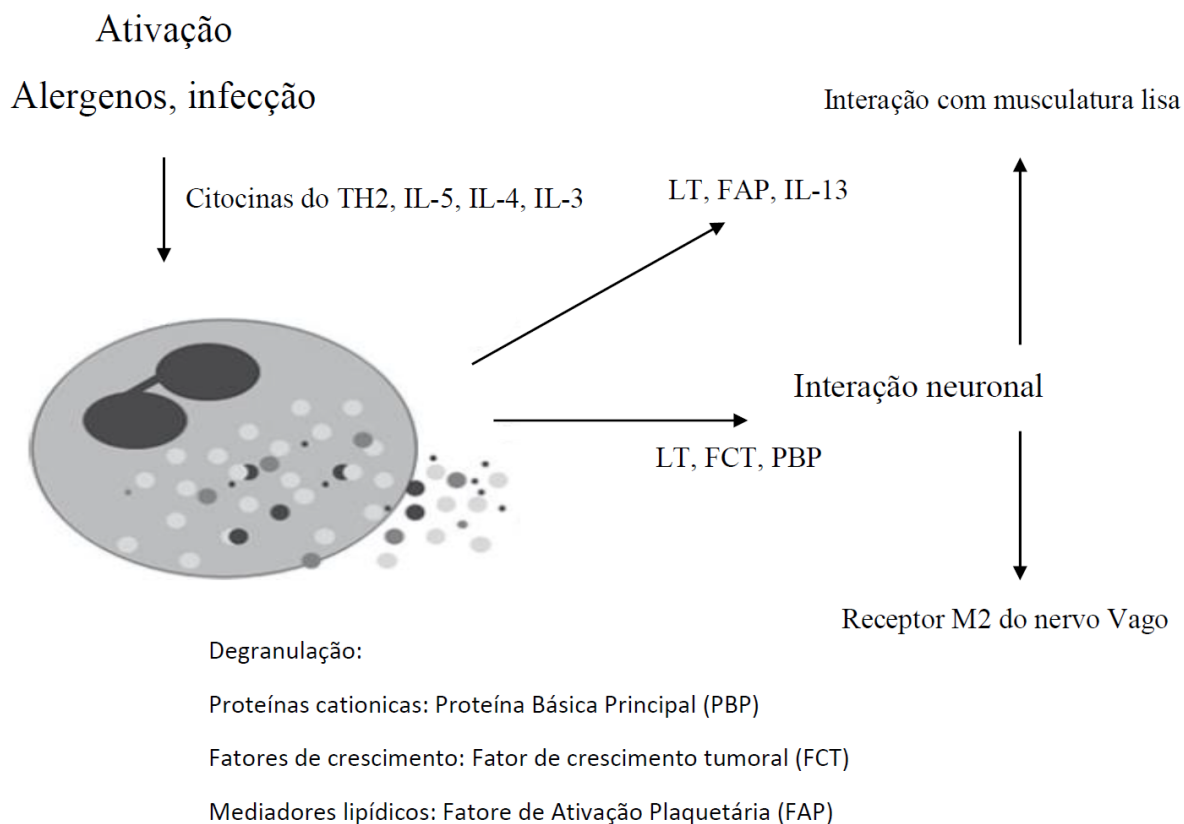
Talley N. et cols, em artigo de revisão sobre doença eosinofílica gastrointestinal,²⁴ propõe a hipótese “Two-hit” para a dispepsia funcional associada aos eosinófilos. Essa hipótese sugere que, além de um fator ambiental que induz dano à mucosa intestinal (como infecção intestinal aguda, tabagismo, exposição a AINEs ou antibióticos, e ansiedade), é necessário que ocorra, em um indivíduo geneticamente predisposto, a ativação do sistema imunológico intestinal causado pelo aumento da permeabilidade da mucosa, deixando-a exposta a antígenos microbianos e alérgenos. Uma vez ativado o sistema imunológico, ocorre o recrutamento dos eosinófilos e mastócitos, que são ativados e degranulam, perpetuando o dano na permeabilidade da mucosa e levando a alterações estruturais e funcionais dos nervos do plexo submucoso. que provocam disfunção motora e sensorial e podem desencadear sintomas dispépticos. A liberação de citocinas e neuropeptídeos pode gerar sintomas extra intestinais como ansiedade, fadiga e distúrbios do sono. (Figura 2)

Figura 2. Eosinófilos duodenais e dispepsia funcional.²⁴



Os eosinófilos são ativados por alérgenos, infecções e citocinas dos linfócitos T helper (TH2), Interleucinas (IL)-5, IL-4 e IL-13. Os produtos da degranulação dos eosinófilos, como o fator de crescimento nervoso, têm ação direta na inervação sensorial e a proteína básica principal pode induzir disfunção dos receptores muscarínicos M2 do nervo Vago. Fator de agregação plaquetária, leucotrienos e IL-13 podem agir diretamente na musculatura lisa, aumentando a reatividade e contratilidade. Portanto, os eosinófilos podem causar disfunção neurológica e provocar sintomas viscerais.²⁵ - Figura 3.

Figura 3. Mecanismo de ativação dos eosinófilos.²⁵



Legenda: TH2- linfócitos T helper 2, IL- Interleucinas, LT- leucotrienos, FAT- Fator de Ativação Plaquetária, PBP- Proteína Básica Principal, FCT- Fator de Crescimento Tumoral, M2- muscarínico tipo 2.

Infecção gástrica pelo *H. pylori* e eosinófilos duodenais

Um estudo do nosso grupo de pesquisa mostrou que a mediana da média dos eosinófilos duodenais por cinco campos de grande aumento (CGA) em indivíduos *H. pylori* positivos (13,2 eosinófilos/CGA) foi maior do que em indivíduos *H. pylori* negativos (8,1 eosinófilos/CGA), com diferença estatisticamente significativa ($p: 0,005$), embora tenha sido um achado secundário do estudo,¹⁰ no qual o objetivo principal foi avaliar a relação entre infiltrado de eosinófilos duodenais com dispepsia funcional.

No estudo de Chaudhari e colaboradores,¹ foram avaliados 50 pacientes dispépticos funcionais, com uma média de eosinófilos/CGA de $40,7 \pm 26,9$. Desses 50 pacientes, 24 eram *H. pylori* positivos e 26 *H. pylori* negativos. Foi observada correlação positiva entre a contagem de

eosinófilos duodenais com a infecção gástrica pelo *H. pylori* (p= 0,012). O objetivo principal também foi avaliar a relação entre eosinofilia duodenal com dispepsia funcional.

Estudo de Talley e colaboradores não encontrou diferença na prevalência de eosinofilia duodenal entre pacientes *H. pylori* positivos e *H. pylori* negativos, mas essa relação foi avaliada como achado secundário.⁹ O estudo de Lijun Du e colaboradores mostrou um aumento na densidade de eosinófilos da mucosa gástrica dos pacientes *H. pylori* positivos, mas não na mucosa duodenal.²⁶

Pelos nossos conhecimentos, não existem estudos na literatura que tenham avaliado, como objetivo primário, a relação da infecção pelo *H. pylori* com o número de eosinófilos duodenais. Kwang Jae Lee e colaboradores, sugerem que o *H. pylori* esteja envolvido na etiologias das inflamações duodenais, e reforça a necessidade de estudos para avaliar essa possível associação.²⁷

Tabela 1. Eosinófilos duodenais por status *H. pylori* (estudos prévios).

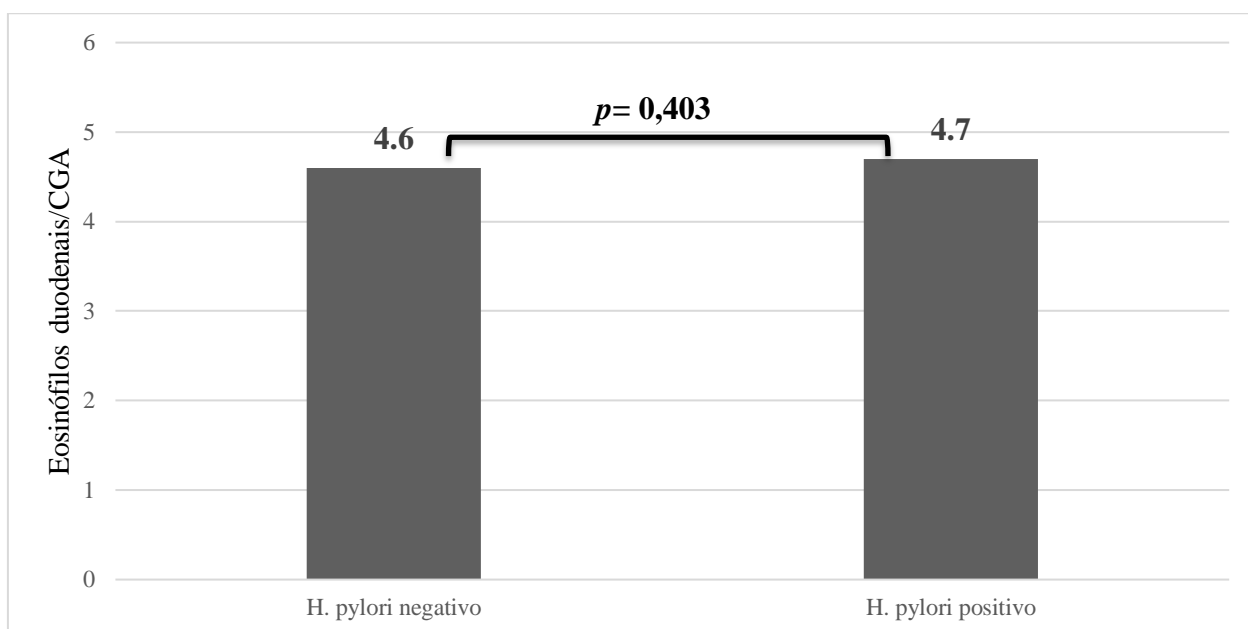
Estudo	N	Eosinófilos duodenais/CGA	p valor
Leite, C. ¹⁰		Mediana:	
<i>H. pylori</i> positivo	26	13,6	<0,001
<i>H. pylori</i> negativo	16	6,1	
Chaudhari, AA. ¹			
<i>H. pylori</i> positivo	24	- *	0,012
<i>H. pylori</i> negativo	26		
Talley, NJ. ⁹ #			
<i>H. pylori</i> positivo	27	- *	0,4 ^β
<i>H. pylori</i> negativo	72		
Du, L. ²⁶		Media:	
<i>H. pylori</i> positivo	25	49,04	0,502
<i>H. pylori</i> negativo	71	61,15	
Taki, M. ²⁸			
<i>H. pylori</i> positivo	10	-*	0,314
<i>H. pylori</i> negativo	56		

