



Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

Estomatite Aftosa Recorrente: Papel do *Helicobacter pylori* e de outros Fatores de Risco e de Proteção

Daniel Schebela Mazzoleni

Orientador: Luiz Edmundo Mazzoleni

Porto Alegre
2019

Daniel Schebela Mazzoleni

Estomatite Aftosa Recorrente: Papel do *Helicobacter pylori* e de outros Fatores de Risco e de Proteção

Dissertação 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 Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni

Colaboradores:

Daniel Simon

Felipe Mazzoleni

Tobias Cancian Milbradt

Carlos Fernando de Magalhães Francesconi

Nicholas Joseph Talley

Heitor Ribeiro Bimfeld

Agradeço a Deus pela oportunidade de conviver com pessoas especiais, que contribuíram para elaboração deste trabalho.

Da mesma forma, agradeço pelas pessoas que contribuem na minha vida profissional e pessoal.

Em especial, agradeço a Deus por duas pessoas que Ele colocou na minha vida e hoje, são minha vida:

Minha esposa Andréia e nosso filho Thiago.

Obrigado!

SUMÁRIO

1. RESUMO	5
2. ABSTRACT	6
3. APRESENTAÇÃO	8
4. LISTA DE ABREVIATURAS	9
5. LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	10
6. INTRODUÇÃO	11
7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
7.1. ESTOMATITE AFTOSA RECORRENTE	11
7.1.1. Aspectos conceituais e gerais.....	11
7.1.2. Epidemiologia da EAR.....	13
7.1.3. Potenciais fatores de risco e de proteção da EAR	14
7.1.4. Distúrbios emocionais vs EAR	15
7.1.5. Tabagismo vs EAR.....	16
7.2. <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	17
7.2.1. <i>H. pylori</i> na mucosa gástrica	17
7.2.2. <i>H. pylori</i> na mucosa oral.....	18
7.2.2.1. Testes para o diagnóstico do <i>H. pylori</i> na mucosa oral.....	19
7.2.2.2. Relação do <i>H. pylori</i> com doenças orais.....	21
7.3. DISPEPSIA FUNCIONAL.....	22
7.4. ESTOMATITE AFTOSA RECORRENTE VS <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	23
8. JUSTIFICATIVA	28
9. QUESTÕES DA PESQUISA	28
10. HIPÓTESES	28
11. OBJETIVOS.....	28
PRINCIPAL.....	28
SECUNDÁRIOS.....	28
12. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	29
ABSTRACT	30
INTRODUCTION	31
METHODS.....	32
POPULATION	32
RESULTS	35
DISCUSSION.....	36
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
14. ANEXOS.....	57

1. RESUMO

Introdução e Objetivos: Estomatite aftosa recorrente (EAR), também conhecida como afta, é uma doença de alta prevalência que causa dor oral significativa, comprometimento mastigatório e perda da qualidade de vida. A prevalência global é de aproximadamente 20% em adultos e 40% em crianças, mas, dependendo de fatores étnicos e socioeconômicos, pode atingir até 50% de certas populações. Sua patogênese permanece obscura. Infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), ansiedade, tabagismo e outros fatores são suspeitos de estarem associados as EAR. O objetivo deste estudo foi comparar a prevalência de EAR em pacientes dispépticos funcionais *H. pylori* positivos e negativos e também avaliar outros potenciais fatores de risco ou de proteção para EAR.

População e métodos: Foram recrutados pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos de idade, com diagnóstico de dispepsia funcional segundo os critérios do Consenso ROMA III. Foram avaliados dados demográficos, clínicos e antropométricos, e os pacientes também responderam questionário de ansiedade, depressão, e específico de EAR. Realizaram endoscopias com biópsias gástricas para avaliação histológica e pesquisa do *H. pylori*.

Resultados: Foram incluídos 476 participantes (idade média 44,8 anos; 77,3% mulheres). EAR foi relatada por 32,6% (155/476) dos pacientes e dos 372 com avaliação do *H. pylori*, 65,6% (244/372) eram *H. pylori* positivos. Na análise univariada, pacientes com infecção gástrica pelo *H. pylori* tiveram menor prevalência de EAR (29.9%; 73/244), do que pacientes *H. pylori* negativos (41.4%; 53/128) (P=0.026). Tabagismo (P=0.022) também foi associado com menor prevalência de EAR. Entretanto, sexo feminino (P=0.004), menor idade média (P=0.010), menor renda (P=0.044), ansiedade (P=0.044) e maior intensidade dos sintomas dispépticos (P=0.026), apresentaram maiores prevalências de EAR. Na análise multivariada, analisando apenas os

pacientes com dados do *H. pylori* (n=372), infecção pelo *H. pylori* (P=0,017) e tabagismo (P=0,001) foram fatores de proteção para EAR, enquanto menor idade média (P=0,013), menor renda (P=0,030) e ansiedade (P=0.042) foram fatores de risco. Na análise multivariada de todos os pacientes (476) sexo feminino e maior escolaridade também foram fatores de risco e ansiedade mostrou tendência para maior risco de EAR (P=0.061).

Conclusões: Esse estudo encontrou uma inesperada menor prevalência de EAR em pacientes *H. pylori* positivos. Tabagismo também foi um fator protetor enquanto sexo feminino, menor idade, menor renda, maior escolaridade e ansiedade, foram fatores de risco para EAR.

Palavras-chave: Estomatites Aftosas Recorrentes, *Helicobacter pylori*, Dispepsia Funcional.

2. ABSTRACT

Introduction and Objectives: Recurrent aphthous stomatitis (RAS) has a high prevalence and obscure etiopathogenesis. The objective of this study was to evaluate the role of *Helicobacter pylori* and other risk or protective factors in RAS.

Population and methods: Patients of both sexes, over 18 years of age, with functional dyspepsia diagnosed according to the ROMA III Consensus criteria were recruited. The patients answered questionnaires about demographic and clinical data, anxiety, depression, and specific RAS questionnaire. They were also submitted to upper digestive endoscopy with gastric biopsies for histological and *H. pylori* evaluation.

Results: 476 patients (mean age 44.8 years; 77.3% women) were included. RAS was reported by 32.6% (155/476) and of the 372 with evaluation of *H. pylori* 65.6% (244/372) were *H. pylori* positive. In the univariate analysis, patients with gastric *H. pylori* infection had a lower prevalence

of RAS (29.9%; 73/244) than *H. pylori* negative patients (41.4%; 53/128) (P=0.026). Smoking (P=0.022) was also associated with a lower prevalence of RAS. However, female (P=0.004), lower mean age (P=0.010), lower income (P=0.044), anxiety (P=0.044) and greater intensity of dyspeptic symptoms (P=0.026) presented higher prevalence of RAS. In the multivariate analysis, analyzing only patients with *H. pylori* data (n=372), *H. pylori* infection (P=0.017) and smoking (P=0.001) were protective factors, while lower mean age (P=0.013), lower income (P=0.030) and anxiety (P=0.042) were risk factors for RAS. In the multivariate analysis of all patients (476), females and higher schooling were also risk factors and anxiety showed a tendency towards a higher risk of RAS (P=0.061).

Conclusions: We found an unexpected lower prevalence of RAS in *H. pylori* positive patients. Smoking was also a protective factor while female gender, younger age, lower income, higher schooling and anxiety, were risk factors for RAS.

Key words: Recurrent aphthous stomatitis, *Helicobacter pylori*, Functional dyspepsia.

Words: 287

3. APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é composta por uma Introdução com os principais tópicos sobre Estomatite Aftosa Recorrente (EAR), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), dispepsia funcional, fatores de risco e de proteção e a potencial relação entre infecção pelo *H. pylori* com EAR. Após, serão apresentados a Justificativa para a realização desse estudo, os Objetivos (gerais e específicos) e o Artigo Científico em inglês para ser submetido a publicação. No final será apresentada a conclusão com considerações finais, as referências bibliográficas e os Anexos.

4. LISTA DE ABREVIATURAS

BMI	Body mass index
DF	Dispepsia Funcional
EAR	Estomatite Aftosa Recorrente
ELISA	The enzyme-linked immunosorbant assay
GERD	Gastroesophageal reflux disease
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HHS	Department of Health and Human Services
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IL-6	Interleucina 6
NIH	National Institutes of Health
PCR	Polymerase Chain Reaction
RTU	Teste Rápido da Urease
TNF	Fator de necrose tumoral

5. LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figure 1. Flow chart of study participants.

Table 1. Characteristics of the study patients, stratified according to RAS occurrence.

Table 2. Characteristics of the study patients stratified according to *H. pylori* status.

Table 3. Adjusted prevalence ratio for RAS in patients who were evaluated to *H. pylori* infection (n=372)

Table 4. Adjusted prevalence ratio for RAS in patients studied (n=474*)

Appendix Table 1. Clinical characteristics of RAS.

6. INTRODUÇÃO

Estomatite aftosa recorrente (EAR) são lesões orais com alta prevalência (AKINTOYE; GREENBERG, 2005), que causam importantes danos a saúde humana pela dor, pelo comprometimento mastigatório e pela perda de qualidade de vida. A etiologia e a fisiopatologia dessa doença permanecem pouco conhecidas (BROCKLEHURST et al., 2012).

Muitos estudos têm avaliado potenciais fatores de risco e de proteção contra a EAR. Entretanto, os resultados são contraditórios e esses fatores permanecem indefinidos. A relação da infecção pelo *H. pylori* com a EAR também é confusa, com alguns estudos mostrando relação entre essas duas doenças (BIREK et al., 1999) (ELSHEIKH; MAHFOUZ, 2005), enquanto outros não mostrando nenhuma associação entre elas (PORTER et al., 1997) (FRITSCHER et al., 2004).

Portanto, a literatura permanece controversa sobre o papel da infecção pelo *H. pylori* e de outros fatores sobre EAR. O objetivo desse estudo foi avaliar a potencial relação da infecção gástrica pelo *H. pylori* e de fatores demográficos e clínicos com as EAR.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

7.1. Estomatite aftosa recorrente

7.1.1. Aspectos conceituais e gerais

Estomatite Aftosa Recorrente (EAR), também denominada de “aftas”, é reconhecida pela presença de dolorosas úlceras bucais. Apesar de não ser considerada risco ao câncer bucal, sua importância está ligada a dor, ao comprometimento mastigatório e a diminuição da qualidade de vida. EAR pode também comprometer a capacidade de falar, de deglutir e de manter a higiene bucal (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017). O seu tempo de permanência pode variar de dias a

semanas e não existem tratamentos eficientes para essa condição (BELENGUER-GUALLAR; JIMÉNEZ-SORIANO; CLARAMUNT-LOZANO, 2014).