Legenda: *media/mediana não informada. # Incluídos pacientes dispépticos funcionais e controles assintomáticos.

^βComparado apenas quanto a prevalência de eosinofilia duodenal.

Em outro estudo transversal realizado pelo nosso grupo de pesquisa, em processo de publicação, foram incluídos 100 pacientes dispépticos funcionais, 50 *H. pylori* positivos e 50 *H. pylori* negativos, e não foi observada diferença nas contagens de eosinófilos duodenais entre os grupos (Figura 4).

Figura 4. Eosinófilos nos vilos duodenais de acordo com o status do *H. pylori*.



Contagem dos eosinófilos duodenais

Um problema na avaliação dos eosinófilos duodenais, que provavelmente contribui de forma significativa pelos resultados conflitantes entre os estudos, é a falta de padronização dos métodos de contagem desses eosinófilos, que variam bastante entre os estudos.²⁹ A maioria dos autores realiza contagem de células por campo de grande aumento (CGA), enquanto outros, com auxílio de softwares, utilizam a contagem de células/mm². Embora, com frequência, cinco CGA não sobrepostos sejam usados para avaliar as amostras duodenais, alguns autores utilizaram três

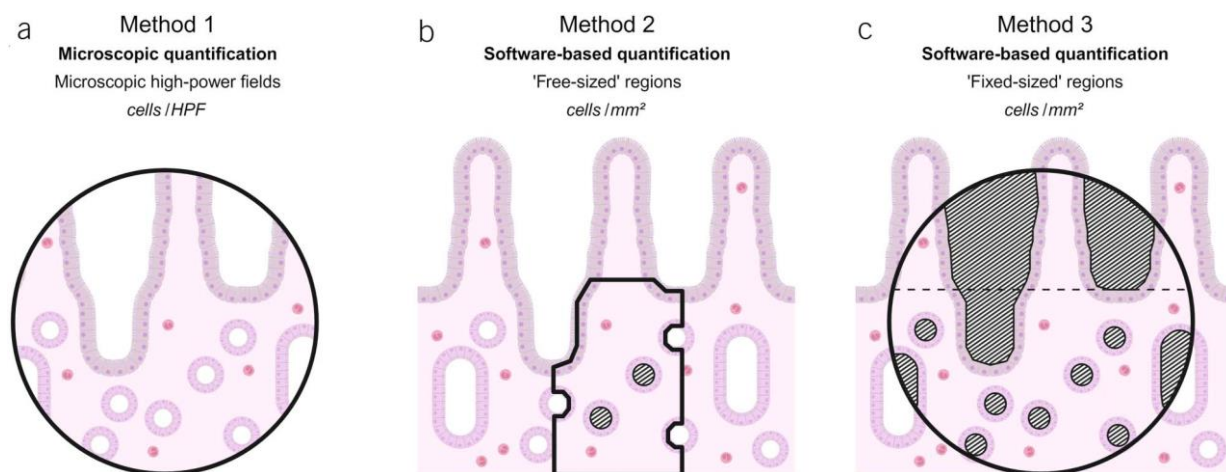
ou sete CGA,^{28,30} selecionados aleatoriamente ou por áreas de maior concentração de eosinófilos, os “hot spots”.

Outro dado que recentemente se mostrou relevante na avaliação dos eosinófilos duodenais, é a inclusão da contagem dos eosinófilos degranulados, que mostrou melhor correlação com sintomas dispépticos, em alguns estudos.^{29,31}

A coloração das lâminas pode ser realizada com Hematoxilina & Eosina (H&E) ou com Imuno-histoquímica (IHQ). Ceulemans et al comparou os dois métodos de coloração, e não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre eles, nas contagens dos eosinófilos.³²

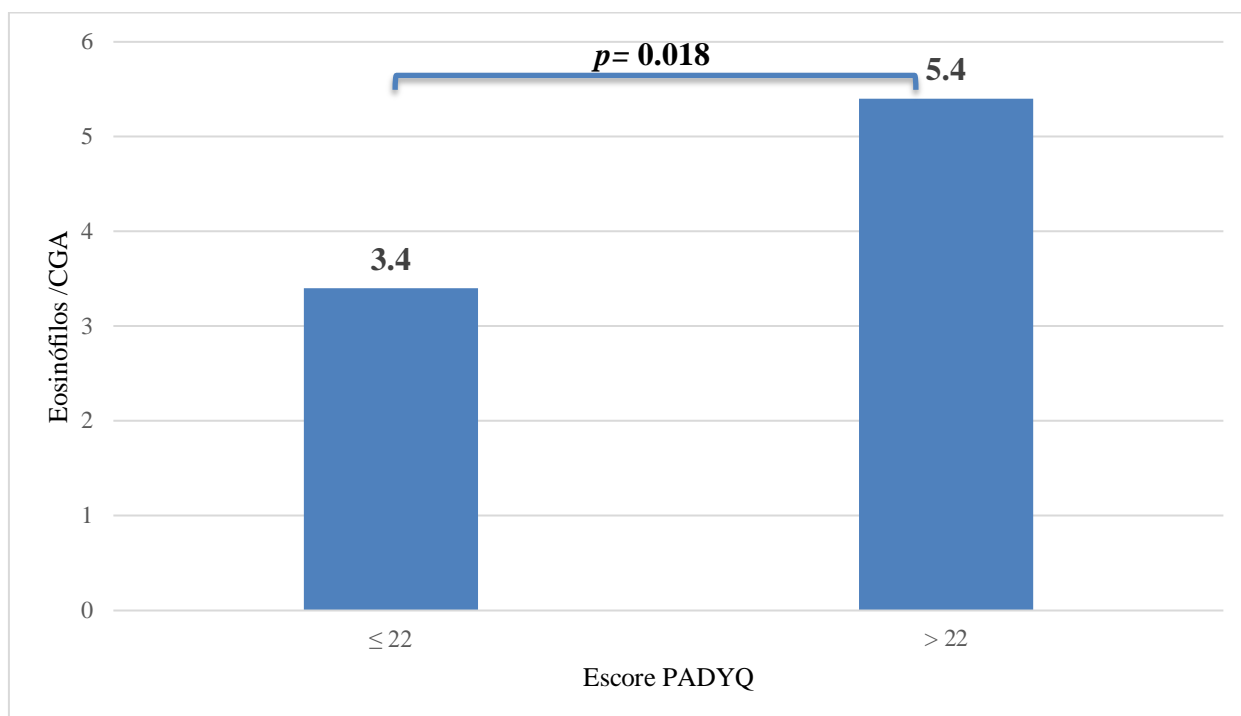
Outro problema em relação às contagens dos eosinófilos é a concordância entre os examinadores. Nesse mesmo estudo de Ceulemans et al,³² foi realizada uma avaliação de concordância nas contagens entre três patologistas experientes, por três métodos diferentes (Figura 5): método “a”: foi utilizado o microscópio convencional, e realizada a contagem em três campos de grande aumento aleatórios, e um “hot spot”. Para os métodos “b” e “c”, as lâminas de patologia foram digitalizadas e analisada no software ImageScope (descartando as áreas não contempladas por mucosa). Método “b”: foram utilizadas porções de mucosa longitudinais que contemplavam a área da lâmina própria até a base de uma vilosidade (“Free-sized” regions). Método “c”: referido pelos autores como “Leuven Intestinal Counting Protocol (LICP)”, foi utilizado pelo software uma área circular com o diâmetro de um CGA do microscópio convencional (“Fixed-sized” regions). O método “a”: Coeficiente de correlação intraclassa (ICC-C) bom (0,796) e Coeficiente de correlação absoluto (ICC-A) moderado (0,708). O Método “b” apresentou ICC-C (0,644) e ICC-A (0,619) moderados. Já o método “c”, o método LICP, apresentou uma melhora significativa do ICC-C, com resultado excelente (0,909) e, apesar de não ser estatisticamente significativo, também apresentou melhora do ICC-A (0,809).