EAR é classificada em três categorias: úlceras menores (>70% dos casos), maiores (10%) e herpetiformes (10%) (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017). Na forma “menor” as crises são caracterizadas por surtos com poucas ulcerações superficiais menores que 10mm de diâmetro. Geralmente se localizam apenas nos lábios, língua e mucosa oral e costumam durar menos de 14 dias. Na forma “maior” as lesões podem se estender até a mucosa faríngea, têm >10mm e os surtos geralmente são mais prolongados, de até 6 semanas. A forma “herpetiforme” se apresenta com muitas úlceras profundas que podem coalescer, e os surtos costumam se resolver em até um mês (YASUI et al., 2010).

As características histopatológicas da EAR são inespecíficas e o diagnóstico é baseado em critérios clínicos. Como o diagnóstico é essencialmente clínico, é necessário criterioso diagnóstico diferencial com outras doenças que também causam ulcerações orais, especialmente doença de Behcet, uma doença sistêmica na qual úlceras orais são associadas com ulcerações genitais e com doença ocular, especialmente uveíte. Em pacientes que apresentam lesões orais e para as quais não são identificadas etiologias específicas, o diagnóstico de exclusão deve ser feito e são esses os casos referidos como portadores de EAR (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017). A padronização na seleção dos pacientes incluídos nos estudos é um importante aspecto para pesquisas confiáveis sobre essa doença (SCULLY; PORTER, 2008).

Sua etiopatogenia continua incerta, e diversas condições locais, hereditárias e genéticas, sistêmicas, imunológicas, alérgicas, nutricionais, hormonais, emocionais e microbiológicas têm sido associadas com EAR, porém nenhuma foi definitivamente estabelecida (ADLER et al., 2014). Danos no DNA secundários ao estresse oxidativo pode ter papel nas ulcerações recorrentes (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017). Pacientes com EAR apresentam desequilíbrio sistêmico

entre sistemas oxidantes/antioxidantes, favorecendo o dano oxidativo. A causa desse desequilíbrio, provavelmente, é multifatorial (TUGRUL et al., 2016). Evidências também sugerem uma base imunológica para a inflamação crônica da EAR. É possível que um antígeno desconhecido estimule queratinócitos, resultando em secreção de citocinas e quimiotaxia de leucócitos. Fator de necrose tumoral (TNF) tem sido encontrado significativamente elevado na saliva de pacientes com EAR (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017). Além disso, um estudo demonstrou aumento de secreção de IL-6, que é uma citocina pró-inflamatória, o que sugere um componente genético na imunopatogênese da EAR (NAJAFI et al., 2015).

Não existem tratamentos eficientes para essa condição (BELENGUER-GUALLAR; JIMÉNEZ-SORIANO; CLARAMUNT-LOZANO, 2014). O tratamento permanece insatisfatório e corticóides tópicos, além de outras terapêuticas, somente conseguem reduzir parcialmente a severidade das ulcerações, mas não conseguem evitar a recorrência da doença (SCULLY; PORTER, 2008) (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017).

Até que a etiologia da EAR seja descoberta, provavelmente, as opções de tratamento serão poucas e somente parcialmente efetivas. Melhor desenho, análise e padronização de resultados de ensaios clínicos são necessários para melhorar a qualidade dos estudos (BACCAGLINI et al., 2011).

7.1.2. Epidemiologia da EAR

EAR são as lesões mais frequentes da mucosa oral. Em adultos, a sua prevalência é de aproximadamente 5 a 25% na população mundial, e pode ultrapassar 39% em crianças. Este número, dependendo de critérios diagnósticos, variáveis demográficas e étnicas pode atingir até 50% em algumas populações (SHIP, 1972) (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017).

EAR parece ser mais comum em pessoas entre 10-40 anos de idade. O início dos episódios costuma ser entre os 10 e 19 anos de idade e, normalmente, a frequência e a gravidade dos episódios parecem diminuir com o aumento da idade (GIANNETTI L, MURRI DELLO DIAGO A, 2017). Alguns estudos encontraram maior prevalência em mulheres e em pessoas com maior nível socioeconômico (BELENGUER-GUALLAR; JIMÉNEZ-SORIANO; CLARAMUNT-LOZANO, 2014).

A forma mais comum é a EAR menor. EAR maior aparece com maior frequência em pacientes jovens e as herpetiformes em pessoas acima dos 30 anos.

7.1.3. Potenciais fatores de risco e de proteção da EAR

Alguns fatores de risco e de proteção são, praticamente, unanimidade nos estudos. O tabagismo aparece como fator protetor e é o de maior consenso na literatura. Menor idade aparece como fator de risco na maioria dos estudos. Desta forma, poderiam ser usados como parâmetro de qualidade de resultados científicos.

Dados demográficos e clínicos têm sido avaliados em alguns estudos sobre EAR, com resultados, muitas vezes, contraditórios. Entretanto, menor faixa etária é considerada fator de risco em, praticamente, todos os estudos. Para alguns autores, faixa etária entre 10 a 20 anos seria a de maior prevalência de EAR. Rivera-Hidalgo et al. mostraram que adultos com menos de 40 anos de idade apresentaram quase o dobro de prevalência de EAR (22.54%) que os maiores de 40 anos (13.42%) (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004).

Embora o sexo feminino, usualmente, seja considerado fator de risco de EAR, alguns autores encontraram maior prevalência em homens americanos (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004). Souza et al. avaliaram adolescentes de 18 anos de idade, e observaram que nível socioeconômico mais alto foi fator de risco para EAR (DE SOUZA et al.,

2017). Maior renda e menor escolaridade também têm sido descritas como fatores de risco por outros autores (AKINTOYE; GREENBERG, 2005).

Em população adulta norte-americana, um estudo mostrou prevalência anual de EAR muitas vezes maior em brancos (20,87%) e hispânicos (12,88%) do que em negros (4,96%) (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004). Estudo em crianças e adolescentes também demonstrou que a raça branca foi fator de risco para EAR (SHULMAN, 2004).

O papel de distúrbios emocionais e do tabagismo na EAR serão discutidos a seguir.

7.1.4. Distúrbios emocionais vs EAR

Estresse psicológico é considerado um desencadeador na ocorrência e na progressão da EAR, embora exista pouca documentação científica para comprovar esse conceito (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008) (PEDERSEN, 1989) (DHOPTÉ et al., 2018). Estudos que procuram avaliar a relação entre EAR com problemas emocionais são de difícil execução, pela alta heterogeneidade dos pacientes e também pela dificuldade de saber se o estresse emocional é uma causa ou uma consequência da EAR (POLAT et al., 2018).

Em um estudo, a prevalência de EAR foi maior na época em que pacientes estavam estudando, ao invés de 12 anos depois quando os mesmos já eram profissionais. Os autores sugerem que esse achado seria devido ao estresse da época estudantil (AKINTOYE; GREENBERG, 2005). Uma pesquisa avaliou 110 pacientes e encontrou alta correlação entre os níveis de ansiedade, de depressão e de estresse psicológico com sintomas de EAR (GAVIC et al., 2014). Resultados diferentes foram observados em estudo que avaliou 478 indivíduos através de questionários por telefone, e não encontrou associação de EAR com depressão (WEBB et al., 2013). Entretanto, outros autores avaliaram 39 pacientes com EAR e 25 controles e observaram que valores na escala da depressão foram, significativamente, maiores em pacientes com EAR,

mas não encontraram diferenças significativas entre os níveis de ansiedade e EAR (POLAT et al., 2018). Outro estudo avaliou 75 pacientes divididos em três grupos com 25 indivíduos por grupo: grupo 1 de pacientes com EAR; grupo 2 com história de EAR mas sem úlceras ativas; e grupo 3 com indivíduos normais, sem história de EAR (controles). Os autores usaram a escala HADS (*Hospital Anxiety and Depression Scale*) e observaram que o nível de estresse, de ansiedade e de depressão entre os grupos 1 e 2 não foi significativamente diferente dos controles. Entretanto, maiores níveis de ansiedade e depressão foram encontrados em pacientes com história de EAR (DHOPTÉ et al., 2018).

A ansiedade foi associada com EAR em estudo que avaliou 38 pacientes com EAR e 38 controles saudáveis. Os autores observaram níveis de ansiedade, significativamente, maiores em pacientes com EAR do que os indivíduos do grupo controle (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008). Entretanto, os achados de pesquisa mais antiga, que avaliou 22 pacientes com EAR, não constataram associação entre estresse psicológico e recorrência de EAR (PEDERSEN, 1989).

Portanto, o papel de fatores emocionais na EAR continua indefinido.

7.1.5. Tabagismo vs EAR

O tabagismo é um fator correlacionado com EAR de longa data, e muitos autores têm reportado efeito protetor do tabagismo na EAR. Estudo transversal de 1985, com 20.333 pacientes, correlacionou a prevalência de RAS com tabagismo. A supressão de úlceras orais foi mais evidente nos grupos de fumantes. Além disso, fumantes pesados tiveram uma frequência menor que fumantes moderados (AXÉLL; HENRICSSON, 1985). Em estudo com 34 pacientes, os fumantes apresentaram menos EAR do que não fumantes (8,8% vs 25,2%, respectivamente) (TÜZÜN et al., 2000). Entretanto, estudo transversal concluiu que o tabagismo somente seria protetor de EAR com alto consumo de tabaco, que resultaria em altas concentrações de nicotina,

as quais formariam uma camada protetora de queratina sobre a mucosa oral. Os autores não encontraram correlação entre a duração do tabagismo e a severidade da EAR (SAWAIR, 2010).

A queratinização da mucosa oral devido aos hábitos tabágicos é a teoria mais antiga para explicar essa proteção contra EAR (GRADY et al., 1992). A associação negativa entre tabagismo e EAR continua sendo confirmada por publicações mais recentes (DE SOUZA et al., 2017) (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004) (CHATTOPADHYAY; CHATTERJEE, 2007).

7.2. *Helicobacter pylori*

7.2.1. *H. pylori* na mucosa gástrica

O *H. pylori* é um bacilo gram-negativo, flagelado, com a propriedade de sobreviver no meio ácido do estômago. Esta é uma das mais prevalentes infecções dos seres humanos e estima-se que aproximadamente metade da população mundial seja portadora dessa bactéria (POUNDER; NG, 1995). No Brasil a sua prevalência é bastante elevada. Índices de 66.5% para homens e 63.2% para mulheres foram observados em doadores de sangue de São Paulo (ZATERKA et al., 2007). Constatou-se que 78,8% da população de tribos indígenas da região amazônica é portadora da bactéria (ALMEIDA CUNHA et al., 2003).

Praticamente, todos os infectados apresentam gastrite histológica e o *H. pylori* está envolvido na patogênese das úlceras pépticas gástricas e duodenais, do adenocarcinoma gástrico, do linfoma gástrico tipo MALT (THUNG et al., 2016) e pode ter importância na dispepsia funcional (LAN et al., 2011) (MAZZOLENI et al., 2011). Estudos vêm dando destaque para associação do *H. pylori* com outras condições extra-gástricas, tais como desordens neurológicas, doenças de pele, cardiovasculares, alérgicas, hematológicas, dentre outras (MALFERTHEINER; SELGRAD, 2010). As associações extra gástricas melhor definidas são com anemia por carência

de ferro e com púrpura trombocitopênica idiopática (POUNDER; NG, 1995) (MAZZOLENI; MAZZOLENI, 2010). A infecção pelo *H. pylori* pode estar envolvida na deficiência de vitaminas, como vitamina C, A, α -tocoferol, B12 e ácido fólico e também em alterações de minerais essenciais (FRANCESCHI et al., 2014). A potencial relação do *H. pylori* com a EAR será abordada posteriormente.

Para o diagnóstico da infecção gástrica pelo *H. pylori* podem ser utilizados testes não invasivos (que não necessitam endoscopia) tais como a sorologia, o teste respiratório com C13 e a pesquisa de antígenos fecais. Testes invasivos para a pesquisa da bactéria no estômago são os que utilizam a endoscopia digestiva alta para obtenção de biópsias gástricas. Essas biópsias podem ser utilizadas para exame histológico na pesquisa da bactéria, além de possibilitarem a realização do teste rápido da urease e de cultura do *H. pylori* (MALIK; MUBARIK; KADLA, 2000). Para a confirmação da presença ou da ausência da infecção, a literatura recomenda que sejam utilizados pelo menos dois testes diagnósticos com boa sensibilidade e especificidade.

7.2.2. *H. pylori* na mucosa oral

O *H. pylori* tem sido encontrado no estômago e na cavidade oral, sendo a boca o principal reservatório extra-gástrico da bactéria (ADLER et al., 2014) (RIGGIO, 2000). A via oral é considerada a principal forma de contaminação pelo *H. pylori* (LOSTER et al., 2006). A placa bacteriana aderida ao esmalte dentário poderia funcionar como reservatório da bactéria e isso poderia estar envolvido na auto recontaminação dos indivíduos infectados (MIYABAYASHI et al., 2000). Alguns pesquisadores têm sugerido que a disseminação oral pode ser a principal rota de transmissão do *H. pylori*, porque tanto a placa dental quanto a saliva poderiam atuar como reservatórios. Isso poderia ter implicações na reinfecção após a bactéria ter sido erradicada do estômago (AL ASQAH et al., 2009), porque a erradicação do *H. pylori* poderia ser mais efetiva

no estômago do que na boca (GEBARA et al., 2006). Entretanto, é possível que o *H. pylori* na cavidade oral possa estar na forma cocóide e portanto não cultivável e não contaminante (SHIMOYAMA et al., 2000).

A prevalência do *H. pylori* na placa dentária tem sido estudada por vários investigadores. Os resultados das pesquisas são inconsistentes, com prevalências variando de 0% a 100%. Também existe divergência entre os resultados da real prevalência do *H. pylori* na boca em pacientes com infecção gástrica confirmada. A grande variação nos resultados pode ser consequência das características da amostra populacional, de diferentes metodologias usadas na pesquisa do *H. pylori* na cavidade oral (cultura, PCR, etc.), ou também pelos diferentes materiais utilizado nos testes para identificar a bactéria na boca (saliva, placa dentária) (ANAND; KAMATH; ANIL, 2014).

Alguns estudos demonstraram fraca associação entre a presença da infecção gástrica e a infecção oral pelo *H. pylori*. Estudo transversal incluiu 447 adolescentes de 12 a 19 anos que apresentavam 35,9% de prevalência do *H. pylori* na mucosa gástrica sendo que somente 1,9% dessa população foi positiva para *H. pylori* oral (VEIGA et al., 2015) (ADLER et al., 2014). Mesmo com a utilização de mesmas técnica de pesquisa (cultura) e utilizando os mesmos materiais bucais (placa dentária), enquanto em alguns estudos as taxas de positividade foram de 100%, em outros não foi observado nenhum caso positivo de isolamento do *H. pylori* na cavidade oral (LUMAN et al., 1996).

7.2.2.1. Testes para o diagnóstico do *H. pylori* na mucosa oral

Testes diagnósticos com boa especificidade e sensibilidade para identificar a bactéria na boca são indispensáveis para a realização de estudos confiáveis. Embora estejam bem definidos, os testes para identificação da infecção gástrica pelo *H. pylori* e as técnicas para identificar a

bactéria na boca não estão bem estabelecidas. Por exemplo, o teste respiratório com C13 que é um dos melhores exames não invasivos para pesquisa da infecção gástrica pelo *H. pylori*, não é capaz de detectar o *H. pylori* na cavidade oral (YEE, 2017).

Os materiais mais utilizados para identificar a presença do *H. pylori* na cavidade oral são a placa dentária e a saliva. Cultura, Polymerase chain reaction (PCR), teste rápido da urease (RUT) e sorologia são os principais testes usados para o diagnóstico da infecção na boca.

Exame com PCR e cultura microbiana foram utilizados para detectar a presença do *H. pylori* no meio bucal (IAMAROON et al., 2003) (BIREK et al., 1999). A cultura para identificação do *H. pylori* oral é um dos métodos mais utilizados em estudos, mas não tem boa sensibilidade nem especificidade. A cultura é útil para identificar a bactéria no estômago, onde a população do *H. pylori* é, usualmente, muito grande. Entretanto, existem várias dificuldades da cultura na cavidade oral (ADLER et al., 2014). Algumas publicações têm reportado taxas de cultura positivas muito baixas, mesmo utilizando vários tipos de amostras, como saliva, placa dentária ou dentes. As principais dificuldades da cultura da bactéria em amostras orais são os problemas com a coleta do material, da forma como esse material foi preservado e também porque existe pequeno número de colônias do *H. pylori* oral, e em competição com outras bactérias (YEE, 2017).

Para muitos autores, a pesquisa do *H. pylori* oral pelo método de ampliação do PCR seria o método de escolha, embora o desenvolvimento desses testes tenha sido realizado com biópsias gástricas, e não em material oral (LIU et al., 2008). Embora o PCR seja um método frequentemente utilizado para detectar o *H. pylori* oral, seus resultados tem alta variabilidade, com alguns artigos reportando taxas de detecção de zero, enquanto outros encontram taxas de positividade de 90%, em amostras da boca (YEE, 2017). Além disso, o teste do PCR necessita

equipamentos caros e técnicos especializados para sua execução, e não é um teste conveniente para detectar o *H. pylori* oral na prática clínica (YEE, 2017).

Por todos esses motivos, é necessário que se estabeleça um consenso metodológico para validação dos melhores métodos para identificar a presença da bactéria na cavidade oral (ADLER et al., 2014).

7.2.2.2. Relação do *H. pylori* com doenças orais

Riggio *et al* demonstraram a presença do *H. pylori* em placas subgengivais em 11 de 29 pacientes (38%) com periodontite crônica e os autores sugerem que placas subgengivais podem ser um reservatório para o *H. pylori* em pacientes com periodontite crônica (RIGGIO; LENNON, 1999). Alguns autores acreditam que exista a possibilidade de superinfecção de placas subgengivais em pacientes com má higiene oral e que sejam expostos a infecção pelo *H. pylori* devido a infecção gástrica (ADLER et al., 2014).

A relação entre o *H. pylori* e a patogênese do câncer gástrico é bem definida, e seria consequência da capacidade da bactéria em modificar a resposta imune do hospedeiro. Entretanto, associação entre infecção oral pelo *H. pylori* e progressão para carcinoma oral ainda não foi demonstrada (ADLER et al., 2014).

Alguns estudos têm associado a presença do *H. pylori* com halitose. Em um estudo, a erradicação da bactéria melhorou os sintomas de halitose em significativo número de pacientes com infecção gástrica tratados com esquemas de antibióticos contra o *H. pylori* (SERIN et al., 2003).

A potencial relação do *H. pylori* com a EAR será discutida posteriormente.

7.3. Dispepsia Funcional

Esse estudo avaliou a EAR em população homogênea de pacientes com diagnóstico de dispepsia funcional segundo os critérios do Consenso Roma III (TACK et al., 2006), com ou sem Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) associada. Essa rigorosa seleção dos pacientes permitiu afastar pacientes com outras doenças orgânicas, como cânceres do trato gastrointestinal superior, que poderiam ser fatores confundidores na avaliação da EAR.

A prevalência de dispepsia não investigada é alta em todas as populações avaliadas. Ela tem sido diagnosticada entre 15% a 40% da população adulta no Brasil e no mundo e custa bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos (LACY et al., 2013). Estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a dispepsia funcional acarreta significativos custos econômicos no Brasil (SANDER et al., 2011).

A maioria dos pacientes com dispepsia não apresenta alterações anatômicas ou bioquímicas que justifiquem os sintomas, sendo considerados como portadores de dispepsia funcional (DF). O Consenso Roma III (TACK et al., 2006), para distúrbios funcionais gastrointestinais, define dispepsia funcional 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 três 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 (STANGHELLINI et al., 2016) reavaliou os critérios para definição de dispepsia funcional e manteve, praticamente, inalterados os critérios estabelecidos pelo Consenso Roma III (TACK et al., 2006).