Figura 5. Três métodos de contagens de eosinófilos avaliados por Ceulemans et al.³²



Outro dado do estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, em processo de publicação, foi a associação diretamente proporcional entre a intensidade dos sintomas dispépticos e a contagem de eosinófilos, realizada exclusivamente nos vilos duodenais. Mas, a contagem de eosinófilos na base da mucosa - incluindo a área entre a lâmina própria e a base do vilos/cripta - não demonstrou essa mesma associação com os sintomas. Pelos nossos conhecimentos, esse achado ainda não foi explorado em outros estudos na literatura (Figura 6).

Figura 6. Eosinófilos nos vilos duodenais, de acordo com intensidade dos sintomas dispépticos



Referências

1. Chaudhari AA, Rane SR, Jadhav MV. Histomorphological Spectrum of Duodenal Pathology in Functional Dyspepsia Patients. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2017;11(6):EC01-EC04. doi:10.7860/JCDR/2017/25297.9985
2. Du L, Shen J, Kim JJ, Yu Y, Ma L, Dai N. Increased Duodenal Eosinophil Degranulation in Patients with Functional Dyspepsia: A Prospective Study. *Sci Rep*. 2016;6(1):34305. doi:10.1038/srep34305
3. Futagami S, Shindo T, Kawagoe T, et al. Migration of eosinophils and CCR2-/CD68-double positive cells into the duodenal mucosa of patients with postinfectious functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(8):1835-1842. doi:10.1038/ajg.2010.151

4. Genta RM, Sonnenberg A, Turner K. Quantification of the duodenal eosinophil content in adults: a necessary step for an evidence-based diagnosis of duodenal eosinophilia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47(8):1143-1150. doi:10.1111/apt.14558
5. Walker MM, Salehian SS, Murray CE, et al. Implications of eosinophilia in the normal duodenal biopsy - an association with allergy and functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31(11):1229-1236. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04282.x
6. Walker MM, Aggarwal KR, Shim LS, et al. Duodenal eosinophilia and early satiety in functional dyspepsia: confirmation of a positive association in an Australian cohort. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(3):474-479. doi:10.1111/jgh.12419
7. Binesh F, Akhondei M, Pourmirafzali H, Rajabzadeh Y. Determination of relative frequency of eosinophils and mast cells in gastric and duodenal mucosal biopsies in adults with non-ulcer dyspepsia. *J Coll Physicians Surg--Pak JCPSP.* 2013;23(5):326-329. doi:05.2013/JCPSP.326329
8. Hogan SP, Mishra A, Brandt EB, et al. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. *Nat Immunol.* 2001;2(4):353-360. doi:10.1038/86365
9. Talley NJ, Walker MM, Aro P, et al. Non-ulcer dyspepsia and duodenal eosinophilia: an adult endoscopic population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2007;5(10):1175-1183. doi:10.1016/j.cgh.2007.05.015
10. Leite C, Mazzoleni LE, Uchoa DDM, Castanho JA, Mazzoleni F, Sander GB. Association of duodenal eosinophilic infiltrate with *Helicobacter pylori* infection, but not with functional dyspepsia. *Arq Gastroenterol.* 2020;57(1):74-78. doi:10.1590/s0004-2803.202000000-13

11. O'Sullivan JA, Bochner BS. Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):505-517. doi:10.1016/j.jaci.2017.09.022
12. Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med*. 2017;4. doi:10.3389/fmed.2017.00101
13. Keely S, Walker MM, Marks E, Talley NJ. Immune dysregulation in the functional gastrointestinal disorders. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(12):1350-1359. doi:10.1111/eci.12548
14. Chu VT, Beller A, Rausch S, et al. Eosinophils Promote Generation and Maintenance of Immunoglobulin-A-Expressing Plasma Cells and Contribute to Gut Immune Homeostasis. *Immunity*. 2014;40(4):582-593. doi:10.1016/j.immuni.2014.02.014
15. Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1314-1318. doi:10.1172/JCI116331
16. Lee KJ, Tack J. Duodenal implications in the pathophysiology of functional dyspepsia. *J Neurogastroenterol Motil*. 2010;16(3):251-257. doi:10.5056/jnm.2010.16.3.251
17. Prevete N, Rossi FW, Rivellese F, et al. Helicobacter pylori HP(2-20) induces eosinophil activation and accumulation in superficial gastric mucosa and stimulates VEGF-alpha and TGF-beta release by interacting with formyl-peptide receptors. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(3):647-662. doi:10.1177/039463201302600308
18. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017;153(2):420-429. doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022

19. Ieni A, Barresi V, Rigoli L, Fedele F, Tuccari G, Caruso RA. Morphological and Cellular Features of Innate Immune Reaction in Helicobacter pylori Gastritis: A Brief Review. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):109. doi:10.3390/ijms17010109
20. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(10):1161-1181. doi:10.1097/00000478-199610000-00001
21. Drossman DA, Dumitrascu DL. Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *J Gastrointest Liver Dis JGLD.* 2006;15(3):237-241.
22. Stanghellini V, Talley NJ, Chan F, et al. Rome IV - Gastroduodenal Disorders. *Gastroenterology.* 2016;150(6):1380-1392. doi:10.1053/j.gastro.2016.02.011
23. Prevede N, Rossi FW, Rivellese F, et al. Helicobacter pylori HP(2-20) induces eosinophil activation and accumulation in superficial gastric mucosa and stimulates VEGF-alpha and TGF-beta release by interacting with formyl-peptide receptors. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013;26(3):647-662. doi:10.1177/039463201302600308
24. Talley NJ, Burns GL, Hoedt EC, Duncanson K, Keely S. Beyond Eosinophilic Esophagitis: Eosinophils in Gastrointestinal Disease—New Insights, “New” Diseases. *J Can Assoc Gastroenterol.* 2023;6(6):199-211. doi:10.1093/jcag/gwad046
25. Walker MM, Talley NJ, Prabhakar M, et al. Duodenal mastocytosis, eosinophilia and intraepithelial lymphocytosis as possible disease markers in the irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29(7):765-773. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.03937.x

26. Du L, Shen J, Kim JJ, Yu Y, Ma L, Dai N. Increased Duodenal Eosinophil Degranulation in Patients with Functional Dyspepsia: A Prospective Study. *Sci Rep.* 2016;6(1):34305. doi:10.1038/srep34305
27. Lee KJ, Tack J. Duodenal implications in the pathophysiology of functional dyspepsia. *J Neurogastroenterol Motil.* 2010;16(3):251-257. doi:10.5056/jnm.2010.16.3.251
28. Taki M, Oshima T, Li M, et al. Duodenal low-grade inflammation and expression of tight junction proteins in functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil.* 2019;31(10):e13576. doi:10.1111/nmo.13576
29. Shah A, Fairlie T, Brown G, et al. Duodenal Eosinophils and Mast Cells in Functional Dyspepsia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2022;20(10):2229-2242.e29. doi:10.1016/j.cgh.2022.01.014
30. Vanheel H, Vicario M, Vanuytsel T, et al. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. *Gut.* 2014;63(2):262-271. doi:10.1136/gutjnl-2012-303857
31. Järbrink-Sehgal ME, Sparkman J, Damron A, et al. Functional Dyspepsia and Duodenal Eosinophil Count and Degranulation: A Multiethnic US Veteran Cohort Study. *Dig Dis Sci.* 2021;66(10):3482-3489. doi:10.1007/s10620-020-06689-2
32. Ceulemans M, Huyghe P, De Hertogh G, et al. Redefining Histological Cell Counts Using a Standardized Method: The Leuven Intestinal Counting Protocol. *Clin Transl Gastroenterol.* Published online June 18, 2024. doi:10.14309/ctg.0000000000000725

Justificativa

Não existe definição na literatura, de qual é o papel da infecção gástrica pelo *H. pylori* sobre o número de eosinófilos duodenais. Poucos estudos avaliaram essa relação e os dados são insuficientes e contraditórios para uma conclusão.

Metanálises e estudos recentes têm demonstrado que a infecção pelo *H. pylori* pode ser uma das causas da dispepsia funcional. Embora a associação entre DF e a densidade dos eosinófilos duodenais ainda permaneça controversa, alguns estudos demonstraram associação positiva entre essas duas condições.

Portanto, é importante saber se a infecção gástrica pelo *H. pylori* causa aumento na densidade dos eosinófilos duodenais, que poderiam estar envolvidos na gênese dos sintomas em alguns pacientes dispépticos funcionais.

Questão da pesquisa

O tratamento para erradicação do *H. pylori* tem influência no número de eosinófilos duodenais em pacientes dispépticos funcionais *H. pylori* positivos?

A população de eosinófilos duodenais tem influência na intensidade dos sintomas dispépticos, antes e após o tratamento de erradicação do *H. pylori*?

Hipótese

O número de eosinófilos duodenais vai reduzir após o tratamento de erradicação do *H. pylori*.

O número de eosinófilos duodenais vai reduzir em pacientes que apresentarem melhora sintomática após o tratamento para erradicação do *H. pylori*.

Objetivos

PRINCIPAL

Avaliar o efeito do tratamento de erradicação da infecção pelo *H. pylori* na população de eosinófilos da mucosa duodenal, e avaliar a relação da população de eosinófilos duodenais com os sintomas da dispepsia funcional, através da análise secundária de estudo clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo.

SECUNDÁRIOS

Avaliar a evolução da população de eosinófilos duodenais nos pacientes que efetivamente erradicaram o *H. pylori* com o tratamento *versus* os pacientes tratados que não erradicaram a bactéria.