A associação de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) com dispepsia funcional, num mesmo paciente, é muito frequente. Pacientes com sintomas dispépticos (dor epigástrica e/ou saciedade precoce e/ou plenitude pós-prandial), sem alterações orgânicas que possam justificar esses sintomas são considerados dispépticos funcionais, e esses indivíduos, frequentemente, apresentam DRGE associada. Esses pacientes devem ser considerados dispépticos funcionais, com concomitante doença do refluxo gastroesofágico. Isso porque, DRGE não causa sintomas dispépticos e dispepsia funcional não provoca alterações no esfíncter esofágico inferior e, portanto, não pode ser considerada como sendo a causa dos sintomas da DRGE (pirose e regurgitação).

A etiologia da dispepsia funcional ainda é mal compreendida. Alguns potenciais mecanismos fisiopatogênicos seriam: 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* (MAZZOLENI et al., 2011).

7.4. Estomatite Aftosa Recorrente vs *Helicobacter pylori*

Alguns estudos têm sugerido associação da infecção pelo *H. pylori* com EAR (LI; GU; ZHANG, 2014), embora essa associação continue controversa. O *H. pylori* inicialmente foi considerado como fator desencadeante da EAR, pelo isolamento da bactéria em úlceras aftosas ativas e pelos resultados da erradicação sobre a evolução das úlceras orais (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017). No entanto, na literatura mais recente, sugere-se que o *H. pylori* seja uma infecção passageira e não um real desencadeador de EAR (GOMES et al., 2016). Isso porque a simples presença da bactéria na cavidade oral, ou nas lesões da EAR, não define uma relação

causal, já que a bactéria poderia ser apenas um comensal e não o fator causador da doença oral (GOMES et al., 2016).

A potencial relação entre a infecção pelo *H. pylori* com RAS foi avaliada através de estudos caso-controle, estudos transversais, ensaios clínicos sobre a efetividade da terapia de erradicação, revisões sistemáticas e metanálises.

Estudos caso controles e estudos transversais

Um estudo caso controle, que utilizou avaliação sorológica (anticorpos anti-*H. pylori*) em pacientes com EAR e em indivíduos controles sem lesões orais, constatou que a soro positividade anti-*H. pylori* não foi maior em pacientes com EAR (PORTER et al., 1997). Fritscher AM et al. pesquisaram a relação do *H. pylori* e EAR em crianças e adolescentes e também não encontraram relação entre EAR e infecção oral pelo *H. pylori* (FRITSCHER et al., 2004). Porter SR et al. avaliaram prospectivamente pacientes com sorologia positiva para *H. pylori* em pacientes com EAR e compararam com indivíduos com outras lesões orais e com controles sem lesões. A soropositividade não foi significativamente maior nos pacientes com EAR (PORTER et al., 1997). Outros autores também não encontraram relação entre a infecção pela bactéria com EAR (MRAVAK-STIPETIĆ et al., 2007) (RIGGIO, 2000) (SHIMOYAMA et al., 2000) (VICTÓRIA et al., 2003).

Entretanto, alguns estudos têm sugerido que o *H. pylori* esteja associado com EAR. Birek C et al. avaliaram o *H. pylori* com PCR em swabs de lesões aftosas e concluíram que a bactéria está associada com as úlceras aftosas orais recorrentes (BIREK et al., 1999). Elsheikh MN et al. encontraram um possível papel do *H. pylori* na EAR, com uma característica distribuição e afinidade com o tecido linfoide da mucosa da faringe (ELSHEIKH; MAHFOUZ, 2005).

Estudos da evolução da EAR após erradicação do H. pylori

Embora não existam evidências conclusivas que as úlceras da EAR estejam diretamente associadas com a infecção pelo *H. pylori*, alguns estudos têm demonstrado que a erradicação da bactéria pode afetar a evolução da doença oral. Pelos nossos conhecimentos, não existem ensaios clínicos randomizados, duplo cegos e controlados com placebos para avaliar os efeitos da erradicação da infecção pelo *H. pylori* na EAR, embora alguns pequenos estudos não randomizados avaliaram essa relação. Karaca *et al.* estudaram 23 pacientes com EAR e infecção gástrica pelo *H. pylori* que foram acompanhados por 12 meses após a erradicação gástrica pela bactéria (KARACA *et al.*, 2008). Os autores observaram uma diferença significativa ($P < 0.05$) na redução da recorrência das aftas e no menor tempo das lesões com a terapia de erradicação do *H. pylori*. Entretanto, o número de pacientes foi pequeno e não foi incluído grupo controle.

Albanidou-Farmaki *et al.* estudaram 34 pacientes com EAR, que eram positivos para o *H. pylori*. Após a terapia de erradicação, o grupo de pacientes que ficou negativo mostrou marcada melhora com respeito a recorrência e a intensidade dos sintomas da EAR (ALBANIDOU-FARMAKI *et al.*, 2005).

Tas *et al.* avaliaram a infecção gástrica com biópsias endoscópicas e mediu os níveis séricos da vitamina B12 em 46 pacientes. A infecção pelo *H. pylori* foi tratada em 30/46 pacientes positivos. Nos 18 pacientes que conseguiram erradicar a bactéria, os níveis de vitamina B12 se elevaram e o número de lesões de EAR diminuiu, significativamente, após a erradicação. Os autores concluíram que a erradicação do *H. pylori* seria benéfica na evolução da EAR e que o mecanismo dessa melhora poderia estar associado ao aumento da vitamina B12 (ARSLAN TAŞ *et al.*, 2013).

Entretanto, esses achados sobre a evolução da EAR após tratamento do *H. pylori* necessitam confirmação com estudos com maior número de pacientes, com maior seguimento ou, preferentemente, com ensaios clínicos randomizados bem desenhados e executados. Além disso,

outros mecanismos biológicos relacionados com a infecção do *H. pylori* e com o seu tratamento devem ser investigados (GOMES et al., 2016).

Revisões Sistemáticas e Metanálises

Uma publicação recente avaliou 15 estudos experimentais, uma metanálise, uma revisão e uma revisão sistemática sobre a potencial relação entre a infecção pelo *H. pylori* e a EAR. Apenas 3 dos 15 estudos experimentais avaliados incluíram mais de 50 pacientes (o maior incluiu 148) e 10 desses estudos não demonstraram associação estatisticamente significativa entre o *H. pylori* e a presença de EAR (GOMES et al., 2016). Os estudos clínicos avaliados nessa publicação usaram diferentes métodos para avaliar a relação entre *H. pylori* e EAR, incluindo PCR, nested PCR, cultura, ELISA e teste respiratório com C13. Em alguns pacientes, o *H. pylori* foi identificado na mucosa oral ou em lesões ulceradas bucais da EAR. Dos 18 estudos avaliados (15 experimentais, uma metanálise, uma revisão e uma revisão sistemática), 7 demonstraram relação positiva entre a infecção pelo *H. pylori* com EAR. A maioria dos estudos que utilizaram PCR ou nested PCR não encontraram essa associação (RIGGIO, 2000) (MRAVAK-STIPETIĆ et al., 2007) (VICTÓRIA et al., 2003). Em dois estudos os pacientes com EAR foram submetidos a endoscopia com biópsias gástricas para detectar o *H. pylori* e ambos mostraram uma relação positiva entre a presença da bactéria no estômago e a ocorrência de EAR (KARACA et al., 2008) (ARSLAN TAŞ et al., 2013). Em 4 estudos, o teste ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) foi usado para detectar anticorpos específicos ao *H. pylori* em pacientes com EAR. Em um desses estudos, a maioria dos pacientes com EAR foram positivos no teste ELISA do soro e da saliva (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2005). Entretanto, os outros 3 estudos que utilizaram ELISA não encontraram associação entre a presença de anticorpos anti-*H. pylori* e EAR (SHIMOYAMA et al., 2000) (MANSOUR-GHANAIEI et al., 2005) (PORTER et al., 1997). Dois estudos utilizaram cultura para detectar o *H. pylori* em lesões de EAR e nenhum mostrou associação. Os

autores concluíram que o *H. pylori* na cavidade oral possa estar no estado cocóide não cultivável e isso pode diminuir a positividade da cultura de materiais da boca (SHIMOYAMA et al., 2000). Como conclusão de uma revisão, os autores consideraram que o *H. pylori* pode ocasionalmente ser detectado em lesões de EAR e que a erradicação da infecção pode afetar o curso clínico das lesões da EAR por mecanismos indeterminados (GOMES et al., 2016). Entretanto, a maioria dos estudos não confirmaram a associação de úlceras da EAR com a presença da bactéria na cavidade oral e a presença da bactéria na úlcera pode refletir uma infecção transitória e não o evento desencadeador. Concluíram, também, que não existem evidências convincentes de uma relação direta causa-consequência da infecção pelo *H. pylori* e o desenvolvimento de úlceras da EAR. E finalizaram, colocando que essa associação requer mais investigações por meio de estudos prospectivos bem desenhados e que o debate continua.

Revisão de nove publicações até 2011 realizada por Afghari *et al.* concluiu que não existe associação do *H. pylori* com EAR (AFGHARI et al., 2011). Li *et al.* realizaram metanálise de estudos até 2013 avaliando a prevalência da infecção pelo *H. pylori* em pacientes com EAR e controles (LI; GU; ZHANG, 2014). Os autores encontraram aumento do risco de EAR em pacientes com infecção pela bactéria e que a erradicação poderia prevenir a ocorrência de EAR.

Adler *et al.*, em revisão publicada em 2014, no World Journal of Gastroenterology, concluiu que a infecção pelo *H. pylori* está associada com a ocorrência de EAR e que essa associação possa ser secundária as deficiências nutricionais causadas pela doença gástrica da bactéria como, por exemplo, a anemia produzida pelo comprometimento gástrico do *H. pylori* (ADLER et al., 2014).

Portanto, embora o *H. pylori* tenha sido sugerido como sendo um dos fatores etiológicos na patogênese da EAR, essa associação é questionável e ainda não está estabelecida (GOMES et al., 2016).