Avaliar se o número de eosinófilos na mucosa duodenal tem influência nos diferentes subgrupos de dispepsia funcional (tipo dor epigástrica e tipo desconforto pós prandial)

Avaliar se variáveis demográficas e ambientais têm influência na população de eosinófilos da mucosa duodenal.

Artigo em inglês

**Potential Association of Duodenal Villi Eosinophils with
Helicobacter pylori Infection and with Functional Dyspepsia:
Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial**

Authors

Felipe Mazzoleni^{2,4}; Diego de Mendonça Uchoa⁵; Luiz Edmundo Mazzoleni^{1,2,3}; Carlos Fernando de Magalhães Francesconi^{1,2,3}; Tobias Cancian Milbradt²; Alexandra Cauduro Ponso Fernandes⁵; Gabriela Remonato⁵; Fernanda de Miranda Schmitz¹; Rafaela Pivato da Fonseca¹; Daniel Simon⁶; Nicholas J. Talley⁷

Author Affiliations

1 School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2 Graduate Program Sciences in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

3 Department of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

4 Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

5 Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

6 Human Molecular Genetics Laboratory, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brazil

7 Faculty of Health and Medicine, University of Newcastle, Newcastle, Australia

Introduction

While the pathophysiology of functional dyspepsia remains poorly understood, several mechanisms have been implicated, including alterations in the brain-gut axis, impaired gastric motility, visceral hypersensitivity, psychosocial factors, and increased acid secretion. Recent studies have increasingly highlighted the role of inflammatory infiltrates in the duodenal mucosa, such as eosinophils and mast cells, even at low densities, as potential pathophysiological factors

in this condition, though findings have been controversial.¹⁻⁴ These inflammatory infiltrates typically occur without significant endoscopic changes or noticeable microscopic structural alterations in the duodenal villi and crypts.

Duodenal eosinophils are associated with intestinal parasites and food allergies,⁵ and has been implicated as a potential factor in the etiology of functional dyspepsia,^{6,7} possibly by causing changes in the motility and sensitivity of the digestive tract, as observed in studies with animal models.⁸ Its relationship with *H. pylori* is little known, having been evaluated only as a secondary finding in some studies, with controversial results.^{1,9,10} To our knowledge, no studies have evaluated the impact of *H. pylori* treatment on the population of eosinophils in the duodenum. In a previous study conducted by our group, which is currently being prepared for publication, we identified a direct association between the severity of dyspeptic symptoms and eosinophilic infiltration in the duodenal villi. Notably, this association was not found at the base of the duodenal mucosa.

This study aims to evaluate the potential association between *H. pylori* treatment and duodenal villi eosinophils. Additionally, it seeks to assess the impact of duodenal villi eosinophils on the severity of dyspeptic symptoms over a 12-month follow-up period. Furthermore, we intend to investigate the influence of demographic factors on eosinophil in duodenal villi.

Methods

Study design and participants

We use data from our previous study HEROES Trial (Helicobacter Eradication Relief Of Dyspeptic Symptoms),¹¹ an industry-independent, double-blind, placebo-controlled, randomized trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00404534) which tested the efficacy of *H. pylori* treatment on functional dyspepsia symptoms. The present study aims to evaluate a possible

influence of *H. pylori* treatment in duodenal eosinophils infiltration and the influence of duodenal villi eosinophil population in dyspeptic symptoms severity. The clinical, endoscopic, and histologic variables for this study were previously determined, collected in accordance with the protocol, and are registered at ClinicalTrials.gov.

This study was conducted in a single academic hospital, the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA; Porto Alegre, Brazil). Community-based and primary care patients of both sexes were consecutively enrolled in the randomized clinical trial (RCT) if aged 18 years or older, having a diagnosis of functional dyspepsia according to the Rome III criteria, and *H. pylori* positivity. In the present study we included 16 consecutive subjects from each group of randomizations of HEROES Trial (16 from antibiotics group and 16 from placebo group) that perform upper gastrointestinal endoscopy at baseline and 12 months after treatment and with duodenal biopsy samples collected. The complete exclusion criteria can be found in detail elsewhere.¹¹

Study Procedures

Subjects were recruited in the HEROES Trial between November 2006 and June 2008. At the screening visit medical history, demographic data evaluation, and physical exam were performed .

In HEROES Trial were included patients of either sex if they were 18 years or older and had a diagnosis of *H. pylori* infection and functional dyspepsia according to the Rome III International Consensus criteria. Were excluded patients with predominant symptoms of heartburn or irritable bowel syndrome; alarm symptoms; history of peptic ulcer, upper gastrointestinal tract surgery, or biliary colic; previous treatment for eradication of *H. pylori*; known allergies to study medication; serious comorbidities; or alcohol or drug abuse. Use of

antibiotics or bismuth during the 4 weeks before enrollment, proton pump inhibitors during the 2 weeks before enrollment, or treatment with histamine-2 receptor blockers in the week before enrollment were not permitted. Were also excluded women of childbearing potential; patients unable to answer the study questionnaires; patients with endoscopic findings other than gastritis, duodenitis, or hiatal hernia; and patients unwilling or unable to provide consent.

Subjects who met the inclusion criteria and did not present exclusion criteria were referred for laboratory tests and upper gastrointestinal endoscopy, with gastric and duodenal biopsy samples collected. The severity of the dyspeptic symptoms was evaluated by the PADYQ questionnaire (Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire).¹² This 11-item validated instrument evaluates the three most important symptoms of functional dyspepsia (upper abdominal pain, abdominal distension, and early satiety), also nausea and vomiting, in the previous 30 days. This procedure allows assessing the severity of each symptom by its frequency, intensity, and duration. In this questionnaire, the severity of symptoms varies from 0 (absence of symptoms) to 44 (severe symptoms) points, and subjects with more than 7 points are considered dyspeptic. After 12 months of treatment, patients were submitted to a second upper gastrointestinal endoscopy, and evaluated for dyspeptic symptoms severity (PADYQ). In the present study, patients from the HEROES trial were selected in a consecutive manner.

Endoscopies were performed at HCPA. Two experienced endoscopists performed the endoscopic procedures. In cases of disagreement in endoscopic diagnoses between the first two examiners, a third endoscopist was consulted. Three biopsy specimens were obtained from the body of the stomach, 3 from the antrum, 2 from the incisura angularis, and 2 from the second portion of duodenum. One specimen from each gastric anatomical region was used for the urease test, and the others were used for histologic examination.

Two pathologists performed histologic exams. The severity of histological gastritis was graded according to the updated Sydney System.¹³ The positivity of *H. pylori* was evaluated by

urease test and gastric histology (Hematoxilina & Eosina e Giemsa), and was required to be positive by both methods. In case of disagreement between results, another pathologist defined the diagnosis.

Duodenal samples were stained with Hematoxylin-eosin. The eosinophil count in the duodenal mucosa was performed in one high-power field (HPF) from the duodenal villi, selected based on peak eosinophil concentration (“hot spot”). All slides were evaluated by experienced pathologists, blinded to group of treatment, time of biopsy collection, gastric histology findings, and patients’ symptoms. We chose to exclusively count the eosinophils in the duodenal villi due to the results found in a previous study by our research group, which is currently in the publication process

The duodenal villi eosinophils were evaluated, at baseline and 12 months after treatment, between the two groups of *H. pylori* treatment, and by symptoms improvement at the end of follow-up. Patients were considered to have achieved symptoms improvement if they had a reduction of at least 50% in the PADIQ score by the end of the follow-up.¹¹

Duodenal villi eosinophils were also evaluated for baseline symptoms severity according to PADIQ questionnaire as a categorical variable, divided into two groups: up to 22 and higher than 22.

Duodenal villi eosinophils were also evaluated by demographic variables.

Statistical analysis

The variables were analyzed using the SPSS program (Statistical Package for Social Sciences) version 21.0; p -values < 0.05 (two-tailed) were considered statistically significant. The mean (\pm standard error) per HPF was used to evaluate eosinophils according to the variables. The mean duodenal villi eosinophils per HPF, measured at baseline and 12 months after treatment,

was compared between treatment groups and with symptom improvement. The variation was determined by comparing the counts at 12 months post-treatment with the baseline counts, where positive results indicated an increase and negative results indicated a decrease.

Categorical variables were assessed using the chi-square test. Quantitative variables were compared between two groups using Student's t-test or Mann-Whitney U test, depending on the results of the Shapiro-Wilk normality test. For comparisons involving quantitative variables with more than two groups and asymmetric continuous variables, the Kruskal-Wallis test was employed. The Wilcoxon signed-rank test was used for paired data. The Spearman correlation test assessed the relationships between variables. Additionally, an age-adjusted multivariate analysis was conducted to evaluate variables significantly associated with duodenal eosinophils, including all variables with a p-value ≤ 0.10 from univariable analysis.

Ethical Considerations

This study is registered in the Institutional Review Board (Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul) under number GPPG 2019-0578 (CAAE: 20014719.3.000.5327) and was approved on October 11, 2019 (approval number: 3,632,831). The project is linked to the HEROES study, which was already approved by the Review Board of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG 05-422), for which all patients signed the Informed Consent Form (ICF), authorizing the use of their data in future research.

The project was developed in accordance with Resolution 466/12 of the National Health Council, which regulates ethical aspects of research involving human subjects in Brazil.