8. JUSTIFICATIVA

Estomatite aftosa recorrente (EAR) é uma doença de alta prevalência, que causa significativa dor oral, comprometimento mastigatório e perda de qualidade de vida. A fisiopatologia é desconhecida e não estão definidos seus fatores de risco e de proteção. Como consequência, não existem medidas preventivas nem tratamentos eficazes contra essa condição clínica. A relação da infecção pelo *H. pylori* com a EAR também é controversa. Portanto, é importante que sejam definidas as associações da EAR com fatores de risco e de proteção, e que se procure esclarecer o papel do *H. pylori* nessa doença. Melhor conhecimento desses fatores poderá orientar medidas profiláticas e terapêuticas mais eficientes no tratamento da EAR.

9. QUESTÕES DA PESQUISA

- A infecção pelo *H. pylori* está relacionada com a EAR?
- Existem fatores de risco e de proteção para a EAR?

10. HIPÓTESES

- O *H. pylori* é fator de risco para o desenvolvimento de EAR.
- A EAR está associada com fatores de risco e de proteção.

11. OBJETIVOS

Principal

- Avaliar a relação da infecção gástrica pelo *H. pylori* com EAR.

Secundários

- Avaliar a prevalência da EAR em população de pacientes com dispepsia funcional.
- Avaliar o papel de variáveis demográficas com EAR.
- Avaliar o papel de variáveis clínicas com EAR.
- Avaliar o papel da ansiedade e da depressão na EAR.
- Avaliar a relação da intensidade dos sintomas (PADYQ) da DF com EAR

12. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

***Helicobacter pylori* and other Factors in Recurrent Aphthous Stomatitis**

Recurrent Aphthous Stomatitis: Role of *H. pylori*

Authors

Daniel Schebela Mazzoleni; Felipe Mazzoleni; Luiz Edmundo Mazzoleni; Carlos Fernando de Magalhães Francesconi; Tobias Milbradt; Diego Uchoa; Heitor Ribeiro Birnfeld; Sacha Ries; Daniel Simon; Nicholas J. Talley.

Abstract

Recurrent aphthous stomatitis (RAS) has a high prevalence and obscure etiopathogenesis. The objective of this study was to evaluate the role of *Helicobacter pylori* and other risk or protective factors in RAS. Patients of both genders, over 18 years of age, with functional dyspepsia according to the ROMA III Consensus criteria were recruited. The patients answered questionnaires about demographic and clinical data, anxiety and depression, and also a specific RAS questionnaire. They were submitted to upper digestive endoscopy with gastric biopsies for histological and *H. pylori* evaluation. A total of 476 patients (mean age 44.8 years; 77.3% women) were included. RAS was reported by 32.6% (155/476) and of the 372 with evaluation of *H. pylori* 65.6% (244/372) were *H. pylori* positive. In the univariate analysis, patients with gastric *H. pylori* infection had a lower prevalence of RAS (29.9%; 73/244) than *H. pylori* negative patients (41.4%; 53/128) (P=0.026). Smoking (P=0.022) was also associated with a lower prevalence of RAS. However, female sex (P=0.004), lower mean age (P=0.010), lower income (P=0.044), anxiety (P=0.044) and greater intensity of dyspeptic symptoms (P=0.026) presented higher prevalence of RAS. In the multivariate analysis, analyzing only patients with *H. pylori* data (n=372), *H. pylori* infection (P=0.017) and smoking (P=0.001) were protective factors, while lower mean age (P=0.013), lower income (P=0.030) and anxiety (P=0.042) were risk factors for RAS. In the multivariate analysis of all patients (n=476), females and higher schooling were also risk factors and anxiety showed a tendency towards a higher risk of RAS (P=0.061). We found an unexpected lower prevalence of RAS in *H. pylori* positive patients and this information is probably new in the literature. Smoking was also a protective factor while female gender, younger age, lower income, higher schooling and anxiety, were risk factors for RAS.

Key words: Recurrent aphthous stomatitis, *Helicobacter pylori*, Functional dyspepsia.

Words: 293

Introduction

Recurrent aphthous stomatitis (RAS) is the most prevalent oral lesion in the mouth (AKINTOYE; GREENBERG, 2005). It causes significant damage to human health due to pain and compromise of life quality (BROCKLEHURST et al., 2012). The etiology of this condition remains unclear (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017), and some studies evaluated the possible association of RAS with a large range of factors. Usually smoking appears as a protective factor

while young age and female gender seems to be risk factors (TÜZÜN et al., 2000). However, the association of RAS with other factors is not properly established.

The association of *Helicobacter pylori* with RAS has been evaluated. Beyond the stomach, where this bacteria is typically found, it can be found at the mouth, dental plaque and RAS ulcers (ADLER et al., 2014) (YEE, 2017) (RIGGIO, 2000). Some studies have shown association of *H. pylori* with RAS (LI; GU; ZHANG, 2014) (BIREK et al., 1999) (ELSHEIKH; MAHFOUZ, 2005), while other do not show association between these clinical conditions (PORTER et al., 1997) (FRITSCHER et al., 2004) (MRAVAK-STIPETIĆ et al., 2007) (RIGGIO, 2000) (SHIMOYAMA et al., 2000) (VICTÓRIA et al., 2003). Therefore, this issue remains controversial. This study aim to evaluate the relationship of RAS with *H. pylori* gastric infection in a dyspeptic population. Clinical and demographic factors were also evaluated.

Methods

Population

This cross-sectional study was conducted in a single academic hospital, the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil. We included community-based and primary care patients with functional dyspepsia according to the Rome III criteria (TACK et al., 2006), of both gender and older than 18 years, from HEROES Trial (Helicobacter Eradication Relief of Dyspeptic Symptoms) (MAZZOLENI et al., 2011). The HEROES Trial was an industry-independent, double blind, placebo-controlled, randomized trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00404534) which tested the efficacy of treatment of *H. pylori* on the symptoms of functional dyspepsia. For a more complete evaluation of RAS in functional dyspeptic patients, the current study included patients who met criteria for functional dyspepsia with or without associated

gastroesophageal reflux disease (GERD). However, patients with endoscopic abnormalities that could justify dyspeptic symptoms such as peptic ulcer and gastric cancer (patients with "organic dyspepsia") were excluded. The complete exclusion criteria can be found described in detail elsewhere (MAZZOLENI et al., 2011). The clinical, endoscopic and histologic variables for the present study were previously determined, collected in accordance with the protocol, and are registered at ClinicalTrials.gov.

Study Procedures

At the screening visit were performed medical history assessment, demographic data evaluation and physical with anthropometric exams. Subjects who met the inclusion criteria and did not present exclusion criteria were referred for laboratory tests and upper gastrointestinal endoscopy. The severity of the dyspeptic symptoms was evaluated by the PADYQ questionnaire (Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire) (SANDER et al., 2004). Anxiety and depression were assessed using the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) (ZIGMOND; SNAITH, 1983).

The diagnosis of RAS was performed by a trained staff, which explained to patients about the characteristics of this disease. After these clarifications, the patients answered a question: "Have you had aphthae in your mouth in the last 4 months?" The term "aphthae" was used instead RAS because it is a popular understanding of this disease. This condition is easily recognized for be a recurrent oral ulcer associated to severe pain. The period of the last 4 months has been chosen because it is more likely to obtain more reliable information. If the patient confirmed the presence of RAS, he followed the specific RAS questionnaire (Appendix file). This questionnaire evaluated the characteristics of RAS and the patient was asked about the intensity of pain, frequency and duration of the episodes, amount and the size of the ulcers. A score was assigned

to each questionnaire response. The questionnaire also assesses whether the RAS compromises chewing and the degree of discomfort that is caused by the lesions.

Endoscopies were performed at HCPA. Two experienced endoscopists performed the procedures. In case of disagreement between their endoscopic diagnoses, a third endoscopist was consulted. Two pathologists performed histologic exams. The severity of histological gastritis was graded according to the updated Sydney System (DIXON et al., 1996). *H. pylori* presence was defined when the urease test and histopathology results (Hematoxylin-eosin and Giemsa) were both positives. In case of disagreement, a third pathologist was consulted.

Statistical analysis

Data results were expressed as mean and standard deviation (MEAN±S.D.), median (25th and 75th percentiles) or frequency percentage (%). Variables were compared using Student's t test or the nonparametric Mann–Whitney U test for continuous variables and the χ^2 test for qualitative variables. All baseline characteristics were considered potential confounders and included in a bivariate explanatory analysis of factors associated with RAS. Multivariate models were conducted using a modified Poisson regression to test the associations between RAS and independent variables (BARROS; HIRAKATA, 2003). To measure the association between RAS and variables, the prevalence ratio (PR) and their 95% confidence interval (CI) were calculated. Variables that presented p-values <0.20 in the bivariate analysis were included in the initial multivariate model. The final multivariate Poisson regression model was established through stepwise removal of covariates, starting with the variable with the highest P value; those covariates that altered the unadjusted PR by at least 10% were retained in the multivariable model. Covariates with borderline associations, for which clinical and/or biological relevance was assumed, were kept in the final model, and those with a p-value < 0.05 after adjustment were

considered as associated with RAS. All analyses were performed using the software SPSS, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Ethical Considerations

The study was developed according to Resolution 466/2012 of the National Health Council. Institutional Review Board (Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Universidade Federal do Rio Grande do Sul) approved the trial protocol (GPPG 2018-0321). Written informed consent was obtained from all patients prior to enrollment. None of the authors of this study presented conflicts of interest. All authors had access to the study data and reviewed and approved the final manuscript. All the participants of the Heroes Trial sign the Written informed consent approved by the HCPA Institutional Review Board (GPPG 05-422).

Results

Figure 1 depicts patients included for analysis and the reasons for exclusion. The study population included 476 functional dyspeptic patients with RAS data. The mean age was 44.8 years and 77.3% were female. Table 1 shows the baseline characteristics of the study participants according to RAS occurrence. At the total patients' sample, 32.6% (155/476) reported presence of RAS. In the univariate analysis patients with gastric *H. pylori* infection had a lower prevalence of RAS, and smoking was also associated with a lower prevalence. However, female gender, lower age, lower income, anxiety and greater intensity of dyspeptic symptoms presented higher prevalence of RAS. Depression, gastroesophageal reflux disease (GERD), body mass index (BMI) and endoscopic erosive gastritis were not associated with RAS.