In the present study, data from medical records and paraffin blocks from duodenal biopsies of patients from the HEROES study were used. There was no direct patient interaction, recruitment, or intervention, justifying the absence of a new Informed Consent Form. This study

presents a common risk associated with all research involving human subjects: the risk of breach of confidentiality. Therefore, while researchers are committed to doing their best to protect participants' privacy, the risk of breach of confidentiality, even if inadvertent and unintentional, must be acknowledged. As a potential benefit, the study is expected to contribute to a better understanding of the role of duodenal eosinophils in functional dyspepsia, which could help improved treatment strategies for patients with this condition.

The researchers are also committed to preserving the institutional information collected in databases of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and they agree that this information will be used solely for the execution of the present project. The information will be disclosed only in an anonymized form.

Results

Thirty-two patients from the HEROES Trial were included, 16 from antibiotic group and 16 from placebo group (Figure 1).¹¹

Women accounted for 87.5% of the sample, 81.2% were white and the mean age was 44.75 years. The baseline characteristics of the two groups of treatment showed no statistically significant difference, except for smoking status ($p= 0.032$)- Table 1. There was the loss of one sample collected 12 months after treatment, from the placebo group, due to an inadequate material of duodenal biopsy.

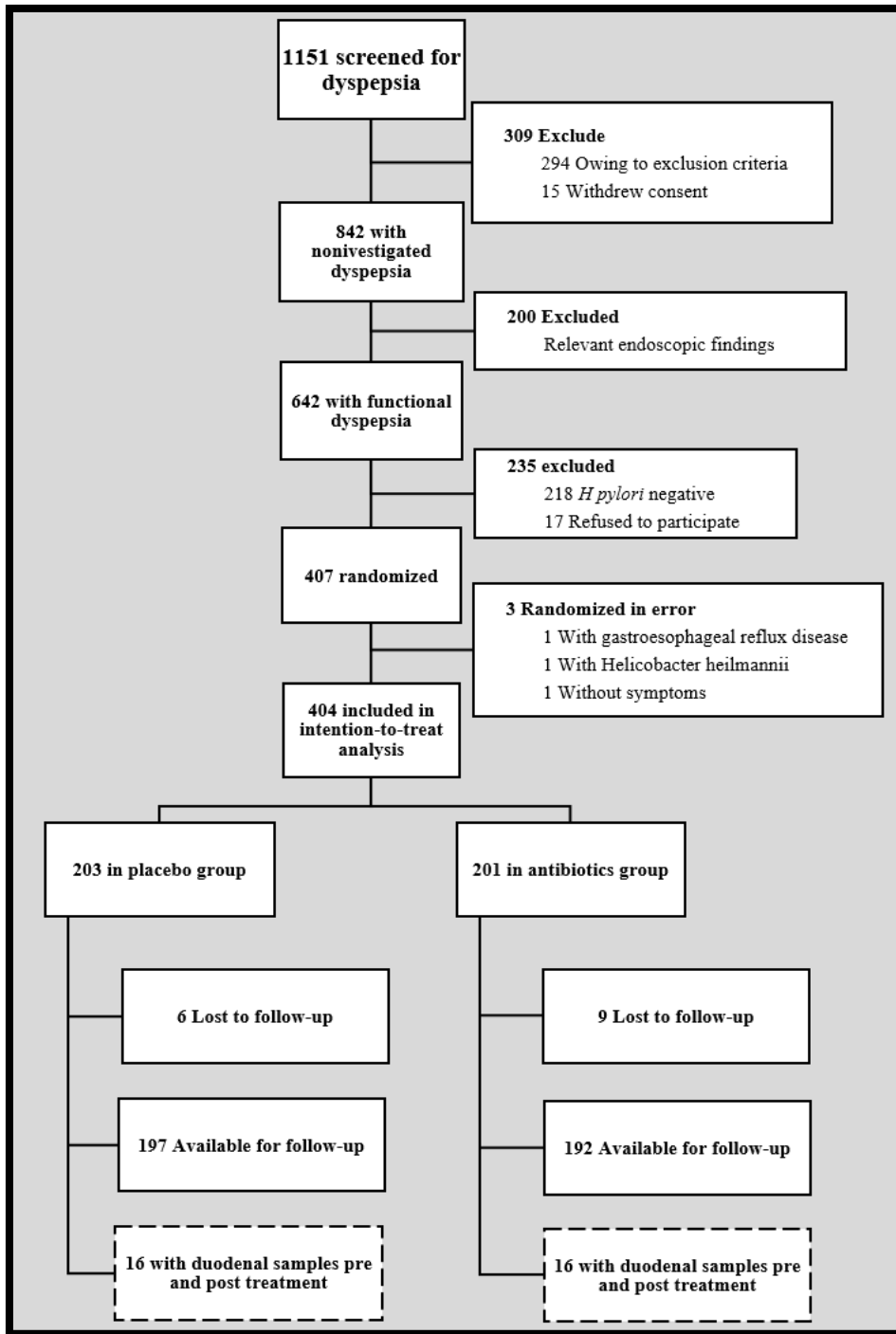


Figure 1. Flow of participants in HEROES trial (continuous line) and present study (dashed line).

Table 1. Baseline characteristics of the study patients, stratified according to treatment group

Variable	Total N= 32	Antibiotics n= 16	Placebo n= 16
Age (years) – Mean ± SD	44.75 ± 9.88	47.87 ± 10.18	41.62 ± 8.80
Sex – n (n%)			
Male	4 (12.5%)	3 (18.8%)	1 (6.2%)
Female	28 (87.5%)	13 (81.2%)	15 (93.8%)
Color – n (n%)			
White	26 (81.2)	14 (87.5)	12 (75.0)
Non white	6 (18.8)	2 (12.5)	4 (25.0)
BMI – Mean ± SD	26.05 ± 3.91	26.29 ± 2.94	25.82 ± 4.78
Education (N=31*) – n (n%)			
< 10 years	17 (54.8)	8 (53.3)	9 (56.2)
≥ 10 years	14 (45.2)	7 (46.7)	7 (43.8)
Marital status			
Single or without partner	16 (50.0)	8 (50.0)	8 (50.0)
Married or with partner	16 (50.0)	8 (50.0)	8 (50.0)
Income (R\$/ month) – mean ± SD	1322.78 ± 875.73	1396.19 ± 926.94	1249.38 ± 845.11
Use of NSAIDs – n (n%)			
No	29 (90.6)	13 (81.2)	16 (100.0)
Yes	3 (9.4)	3 (18.8)	0 (0.0)
Smoking status – n (n%)			
Never smoked	17 (53.1)	5 (31.2)	12 (75.0)
Current/former	15 (46.9)	11 (68.8)	4 (25.0)
Alcohol consumption– n (n%)			
No consumption	27 (84.4)	12 (75.0)	15 (93.8)
Current/ former	5 (15.6)	4 (25.0)	1 (6.2)
Local tea drinking (Mate) – n (n%)	13 (40.6)	7 (43.8)	6 (37.5)

No	19 (59.4)	9 (56.2)	10 (62.5)
Yes			
Coffee drinking– n (n%)			
No	8 (25.0)	4 (25.0)	4 (25.0)
Yes	24 (75.0)	12 (75.0)	12 (75.0)
Score of dyspeptic symptoms (PADYQ) – Mean ± SD			
	23.09 ± 6.63	24.06 ± 5.81	22.13 ± 7.43
Functional dyspepsia subtype – n (n%)			
EPS	16 (50.0)	8 (50.0)	8 (50.0)
PPDS	16 (50.0)	8 (50.0)	8 (50.0)
Duodenal endoscopic findings –n (n%)			
Normal	30 (93.8)	15 (93.8)	15 (93.8)
Enanthematous	1 (3.1)	1 (6.2)	0 (0.0)
Erosive	1 (3.1)	0 (0.0)	1 (6.2)

SD – standard deviation. BMI – body mass index. EPS – Epigastric pain syndrome. PPDS – Postprandial distress syndrome. PADYQ – Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire. *reduced N by missing data.

Main Outcomes

Two patients in the antibiotics group did not eradicate *H. pylori*, resulting in an eradication rate of 87.5%. All patients in the placebo group remained *H. pylori* positive by the end of the follow-up.

Mean duodenal villi eosinophils [Mean (± standard error) Eosinophils (Eos) per high power fields (HPF)] were similar between antibiotics and *placebo* groups at baseline [6.56 (± 1.67) Eos/HPF vs 5.13 (± 1.81) Eos/HPF; p= 0.184] and after 12 months of follow-up [5.00 (± 0.75) Eos/HPF vs 4.00 (± 0.74) Eos/HPF; p= 0.338]. Both groups demonstrated a slight reduction in duodenal villi eosinophils at the end of follow-up [-1.56 (± 1.66) Eos/HPF vs -1.13 (± 1.45) Eos/HPF; p= 0.232]- Table 2.

When assessing duodenal villi eosinophils based on *H. pylori* status after 12 months of follow-up (regardless of treatment group), the results were similar of those observed according to treatment group. Patients who successfully eradicated *H. pylori* and those who remained positive showed a decrease in eosinophil infiltration in the duodenal villi – Table 2.

Table 2. Duodenal villi eosinophils at baseline and at the end of follow-up, according to treatment group and *H. pylori* status.