Of the 372 patients with *H. pylori* evaluation, 65.6% (244/372) were *H. pylori* positive. Table 2 shows the characteristics of patients stratified according to *H. pylori* status. The *H. pylori*

positive group had lower years of schooling and had more local tea (mate) drinkers than the *H. pylori* negative group. *H. pylori* positive patients had lower prevalence of erosive endoscopic gastritis than *H. pylori* negative. There was a positive association between the status of *H. pylori* and the presence of gastric inflammation. Patients with gastric *H. pylori* infection had a lower prevalence of RAS (29.9%; 73/244) than *H. pylori* negative patients (41.4%; 53/128) (P=0.026). No other statistically significant differences were found.

In the multivariate analysis, analyzing only patients with *H. pylori* data (Table 3), *H. pylori* infection and smoking were considered protective factors, while lower age, lower income and anxiety were risk factors for RAS. In the multivariate analysis of all patients (Table 4), female gender and higher schooling were also risk factors and anxiety showed a tendency towards a higher risk of RAS. Each decade of age reduces the prevalence of RAS by 11%.

Appendix Table 1 shows the clinical characteristics of the RAS evaluated with the specific questionnaire used in the study. Considering information on RAS in the last 4 months, most patients presented less than 3 episodes; the number of ulcerative lesions was less than 3, most with less than 6 mm and lasting less than 9 days. Almost half of the patients reported pain of severe or very severe intensity and that RAS greatly affected their meals. And, 63% of the patients considered RAS as moderate or much trouble.

Discussion

This study demonstrated a high prevalence of RAS in this homogeneous population of patients with functional dyspepsia. Presence of *H. pylori* gastric infection and smoking were associated with lower prevalence of RAS. However, female gender, younger age, higher schooling, lower income and anxiety were risk factors for RAS.

Our study has obtained an unexpected result and it is, probably, new in the literature. Although some studies have suggested that *H. pylori* may be a risk factor (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017), most authors consider that the bacterium has no influence on the development of RAS (GOMES et al., 2016). However, we found a negative relationship between *H. pylori* gastric infection and RAS. This means that the infection could be considered a protective factor against RAS, with similar significance to that found in smoking habit, which is considered, almost unanimously, as a protective factor against RAS (TÜZÜN et al., 2000). This information was obtained with a good sample of patients and uses careful data analysis. Both univariate and multivariate analyses, including multiple potential confounders, confirm this negative association of gastric infection with *H. pylori* and RAS.

One of the hypotheses to explain this finding could be the interference of *H. pylori* in the oral microbiota. Some studies have suggested that alterations in this system could contribute to the etiopathogenesis of RAS (KIM et al., 2016), and it was observed that the decrease of *Streptococcus salivarius* and increase of *Acinetobacter johnsonii* in the oral mucosa were associated with an increased risk of RAS (KIM et al., 2016). The mucosal microbiota is different between patients with RAS and controls (BANKVALL et al., 2014), and some authors suggested that oral microbial factors could be crucial for the development of effective treatments for RAS (MARCHINI et al., 2007). *H. pylori* appears to interact selectively in the mouth with certain species, such as *Fusobacterium species (Fusobacterium nucleatum)* (MARCHINI et al., 2007) (ANDERSEN; GANESHKUMAR; KOLENBRANDER, 1998), *Porphyromonas gingivalis* (ISHIHARA et al., 1997), and *Bacteroides forsythus* (ANAND; KAMATH; ANIL, 2014). Two recent studies showed that *H. pylori* modifies the oral microbiota, which may increase the risk for various diseases, but this requires more studies to examine their potential health effects on affected individuals (ZHAO et al., 2019) (CHUA et al., 2019). Therefore, the presence of *H.*

pylori in oral cavity could interfere in the microbiota and influence the evolution of RAS, depending on which bacterial population was more compromised.

A second hypothesis to explain the possible protection of *H. pylori* for RAS could be the great capacity of this bacterium to produce urease that transforms urea into ammonia and alkalize the oral cavity. A therapeutic measure used for RAS, suggested by the Department of Health and Human Services (HHS), is the alkalization of the oral cavity with local solutions of antacids (AKINTOYE; GREENBERG, 2005). Therefore, oral alkalization secondary to *H. pylori*, theoretically, could be beneficial in the evolution of RAS. More studies and clinical trials evaluating the effect of chronic alkalization of the mouth and the recurrence of RAS are required to support this hypothesis. In case of prolonged alkalization of the oral cavity be beneficial for RAS condition, this may be a significant development in the handling of this complex disease.

Although studies with have shown a better evolution of RAS after *H. pylori* eradication (KARACA et al., 2008) (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2005), it is still not well defined in the literature (GOMES et al., 2016). In this situation, it should be considered that improvement of RAS could be secondary to modification of the oral microbiota by the use of multiple antibiotics for the eradication of *H. pylori*. If our results are confirmed by other studies, it is possible that new hypotheses will be elaborated to try to explain this negative relation of *H. pylori* and RAS.

H. pylori was initially considered a triggering factor for RAS, due to its isolation in active aphthous ulcers and the results of eradication on the evolution of oral ulcers (EDGAR; SALEH; MILLER, 2017). However, more recent literature suggests that *H. pylori* is more likely to be an infection transient and not a real trigger of RAS (GOMES et al., 2016).

H. pylori has been found in the stomach and oral cavity, and the mouth is considered the main extra gastric reservoir of the bacterium (ADLER et al., 2014) (YEE, 2017). The prevalence of *H. pylori* in dental plaque has been studied and results are inconsistent, with prevalence rates

ranging from 0% to 100%. There is also disagreement about the actual prevalence of *H. pylori* in the mouth of patients with gastric bacterial infection. The wide variation of the results may be due to different populations, different methodologies used to detect *H. pylori* in the oral cavity (culture, polymerase chain reaction (PCR), etc.), or to different materials used to identify the bacteria in the mouth (saliva, dental plaque) (ANAND; KAMATH; ANIL, 2014).

Although diagnoses' tests for *H. pylori* gastric infection are well defined, the techniques for identifying bacteria in the mouth are not well established. The carbon-13 breath test detects *H. pylori* in the stomach but is not able to detect bacteria in the oral cavity (YEE, 2017). The most commonly used materials to identify *H. pylori* in the oral cavity are dental plaque and saliva. And the main tests for diagnosis of the mouth infection are culture, PCR, urease rapid test (RUT) and serology. The number of oral *H. pylori* colonies is generally small and in competition with other bacteria (YEE, 2017), and culture of saliva or dental plaque does not have good sensitivity or specificity (ADLER et al., 2014). Oral *H. pylori* detection by the method of PCR amplification would be the method of choice, although the development of these tests was performed with gastric biopsies rather than oral material (LIU et al., 2008). Although PCR is a widely used method, its results have high variability and this test requires expensive and specialized technical equipment to perform (YEE, 2017). For all these reasons, a methodological consensus needs to be established to validate the best methods for identify the presence of bacteria in the mouth (ADLER et al., 2014). The difficulty in identifying *H. pylori* oral infection make it difficult to correctly assess the relationship of bacteria with RAS.

The potential relationship between *H. pylori* infection with RAS can be accessed through case-control studies, cross-sectional studies, clinical trials on the effectiveness of eradication therapy, systematic reviews and meta-analyzes. Some cross-sectional and case-control studies found no relationship between the bacterium and RAS (PORTER et al., 1997) (MRAVAK-

STIPETIĆ et al., 2007) (RIGGIO, 2000) (FRITSCHER et al., 2004) (SHIMOYAMA et al., 2000) (VICTÓRIA et al., 2003). However, others epidemiological studies have suggested an association of *H. pylori* with RAS (BIREK et al., 1999) (ELSHEIKH; MAHFOUZ, 2005).

Some studies have shown that the eradication of bacteria can affect the evolution of oral disease. To our knowledge, there are no randomized, double blind, placebo-controlled trials with placebos that have evaluated the effects of *H. pylori* eradication on RAS, although some small-nonrandomized studies have evaluated this relationship. Karaca *et al.* studied 23 patients with RAS and *H. pylori* gastric infection and observed reduced recurrence of thrush and shorter time of lesions with *H. pylori* eradication (KARACA et al., 2008). Albanidou-Farmaki *et al.* studied 34 patients with RAS and *H. pylori* positivity. After eradication therapy, the negative group of patients showed marked improvement with regard to recurrence and intensity of RAS symptoms (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2005). Tas *et al.* evaluated 46 patients and conclude that the eradication of *H. pylori* would be beneficial in the evolution of RAS, and that the mechanism of this improvement may be associated with increased vitamin B12 (ARSLAN TAŞ et al., 2013). However, these findings require confirmation from studies with a larger number of patients, greater follow-up and, preferably, randomized controlled trials. In addition, other biological mechanisms related to *H. pylori* infection and its treatment should be investigated (GOMES et al., 2016).

Systematic reviews and meta-analyzes have also addressed RAS versus *H. pylori*. A recent publication evaluated the potential relationship between *H. pylori* infection and RAS by analyzing 15 experimental studies, a meta-analysis, a review, and a systematic review. Only 3 experimental studies evaluated included more than 50 patients (the largest included 148) and 10 studies showed no statistically significant association between *H. pylori* and the presence of RAS.

The authors concluded that most studies do not confirm the association of RAS ulcers with the presence of bacteria in the oral cavity (GOMES et al., 2016).

Other systematic reviews and meta-analyzes yielded discordant results. Afghari *et al.* concluded that there was no association of *H. pylori* with RAS (AFGHARI et al., 2011), while Li *et al.* found an increased risk of RAS in patients with bacterial infection and that eradication could prevent the occurrence of RAS (LI; GU; ZHANG, 2014). A review by Adler *et al.* concluded that *H. pylori* infection is associated with the occurrence of RAS and that this association may be secondary to nutritional deficiencies caused by gastric disease of the bacterium, such as anemia produced by *H. pylori* gastric involvement (ADLER et al., 2014).