Variable	N = 31 [#]	Eosinophil/ HPF	Eosinophil/ HPF	Eosinophil/ HPF
		Baseline	End of follow-up	Variation
		Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE
Treatment group				
Antibiotics	16	6.56 ± 1.67	5.00 ± 0.75	-1.56 ± 1.66
Placebo	15 [#]	5.13 ± 1.81	4.00 ± 0.74	-1.13 ± 1.45
P value*		0.184	0.338	0.232
<i>H. pylori</i> status at the end of follow-up				
Negative	14	7.21 ± 1.85	5.50 ± 0.77	-1.71 ± 1.90
Positive	17 [#]	4.76 ± 1.61	3.71 ± 0.68	-1.06 ± 1.28
P value*		0.054	0.059	0.377

Abbreviations: HPF – high power fields, End of Follow-up, SE – standard error. *Mann-Whitney U Test. [#] reduced N by missing data.

The proportion of patients with dyspeptic symptoms improvement in the antibiotics group was 50.0%, and in placebo group was 37.5% ($p = 0.722$). These results are similar with those from the HEROES trial, which reported 49% improvement in the antibiotics group compared to 36.5% in the placebo group.¹¹

Patients from the two treatment groups were grouped to assess the variation of duodenal villi eosinophils in terms of symptomatic improvement at the end of follow-up. Patients who showed symptomatic improvement had similar baseline duodenal villi eosinophil compare to those who did not (6.15 ± 2.08 vs 5.67 ± 1.51 ; $p = 0.722$), as well as after follow-up (3.77 ± 0.67

vs 5.06 ± 0.76 ; $p = 0.293$). The variation of eosinophil infiltration were similar between both groups (-2.38 ± 1.86 vs -0.61 ± 1.33 , $p = 0.417$)– Table 3.

Table 3. Duodenal villi eosinophils count at baseline and at the end of follow-up, according to symptoms improvement.

Variable	N = 31 [#]	Eosinophil/ HPF Baseline Mean \pm SE	Eosinophil/ HPF End of follow-up Mean \pm SE	Eosinophil/ HPF Variation Mean \pm SE
Symptoms improvement				
Yes	13 [#]	6.15 ± 2.08	3.77 ± 0.67	-2.38 ± 1.86
No	18	5.67 ± 1.51	5.06 ± 0.76	-0.61 ± 1.33
P value*		0.722	0.293	0.417

Abbreviations: HPF – high power fields. SE – standard error. *Mann-Whitney U test. [#] reduced N by missing data.

We analyzed patients with and without symptom improvement according to their treatment groups. Patients of antibiotics group who showed symptom improvement at the end of follow-up demonstrated a significant reduction in duodenal villi eosinophils, decreasing from $8.50 (\pm 3.14)$ Eos/HPF to $3.75 (\pm 2.74)$ Eos/HPF ($p = 0.042$). In contrast, patients who received placebo exhibited an increase in duodenal villi eosinophils, rising from $2.40 (\pm 0.60)$ Eos/HPF to $3.80 (\pm 0.66)$ Eos/HPF ($p = 0.038$). The difference in the variation of the two groups was statistically significant ($p = 0.002$). There was no difference in the variation of eosinophil among patients without symptoms improvement by the end of follow-up, regardless of treatment group ($p=0.408$)- Table 4.

Table 4. Duodenal villi eosinophils count at baseline and at the end of follow-up, according to symptoms improvement at the end of follow-up and treatment group.

Variable	N	Eosinophil/HPF Baseline Mean ± SE	Eosinophil/HPF End of follow-up Mean ± SE	Eosinophil/HPF Variation Mean ± SE	P Value* Rows
With symptoms improvement					
<u>Treatment group</u>					
Antibiotics	8	8.50 ± 3.14	3.75 ± 1.05	-4.75 ± 2.74	0.042
Placebo	5 [#]	2.40 ± 0.60	3.80 ± 0.66	1.40 ± 0.24	0.038
P value** Columns		0.228	0.724	0.002	
Without symptoms improvement					
<u>Treatment group</u>					
Antibiotics	8	4.62 ± 0.98	6.25 ± 0.94	1.62 ± 1.18	0.246
Placebo	10	6.50 ± 2.64	4.10 ± 1.08	-2.40 ± 2.09	0.810
P value** Columns		0.460	0.083	0.408	

Abbreviations: HPF – High Power Field, EFU – End of Follow-up. SE – standard error. *Wilcoxon. **Mann-Whitney U test. [#] reduced N by missing data.

We also analyzed patients with and without symptom improvement based on their *H. pylori* status at the end of follow-up. Patients who experienced symptom improvement and successfully eradicated *H. pylori* showed a reduction in duodenal villous eosinophils, decreasing from 9.43 (± 3.47) Eos/HPF to 4.14 (± 1.12) Eos/HPF, with a trend to statistical significance (p = 0.068). In contrast, patients who remained *H. pylori* positive exhibited an increase in duodenal villi eosinophils, rising from 2.33 (± 0.49) Eos/HPF to 3.33 (± 0.71) Eos/HPF, also with a trend to statistical significance (p = 0.084). The difference between the eosinophil variation of the two

groups was statistically significant ($p = 0.008$). Among patients who did not show symptomatic improvement, there was no difference in the variation of eosinophils between those who tested negative for *H. pylori* and those who remained positive at the end of follow-up ($p=0.328$)- Table 5.

Table 5. Duodenal villi eosinophils count at baseline and at the end of follow-up, according to symptoms improvement and *H. pylori* status at the end of follow-up.

Variable	N=31 [#]	Eosinophil/HPF Baseline Mean \pm SE	Eosinophil/HPF End of follow-up Mean \pm SE	Eosinophil/HPF Variation Mean \pm SE	P Value* Rows
With symptoms improvement					
<u><i>H. pylori</i> status at the end of follow-up</u>					
Negative	7	9.43 \pm 3.47	4.14 \pm 1.12	-5.29 \pm 3.11	0.068
Positive	6 [#]	2.33 \pm 0.49	3.33 \pm 0.71	1.00 \pm 0.45	0.084
P value** Columns		0.128	0.836	0.008	
Without symptoms improvement					
<u><i>H. pylori</i> status at the end of follow-up</u>					
Negative	7	5.00 \pm 1.05	6.86 \pm 0.83	1.86 \pm 1.33	0.246
Positive	11	6.09 \pm 2.42	3.90 \pm 0.99	-2.18 \pm 1.91	0.810
P value** Columns		0.246	0.020	0.328	

Abbreviations: HPF – High Power Field, EFU – End of Follow-up. SE – standard error. *Wilcoxon. **Mann-Whitney U test. [#] reduced N by missing data.

Secondary Outcomes

The baseline duodenal villi eosinophil count was assessed in relation to demographic data, the severity of dyspeptic symptoms, and the type of functional dyspeptic syndrome.

Patients were categorized into two groups based on baseline symptom severity: PADYQ score ≤ 22 and PADYQ score > 22 . The duodenal villi eosinophil was $5.54 (\pm 1.29)$ Eos/HPF for the lower symptom severity group and $6.50 (\pm 2.87)$ Eos/HPF for the higher symptom severity group, $p = 0.346$ - Table 6.

The subtype of dyspeptic syndrome was self-reported by patients during their initial visit, based on the predominant symptom. No significant difference was found in duodenal villi eosinophils between the two dyspeptic syndromes—epigastric pain syndrome and postprandial distress syndrome ($p = 0.669$) – Table 6.

Duodenal villi eosinophils were significantly higher in smokers and former smokers compared to nonsmokers ($p = 0.037$). Patients aged 50 years or older also had significant more duodenal villi eosinophils than those under 50 ($p = 0.009$). Furthermore, patients reporting alcohol consumption (more than 14 weekly doses for men and more than 7 weekly doses for women) exhibited a trend toward higher duodenal villi eosinophils compared to non-users ($p = 0.068$)- Table 6.

Table 6. Duodenal villi eosinophil count according to baseline characteristics.

Variable	Total N= 32	Duodenal villi eosinophil/HPF Mean \pm SE	P value*
Age (years)			
< 50	21	3.62 ± 0.81	0.009
≥ 50	11	9.91 ± 2.73	
Sex			
Male	4	10.50 ± 5.42	0.230
Female	28	5.11 ± 1.11	
Color			
White	26	6.42 ± 1.41	0.225
Non white	6	3.00 ± 1.15	
BMI			0.145

< 25	14	5.14 ± 1.95	
≥ 25	18	6.28 ± 1.49	
Education**			
< 10 years	17	6.12 ± 1.65	0.518
≥ 10 years	14	5.50 ± 1.87	
Marital status			
Single or without partner	16	6.00 ± 1.91	0.515
Married or with partner	16	5.56 ± 1.45	
Income (R\$/ month)			
≤ 1140.00	19	6.63 ± 1.80	0.570
> 1140.00	13	4.54 ± 1.24	
Use of NSAIDs			
No	29	5.72 ± 1.22	0.538
Yes	3	6.33 ± 5.36	
Smoking status			
Never smoked	17	3.58 ± 1.01	0.037
Current/former	15	8.27 ± 2.10	
Alcohol consumption			
No consumption	27	4.70 ± 1.06	0.068
Current/ former	5	11.60 ± 4.43	
Local tea drinking (Mate)			
No	13	4.00 ± 1.23	0.147
Yes	19	7.00 ± 1.77	
Coffee drinking			
No	8	6.62 ± 2.98	1.000
Yes	24	5.50 ± 1.26	
Score of dyspeptic symptoms (PADYQ)			
≤ 22	12	7.08 ± 2.15	0.346
> 22	20	5.00 ± 1.39	
Functional dyspepsia subtype			
EPS	16	4.44 ± 1.12	0.669
PPDS	16	7.12 ± 2.06	

SE – standard error. BMI – body mass index. EPS – Epigastric pain syndrome. PPDS – Postprandial distress syndrome. PADYQ – Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire. *Mann-Whitney U test. **reduced N by missing data.

In the multivariate regression analysis, adjusted by age, smoking status, alcohol consumption and baseline symptoms scores, there was only a trend of higher duodenal villi eosinophils with older age (p= 0.086).

Discussion

The results of this study demonstrated that treatment for *H. pylori* had no significant impact on duodenal villi eosinophils. And the improvement of dyspeptic symptoms did not correlate with changes in eosinophils in the duodenal villi. There was a trend of increasing eosinophils in the duodenal villi with advancing age.

Histological changes from *H. pylori* infection in the gastric mucosa have been extensively studied.¹⁴ Lymphocyte and neutrophilic infiltrate in the gastric mucosa occur in almost 100% of the infected individuals. Eosinophilic infiltrates are also observed in gastric mucosa in *H. pylori* positive patients. Eosinophils, in addition to participating in the inflammatory response against the bacteria, are likely to play a role in the maintenance and recovery of gastric mucosal integrity.¹⁵ However, little is known about the influence of *H. pylori* infection on duodenal mucosa histology. A study carried out prior to the evaluation of *H. pylori* as an important gastroduodenal pathogen demonstrated an increase in the duodenal eosinophils count in subjects with duodenal ulcers,¹⁶ which is strongly associated with gastric *H. pylori* infection.¹⁷ Other study, and one previous study conducted by our research group, found, as a secondary finding, a significantly higher duodenal eosinophils count in *H. pylori* positive subjects than in *H. pylori* negative ones.^{1,10} However, other studies showed no association between *H. pylori* and the duodenal eosinophil count, but also as a secondary finding.^{9,18,19} To the best of our knowledge, the present study was the first to evaluate the role of *H. pylori* treatment on duodenal eosinophils.

Duodenal eosinophils has been implicated as a potential etiological factor in functional dyspepsia.²⁰ Studies have shown that after antigen presentation, type-2 helper cells recruit eosinophils and mast cells to sites of inflammation, and their activation leads to release of pro-inflammatory mediators, causing tissue damage, epithelial barrier dysfunction,²¹ and impairment of enteric nerve function.²² This increased immune cell activation, as well as increased duodenal permeability, may be associated with delayed gastric emptying.²³ Low-grade inflammation could also lead to disturbed gastrointestinal motility and visceral sensitivity via dysregulation of the neuro-immune system. Evidence shows that immune cells interact with enteric nerves to influence gastrointestinal function.²⁴

The assessment of duodenal eosinophils differs in studies.²⁵ Most studies count cells/HPF, although and some use cells/mm². Authors used three, five or seven non-overlapping HPFs,^{19,21} selected randomly or by peak eosinophil concentration (“hot spots”). The role of degranulated eosinophils has been emphasized as they appear to be more closely associated with dyspeptic symptoms.^{25,26} Another problem regarding eosinophil counts is inter-examiner agreement. Ceulemans et al,²⁷ created a new counting method, using ImageScope software to digitally select histological fields, with a significant improvement in the correlation between the examiners. The present study used one “hot spot” HPF from the villi, using conventional microscopes, based on a previous study from our research group, that showed better correlation with dyspeptic symptoms than eosinophils from the duodenal mucosal base. Since the counting was performed exclusively in the duodenal villi, we used only one high-power field in the peak eosinophil concentration (“hot spot”).

Although, in the present study, *H. pylori* treatment did not show an overall influence on eosinophils in the duodenal villi, a subgroup of patients with symptoms improvement after antibiotic treatment showed a significant reduction in duodenal villi eosinophils, suggesting that the involvement of *H. pylori* in functional dyspepsia symptoms may occur through the

modulation of duodenal eosinophils. And another subgroup of patients, also with symptoms improvement, treated with placebo showed an increase in duodenal villi eosinophils, suggesting that other factors, unrelated to *H. pylori* or dyspeptic symptoms, may also influence duodenal eosinophils. These findings may be influenced by the small number of patients in each subgroup, meaning that the results should be interpreted with caution, and further research with larger sample sizes might be needed to better understand these possible associations.

Many factors might influence in duodenal eosinophil infiltration, such as different lifestyles and dietary factors,² food-induced immune activation²⁸ and genetic factors.²⁹ Other studies, including our previous study in process of publication, showed an association with smoking,⁶ that may be explained by smoking potential impact on intestinal permeability and duodenal microbiota.^{30,31}

The strength of our study derives from our inclusion of a sample of the functional dyspeptic subjects from the HEROES Trial,¹¹ which strictly used the Rome III criteria for inclusion and used two methods for the *H. pylori* diagnosis, ensuring an accurate diagnosis of both functional dyspepsia and *H. pylori* status. Our samples were homogeneous, including only functional dyspeptic patients, avoiding other diseases as confounding factors for the duodenal eosinophil count. We collected demographic data from patients, allowing us to perform multivariate analysis to increase the reliability of results. Duodenal villi eosinophil assessment was performed by experienced pathologists. A validated questionnaire was used to obtain the symptoms data. We evaluated the influence of *H. pylori* treatment and dyspeptic symptoms on duodenal eosinophils through a clinical trial, allowing us to assess the variation in dyspeptic symptoms and eosinophils at baseline and after 12 months of follow-up. In contrast, other studies have conducted this assessment using a case-control design.^{1,9}

This study presents some limitations: the sample was predominantly women and it was conducted in a single center, which may limit its external validity, though we believe the

predominantly white sample of European descent is representative of the Western population. Our sample size was small, which likely limited the power to determine associations between duodenal villi eosinophils and *H. pylori* and other demographic variables, such as smoking and alcohol consumption. Nevertheless, the sample size is comparable to that of other studies in the literature on this subject,²⁵ and was able to revealed a significant impact of *H. pylori* treatment on duodenal villi eosinophils in a specific subgroup of patients. No parasitological stool examination was conducted on the patients; however, most studies do not perform this test due to its low sensitivity.

Conclusions

The results of this study demonstrated that *H. pylori* treatment and/or eradication had no significant impact on eosinophils in the duodenal villi. Similarly, the improvement of dyspeptic symptoms did not correlate with changes in eosinophils in the duodenal villi.

References

1. Chaudhari AA, Rane SR, Jadhav MV. Histomorphological Spectrum of Duodenal Pathology in Functional Dyspepsia Patients. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2017;11(6):EC01-EC04. doi:10.7860/JCDR/2017/25297.9985
2. Du L, Shen J, Kim JJ, Yu Y, Ma L, Dai N. Increased Duodenal Eosinophil Degranulation in Patients with Functional Dyspepsia: A Prospective Study. *Sci Rep*. 2016;6(1):34305. doi:10.1038/srep34305

3. Futagami S, Shindo T, Kawagoe T, et al. Migration of eosinophils and CCR2-/CD68-double positive cells into the duodenal mucosa of patients with postinfectious functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(8):1835-1842. doi:10.1038/ajg.2010.151
4. Genta RM, Sonnenberg A, Turner K. Quantification of the duodenal eosinophil content in adults: a necessary step for an evidence-based diagnosis of duodenal eosinophilia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(8):1143-1150. doi:10.1111/apt.14558
5. Walker MM, Salehian SS, Murray CE, et al. Implications of eosinophilia in the normal duodenal biopsy - an association with allergy and functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(11):1229-1236. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04282.x
6. Walker MM, Aggarwal KR, Shim LS, et al. Duodenal eosinophilia and early satiety in functional dyspepsia: confirmation of a positive association in an Australian cohort. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(3):474-479. doi:10.1111/jgh.12419
7. Binesh F, Akhondei M, Pourmirafzali H, Rajabzadeh Y. Determination of relative frequency of eosinophils and mast cells in gastric and duodenal mucosal biopsies in adults with non-ulcer dyspepsia. *J Coll Physicians Surg--Pak JCPSP*. 2013;23(5):326-329. doi:05.2013/JCPSP.326329
8. Hogan SP, Mishra A, Brandt EB, et al. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. *Nat Immunol*. 2001;2(4):353-360. doi:10.1038/86365
9. Talley NJ, Walker MM, Aro P, et al. Non-ulcer dyspepsia and duodenal eosinophilia: an adult endoscopic population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2007;5(10):1175-1183. doi:10.1016/j.cgh.2007.05.015