Our results disagree with some authors who consider *H. pylori* as a risk factor for RAS, and also disagree with those who did not find a relationship between these diseases, which represent the majority of the results. Studies evaluating this issue included small numbers of patients, most of them included less than 50 participants, did not use placebos in eradication studies and used different methodologies across studies. Many of this studies have only tested the bacteria in the mouth, where the methods to detect the bacteria are unreliable. Although our study did not assess the presence of *H. pylori* in the oral mucosa, the methods we used to identify gastric infection were reliable and our results consistently demonstrated a negative relationship between *H. pylori* gastric infection and RAS.

Demographic and clinical data has been evaluated in some RAS studies. Several confounding factors need to be analyzed together to enable effective assessment of risk and protective factors in RAS. Our study evaluated multiple confounders, which were prospectively obtained by a trained staff. Most studies have reported a protective effect of smoking on RAS (DE SOUZA et al., 2017) (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004) (CHATTOPADHYAY; CHATTERJEE, 2007). Our results also showed a significant protective

effect of smoking, even considering the small number of smokers in our sample. Younger age is considered a risk factor in virtually all studies (AKINTOYE; GREENBERG, 2005) (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004), and our results also agree with the literature.

The potential relationship of anxiety and depression with RAS has very contradictory results. Some studies have shown association of anxiety with RAS (GAVIC et al., 2014) (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008), while others did not find (POLAT et al., 2018) (PEDERSEN, 1989). Depression has also been associated with RAS in some studies (GAVIC et al., 2014) (POLAT et al., 2018), but not in others (WEBB et al., 2013) (DHOPTÉ et al., 2018). Our results showed an association of RAS with anxiety, but not with depression.

Although female gender is usually considered risk factor for RAS (AKINTOYE; GREENBERG, 2005), some authors disagree (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004). Higher socioeconomic level, higher income and lower education have been considered risk factors for RAS (DE SOUZA et al., 2017), and RAS has been shown to be higher in white population (RIVERA-HIDALGO; SHULMAN; BEACH, 2004) (SHULMAN, 2004). Our data also showed higher prevalence of RAS in women. However, we found that lower income and higher education were risk factors for the disease. We found no differences in race, but most patients in our study were white.

The strengths of our study were the prospective evaluation of a large homogeneous population with functional dyspepsia, with reliable exclusion of organic diseases such as neoplasms and ulcers. Demographic, clinical, anthropometric, anxiety and depression data were evaluated through direct interviews. Diagnosis of RAS is a challenge for any scientific research. A review article found that few studies evaluated its presence during the clinical examination (ŚLEBIODA; SZPONAR; KOWALSKA, 2014). In our study, the diagnosis of RAS was established by a trained team who clarifies the patients about the characteristics of the disease.

Specific questionnaires about RAS allowed to evaluate the main characteristics and repercussions of the disease. *H. pylori* was screened by histopathological analysis and rapid urease test.

Our study has limitations. It was monocentric and the population was, predominantly, female and white. The specific RAS questionnaire applied is not validated, but no one was found in the literature by the authors. The questionnaire was used only to obtain additional information on the characteristics of canker sores and not for the diagnosis of RAS. And, although the number of patients analyzed was large, it is possible that it did not have the power to demonstrate significance in analysis of some variables.

Conclusion: Our results showed an unexpected lower prevalence of RAS in *H. pylori* positive patients and probably this information is new in the literature. In agreement with other studies, smoking was considered as a protective factor while female gender and younger age were considered as risk factors for RAS. The literature is confusing regarding issues such as anxiety, depression, income, schooling and race as factors for RAS. We concluded that anxiety, lower income and higher education may be consider as risk factors for RAS.

Future perspectives: We suggest that clinical and epidemiological studies using multivariate analysis should be performed to define risk and protective factors of RAS. Randomized controlled trials are needed to define the role of *H. pylori* eradication in the evolution of RAS, as well as the evaluation of the role of antibiotic therapy and mouth alkalization in RAS.

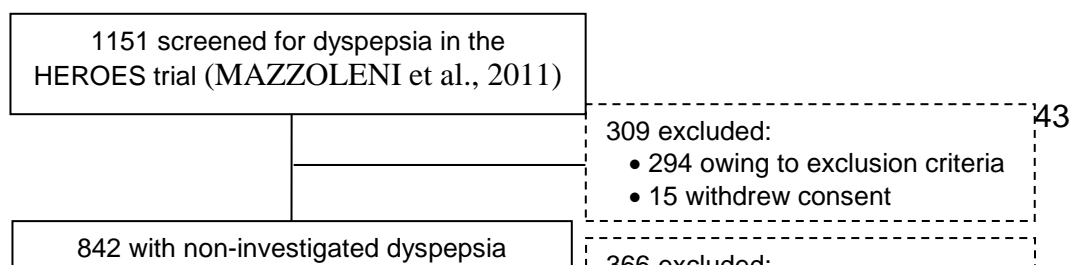


Figure 1. Flow chart of study participants.

Table 1. Characteristics of the study patients, stratified according to RAS occurrence.

Variable	Total sample n=476 (%)	With RAS n=155 (%)	Without RAS n= 321 (%)	p
Age, mean ±SD (range), years	44.8±12.9 (18.0-80.7)	43.5±13.2 (18.0-73.1)	46.9±12.6 (18.0-80.7)	0.010
Female gender	368 (77.3)	132 (85.2)	236 (73.5)	0.004
White skin	371 (77.9)	123 (79.4)	248 (77.3)	0.605
Marital status				0.494
Single	126 (26.5)	47 (30.3)	79 (24.6)	
Married	249 (52.3)	79 (51.0)	170 (53.0)	
Separated	65(13.7)	20 (12.9)	45 (14.0)	
Widowed	36 (7.6)	9 (5.8)	27 (8.4)	
Income, md (P25–75), US\$	579 (368-1053)	526 (316-947)	631 (379-1053)	0.044
< US\$500	180 (37.8)	72 (46.5)	108 (33.6)	0.007
Education: < 10 years of schooling	261 (54.8)	77 (49.7)	184 (57.3)	0.116
BMI, mean ± SD, kg/m ²	26.6 ± 4.8	26.6 ± 5.0	26.6 ± 4.7	0.762
Smoking status				0.022
Never/Former	383 (80.5)	134 (86.5)	249 (77.6)	
Current	93 (19.5)	21 (13.5)	72 (22.4)	
Alcohol consumption				0.563
No consumption/Former	434 (91.2)	143 (92.3)	291 (90.7)	
Current	42 (8.8)	12 (7.7)	30 (9.3)	
Coffee drinkers	328 (68.9)	103 (66.5)	225 (70.1)	0.421
Local tea (Mate) drinkers	211 (44.3)	68 (43.9)	143 (44.5)	0.889
<i>H. pylori</i> positive status (n=372)	244 (65.6)	73 (57.9)	171 (69.5)	0.026
Gastric endoscopic findings (n=404)				0.556
Non-erosive gastritis	250 (61.9)	85 (63.9)	165 (60.9)	
Erosive gastritis	154 (38.1)	48 (36.1)	106 (39.1)	
GERD	104 (28.1)	29 (18.7)	75 (23.4)	0.249
PADYQ score, mean ± SD	24.1 ± 7.4	25.3 ± 7.56	23.5 ± 7.2	0.026
Rome III International Consensus dyspepsia subtypes (n=475)				0.118
Epigastric pain syndrome	236 (49.7)	85 (54.8)	151 (47.2)	
Postprandial distress syndrome	239 (50.3)	70 (45.2)	169 (52.8)	
HADS-A score, mean ± SD (n=474)	8.8 ± 4.3	9.2 ± 4.4	8.6 ± 4.3	0.076
≥ 8 points	281 (59.3)	99 (63.9)	182 (57.1)	0.156
≥ 11 points	168 (35.4)	62 (40.0)	106 (33.2)	0.044
HADS-D score, mean ± SD (n=474)	6.8 ± 4.4	6.9 ± 4.4	6.7 ± 4.1	0.929
≥ 8 points	191 (40.3)	66 (42.6)	125 (39.2)	0.480
≥ 11 points	92 (19.4)	33 (21.3)	59 (18.5)	0.470

BMI: body mass index; GERD: gastroesophageal reflux disease; HADS: Hospital Anxiety and Depression Scale; PADYQ: Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (score ranges from zero (no symptoms) to 44).

^aMann-Whitney U test

Table 2. Characteristics of the study patients stratified according to *H. pylori* status.

Variable	Total Sample n=372 (%)	<i>H. pylori</i> negative n=128 (%)	<i>H. pylori</i> positive n= 244 (%)	p
Age, mean ±SD, years	45.5±13.1	46.4±14.1	45.0±12.5	0.305
Female gender	309 (83.1)	107 (83.6)	202 (82.8)	0.844
White skin	288 (77.4)	103 (80.5)	185 (75.8)	0.308
Income, md (P25–75), US\$	526 (365-1026)	526 (316-947)	526 (368-1053)	0.711
Education: < 10 years of schooling	201 (54.0)	60 (46.9)	141 (57.8)	0.045
BMI, mean ± SD, kg/m ²	26.1 ± 4.7	25.9 ± 5.0	26.3 ± 4.6	0.290
Smoking status				0.958
Never/Former	297 (79.8)	102 (79.7)	195 (79.9)	
Current	75 (20.2)	26 (20.3)	49 (20.1)	
Alcohol consumption				0.485
No consumption/Former	347 (93.3)	121 (94.5)	226 (92.6)	
Current	25 (6.7)	7 (5.5)	18 (7.4)	
Coffee drinkers	252 (67.7)	87 (68.0)	165 (67.6)	0.946
Local tea (Mate) drinkers	162 (43.5)	46 (35.9)	116 (47.5)	0.032
Gastric endoscopic findings				0.039
Non-erosive gastritis	233 (62.6)	71 (55.5)	162 (66.4)	
Erosive gastritis	139 (37.4)	57 (44.5)	82 (33.6)	
Corpus histology				
Inflammation: moderate to severe	89 (23.9)	9 (7.0)	80 (32.8)	<0.001
Activity: moderate to severe	56 (15.1)	4 (3.1)	52 (21.3)	<0.001
Antrum histology				
Inflammation: moderate to severe	180 (48.4)	1 (0.8)	179 (73.4)	<0.001
Activity: moderate to severe	107 (28.8)	1 (0.8)	106 (43.4)	<0.001
PADYQ score, mean ± SD (n=235)	24.3 ± 7.4	24.6 ± 7.4	24.1 ± 7.4	0.535
Rome III International Consensus dyspepsia subtypes (n=372)				0.412
Epigastric pain syndrome	192 (51.8)	70 (54.7)	122 (50.2)	
Postprandial distress syndrome	179 (48.2)	58 (45.3)	121 (49.8)	
Recurrent aphthous stomatitis	126 (33.9)	53 (41.4)	73 (29.9)	0.026
HADS-A score, mean ± SD (n=234)	8.7 ± 4.3	8.9 ± 4.4	8.6 ± 4.3	0.517
≥ 8 points	217 (58.6)	80 (62.5)	137 (56.6)	0.274
≥ 11 points	129 (34.9)	49 (38.3)	80 (33.1)	0.316
HADS-D score, mean ± SD (n=234)	6.7 ± 4.2	7.0 ± 4.6	6.6 ± 4.0	0.507
≥ 8 points	147 (39.7)	54 (42.2)	93 (38.4)	0.482
≥ 11 points	69 (18.6)	30 (23.4)	39 (16.1)	0.085

BMI: body mass index; HADS: Hospital Anxiety and Depression Scale; PADYQ: Porto Alegre Dyspeptic Symptoms Questionnaire (score ranges from zero (no symptoms) to 44).