10. Leite C, Mazzoleni LE, Uchoa DDM, Castanho JA, Mazzoleni F, Sander GB. Association of duodenal eosinophilic infiltrate with *Helicobacter pylori* infection, but not with functional dyspepsia. *Arq Gastroenterol*. 2020;57(1):74-78. doi:10.1590/s0004-2803.202000000-13
11. Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CFDM, et al. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES Trial. *Arch Intern Med*. Published online 2011. doi:10.1001/archinternmed.2011.533
12. Sander GB, Mazzoleni LE, Francesconi CFM, et al. Development and validation of a cross-cultural questionnaire to evaluate nonulcer dyspepsia: the Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (PADYQ). *Dig Dis Sci*. 2004;49(11-12):1822-1829. doi:10.1007/s10620-004-9578-z
13. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(10):1161-1181. doi:10.1097/00000478-199610000-00001
14. Ieni A, Barresi V, Rigoli L, Fedele F, Tuccari G, Caruso RA. Morphological and Cellular Features of Innate Immune Reaction in *Helicobacter pylori* Gastritis: A Brief Review. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):109. doi:10.3390/ijms17010109
15. Prevede N, Rossi FW, Rivellese F, et al. *Helicobacter pylori* HP(2-20) induces eosinophil activation and accumulation in superficial gastric mucosa and stimulates VEGF-alpha and TGF-beta release by interacting with formyl-peptide receptors. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(3):647-662. doi:10.1177/039463201302600308
16. Hasan M, Hay F, Sircus W, Ferguson A. Nature of the inflammatory cell infiltrate in duodenitis. *J Clin Pathol*. 1983;36(3):280-288. doi:10.1136/jcp.36.3.280

17. Liu CC, Lee CL, Chan CC, et al. Maintenance treatment is not necessary after *Helicobacter pylori* eradication and healing of bleeding peptic ulcer: a 5-year prospective, randomized, controlled study. *Arch Intern Med.* 2003;163(17):2020-2024. doi:10.1001/archinte.163.17.2020
18. Min YW, Lee H, Ahn S, et al. Eosinophil and Mast Cell Counts in the Stomach and Duodenum of Patients with Functional Dyspepsia without a *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Gastroenterol.* 2022;80(1):28-33. doi:10.4166/kjg.2022.036
19. Taki M, Oshima T, Li M, et al. Duodenal low-grade inflammation and expression of tight junction proteins in functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil.* 2019;31(10):e13576. doi:10.1111/nmo.13576
20. Ford AC, Mahadeva S, Carbone MF, Lacy BE, Talley NJ. Functional dyspepsia. *Lancet Lond Engl.* 2020;396(10263):1689-1702. doi:10.1016/S0140-6736(20)30469-4
21. Vanheel H, Vicario M, Vanuytsel T, et al. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. *Gut.* 2014;63(2):262-271. doi:10.1136/gutjnl-2012-303857
22. Walker MM, Warwick A, Ung C, Talley NJ. The role of eosinophils and mast cells in intestinal functional disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2011;13(4):323-330. doi:10.1007/s11894-011-0197-5
23. Liebrechts T, Adam B, Bredack C, et al. Small bowel homing T cells are associated with symptoms and delayed gastric emptying in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(6):1089-1098. doi:10.1038/ajg.2010.512

24. Yoo BB, Mazmanian SK. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity*. 2017;46(6):910-926. doi:10.1016/j.immuni.2017.05.011
25. Shah A, Fairlie T, Brown G, et al. Duodenal Eosinophils and Mast Cells in Functional Dyspepsia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022;20(10):2229-2242.e29. doi:10.1016/j.cgh.2022.01.014
26. Järbrink-Sehgal ME, Sparkman J, Damron A, et al. Functional Dyspepsia and Duodenal Eosinophil Count and Degranulation: A Multiethnic US Veteran Cohort Study. *Dig Dis Sci*. 2021;66(10):3482-3489. doi:10.1007/s10620-020-06689-2
27. Ceulemans M, Huyghe P, De Hertogh G, et al. Redefining Histological Cell Counts Using a Standardized Method: The Leuven Intestinal Counting Protocol. *Clin Transl Gastroenterol*. Published online June 18, 2024. doi:10.14309/ctg.0000000000000725
28. Bengtsson U, Knutson TW, Knutson L, Dannaeus A, Hällgren R, Ahlstedt S. Eosinophil cationic protein and histamine after intestinal challenge in patients with cow's milk intolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(2):216-221. doi:10.1016/s0091-6749(97)70227-6
29. Kourikou A, Karamanolis GP, Dimitriadis GD, Triantafyllou K. Gene polymorphisms associated with functional dyspepsia. *World J Gastroenterol*. 2015;21(25):7672-7682. doi:10.3748/wjg.v21.i25.7672
30. Kevans D, Turpin W, Madsen K, et al. Determinants of Intestinal Permeability in Healthy First-Degree Relatives of Individuals with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(4):879-887. doi:10.1097/MIB.0000000000000323

31. Shanahan ER, Shah A, Koloski N, et al. Influence of cigarette smoking on the human duodenal mucosa-associated microbiota. *Microbiome*. 2018;6(1):150. doi:10.1186/s40168-018-0531-3

Acknowledgements

We are grateful to our study participants. The investigators thank Aché Laboratórios Farmacêuticos for unrestricted donation of the study drugs and the gastroscope. We are also grateful to Financiamento e Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA).

Funding

The study drugs and a gastroscope, used to perform the endoscopies during the study, were obtained from an unrestricted donation from the Aché Laboratórios Farmacêuticos SA, São Paulo, Brazil. All pathology slides with hematoxylin-eosin staining, to evaluate duodenal eosinophils, were funded by FIPE/HCPA.

Conclusão

Os resultados deste estudo evidenciaram que o tratamento e/ou erradicação do *H. pylori* não teve impacto significativo na contagem de eosinófilos nas vilosidades duodenais. Da mesma forma, a melhora dos sintomas dispépticos não se correlacionou com alterações nos eosinófilos das vilosidades duodenais. Contudo, foi observado que um subgrupo de pacientes que apresentaram melhora nos sintomas dispépticos após o tratamento com antibióticos demonstrou uma redução significativa na contagem de eosinófilos nas vilosidades duodenais ao final do acompanhamento. Esses achados sugerem que, embora o tratamento de *H. pylori* em geral não

influencie na população de eosinófilos nos vilos duodenais, pode haver uma resposta específica em um subgrupo de pacientes que se beneficiam da terapia, refletindo uma possível interação entre a redução dos eosinófilos e a melhora dos sintomas.

Nossos resultados não mostraram diferença na contagem de eosinófilos nos vilos duodenais entre os diferentes subtipos de síndromes dispépticas funcionais. No entanto, observou-se uma tendência de associação diretamente proporcional com a idade dos pacientes.

Perspectivas / Considerações finais

Diversas hipóteses foram geradas a partir dos dados obtidos e, por isso, como principais perspectivas do presente trabalho sugerimos:

- a) Utilizar a mesma metodologia do estudo atual em população maior de pacientes. Já temos dados disponíveis e lâminas de patologia prontas para realizar a contagem de eosinófilos duodenais de mais 126 pacientes dispépticos funcionais, antes e 12 meses após o tratamento, sendo 61 que receberam antibióticos e 65 que receberam placebo.
- b) Avaliar o método de contagem dos eosinófilos duodenais que tenham melhor concordância entre os examinadores, utilizando a digitalização das lâminas e selecionando as áreas de contagem com auxílio de softwares.
- c) Avaliar, com população maior de pacientes, a influência de outros fatores associados aos eosinófilos duodenais, como o tabagismo, micro-organismos e alérgenos alimentares, e outros fatores associados aos sintomas dispépticos, além dos eosinófilos e do *H. pylori*.

Anexo

ANEXO I (PADYQ) - QUESTIONÁRIO DE SINTOMAS DISPÉPTICOS

Com relação aos últimos 30 dias

DOR

Qual a intensidade da dor abdominal (superior) na maioria dos dias neste período? ()

0. Ausente
1. Muito leve
2. Leve
3. Moderada
4. Forte
5. Muito forte

Qual a duração da dor na maioria dos dias neste período? ()

0. Não se aplica
1. Alguns minutos (menos que 30 minutos)
2. Menor que 2 horas
3. Maior que 2 horas

Com que frequência os Sr./Sra. apresentou dor abdominal nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

ESCORE TOTAL DOR _____ (máximo 12 pontos)

NÁUSEAS/VÔMITOS

Qual a intensidade das náuseas na maioria dos dias deste período? ()

0. Ausente
1. Muito leve
2. Leve
3. Moderada
4. Forte
5. Muito forte

Qual a duração aproximada da maioria dos episódios de náuseas? ()

0. Não se aplica
1. Alguns minutos (menos que 30 minutos)
2. Menor que 2 horas
3. Maior que 2 horas

Com que frequência o Sr./Sra. apresentou náuseas nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

Com que frequência o Sr./Sra. apresentou vômitos nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

ESCORE TOTAL NÁUSEAS/VÔMITOS: _____ (máximo 16 pontos)

DISTENSÃO/SACIEDADE

Qual a intensidade da sensação de distensão (“estufamento”/inchaço) nos últimos 30 dias? ()

0. Ausente
1. Muito leve
2. Leve

3. Moderada
4. Forte
5. Muito forte

Qual a duração destes episódios nestes períodos? ()

0. Não se aplica
1. Alguns minutos (menos que 30 minutos)
2. Menor que 2 horas
3. Maior que 2 horas

Com que frequência os Sr./Sra. apresentou esses episódios de distensão/inchaço no abdômen superior nos últimos 30 dias? ()

0. Não se aplica
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

Com que frequência o Sr./Sra. apresentou sensação de estar com o estômago cheio logo após começar a comer, nos últimos 30 dias? ()

0. Sem saciedade precoce
1. Raramente
2. 1 a 2 dias/semana
3. Quase diariamente
4. Diariamente

ESCORE TOTAL DISTENSÃO/SACIEDADE _____ (máximo 16 pontos)

PONTUAÇÃO TOTAL DOS SINTOMAS DISPÉPTICOS: _____ (máximo 44 pontos)