Table 3. Adjusted prevalence ratio for RAS in patients who were evaluated to *H. pylori* infection (n=372)

Variable	Adjusted PR (95% CI)	P
Age (decades)	0.88 (0.79-0.97)	0.013
Income		
≥ US\$ 500	1 (ref.)	
< US\$ 500	1.36 (1.03-1.79)	0.030
Smoking status		
Never/Former	1 (ref.)	
Current	0.47 (0.30-0.74)	0.001
HADS-A score		
< 11 points	1 (ref.)	
≥ 11 points	1.34 (1.01-1.77)	0.042
<i>H. pylori</i> status		
Negative	1 (ref.)	
Positive	0.72 (0.54-0.94)	0.017

HADS-A: Hospital Anxiety and Depression Scale-Anxiety

Table 4. Adjusted prevalence ratio for RAS in patients studied. (n=474*)

Variable	Adjusted PR (95% CI)	P
Age (decades)	0.89 (0.81-0.98)	0.024
Gender		
Male	1 (ref.)	
Female	1.52 (1.03-2.24)	0.035
Income		
≥ US\$ 500	1 (ref.)	
< US\$ 500	1.50 (1.16-1.94)	0.002
Schooling		
≤ 10 years	1 (ref.)	
> 10 years	1.32 (1.02-1.72)	0.036
Smoking status		
Never/Former	1 (ref.)	
Current	0.59 (0.40-0.87)	0.007
HADS-A score		
< 11 points	1 (ref.)	
≥ 11 points	1.28 (0.99-1.65)	0.061

* 2 missing data

Appendix Table 1. Clinical characteristics of RAS.

Variable	Total sample n=155 (%)
Number of episodes in the last 4 months	
1-3 episodes	105 (67.7)
4 episodes or more	50 (32.3)
Aphthous number in each episode (n=154)	
1-3 aphthous	135 (87.7)
4 aphthous or more	19 (12.3)
Size of the biggest aphthous in the last 4 months	
≤ 6 mm	135 (87.1)
> 6 mm	20 (12.9)
Mean period in each episode of RAS	
≤ 9 days	144 (92.9)
> 9 days	11 (7.1)
Pain intensity (n=152)	
Very mild to moderate pain	85 (55.9)
Severe or very severe pain	67 (44.1)
Affect the patient meals	
No or little affect	66 (42.6)
Moderate or much affect	89 (57.4)
How much the patient was trouble by aphthous	
No or little trouble	57 (36.8)
Moderate or much trouble	98 (63.2)

All authors declare no competing interests.

This study had no sponsor. The study drugs and a gastroscope, used to perform the endoscopies during the study, were obtained through unrestricted donation from the Aché Laboratórios Farmacêuticos SA, São Paulo, Brazil. No member of the research team received grants to conduct this study. The Aché Laboratório Farmacêutico SA had no involvement in the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report, and the decision to submit the article for publication.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, I. et al. Helicobacter pylori and oral pathology: Relationship with the gastric infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9922–9935, 2014.

AFGHARI, P. et al. The role of Helicobacter pylori in the development of recurrent aphthous stomatitis: SEPAHAN systematic review no. 9. **Dental research journal**, v. 8, n. Suppl 1, p. S2-8, 2011.

AKINTOYE, S. O.; GREENBERG, M. S. Recurrent aphthous stomatitis. **Dental Clinics of North America**, v. 49, n. 1 SPEC.ISS., p. 31–47, 2005.

AL ASQAH, M. et al. Is the presence of Helicobacter pylori in the Dental Plaque of Patients with Chronic Periodontitis a Risk Factor for Gastric Infection? **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 3, p. 177–179, 2009.

ALBANIDOU-FARMAKI, E. et al. Outcome following treatment for Helicobacter pylori in patients with recurrent aphthous stomatitis. **Oral Diseases**, v. 11, n. 1, p. 22–26, 2005.

ALBANIDOU-FARMAKI, E. et al. Increased anxiety level and high salivary and serum cortisol concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 4, p. 291–296, 2008.

ALMEIDA CUNHA, R. P. et al. Prevalence and risk factors associated with Helicobacter pylori infection in native populations from Brazilian Western Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 382–386, 2003.

ANAND, P. S.; KAMATH, K. P.; ANIL, S. Role of dental plaque, saliva and periodontal disease in Helicobacter pylori infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 19, p. 5639–5653, 2014.

ANDERSEN, R. N.; GANESHKUMAR, N.; KOLENBRANDER, P. E. Helicobacter

pylori adheres selectively to Fusobacterium spp. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 13, n. 1, p. 51–54, 1998.

ARSLAN TAŞ, D. et al. Impact of Helicobacter pylori on the clinical course of recurrent aphthous stomatitis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 42, n. 1, p. 89–94, 2013.

AXÉLL, T.; HENRICSSON, V. Association between recurrent aphthous ulcers and tobacco habits. **European Journal of Oral Sciences**, v. 93, n. 3, p. 239–242, 1985.

BACCAGLINI, L. et al. Urban legends: Recurrent aphthous stomatitis. **Oral Diseases**, v. 17, n. 8, p. 755–770, 2011.

BANKVALL, M. et al. The oral microbiota of patients with recurrent aphthous stomatitis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 6, p. 1–11, 2014.

BARROS, A. J. D.; HIRAKATA, V. N. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: An empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. **BMC Medical Research Methodology**, v. 3, p. 1–13, 2003.

BELENGUER-GUALLAR, I.; JIMÉNEZ-SORIANO, Y.; CLARAMUNT-LOZANO, A. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 6, n. 2, p. e168-74, 2014.

BIREK, C. et al. Detection of Helicobacter pylori in oral aphthous ulcers. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 28, n. 5, p. 197–203, 1999.

BROCKLEHURST, P. et al. Topical interventions for recurrent aphthous stomatitis (mouth ulcers). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 12, n. 9, p. CD005411, 2012.

CHATTOPADHYAY, A.; CHATTERJEE, S. Risk indicators for recurrent aphthous ulcers among adults in the US. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 35, n. 2, p. 152–159, 2007.

CHUA, E. G. et al. Gastric Helicobacter pylori infection perturbs human oral microbiota.

PeerJ, v. 2019, n. 1, p. 1–14, 2019.

DE SOUZA, P. R. M. et al. Recurrent aphthous stomatitis in 18-year-old adolescents - Prevalence and associated factors: A population-based study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 626–629, 2017.

DHOPTÉ, A. et al. Psychometric analysis of stress, anxiety and depression in patients with recurrent aphthous Stomatitis-A cross-sectional survey based study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 10, n. 11, p. e1109–e1109, 2018.

DIXON, M. F. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **The American journal of surgical pathology**, v. 20, n. 10, p. 1161–81, 1996.

EDGAR, N. R.; SALEH, D.; MILLER, R. A. Recurrent aphthous stomatitis: A review. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 10, n. 3, p. 26–36, 2017.

ELSHEIKH, M. N.; MAHFOUZ, M. E. S. Prevalence of Helicobacter pylori DNA in recurrent aphthous ulcerations in mucosa-associated lymphoid tissues of the pharynx. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 131, n. 9, p. 804–8, 2005.

FRANCESCHI, F. et al. Role of Helicobacter pylori infection on nutrition and metabolism. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 36, p. 12809–17, set. 2014.

FRITSCHER, A. M. G. et al. Association between Helicobacter pylori and recurrent aphthous stomatitis in children and adolescents. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 129–132, 2004.

GAVIC, L. et al. The role of anxiety, depression, and psychological stress on the clinical status of recurrent aphthous stomatitis and oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 43, n. 6, p. 410–417, 2014.

GEBARA, E. C. E. et al. Persistence of Helicobacter pylori in the oral cavity after

systemic eradication therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, n. 5, p. 329–33, 2006.

GIANNETTI L, MURRI DELLO DIAGO A, IALO M. L. Recurrent aphthous stomatitis. **Minerva Stomatol.**, v. 67, n. 3, p. 125–128, 2017.

GOMES, C. C. et al. Recurrent aphthous stomatitis and *Helicobacter pylori*. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 21, n. 2, p. 187–91, 2016.

GRADY, D. et al. Smokeless tobacco use prevents aphthous stomatitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 74, n. 4, p. 463–465, 1992.

IAMAROON, A. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in recurrent aphthous ulceration by nested PCR. **Journal of oral science**, v. 45, n. 2, p. 107–110, 2003.

ISHIHARA, K. et al. Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, n. 2, p. 355–61, 1997.

KARACA, S. et al. The effect of gastric *Helicobacter pylori* eradication on recurrent aphthous stomatitis. **International Journal of Dermatology**, v. 47, n. 6, p. 615–617, 2008.

KIM, Y. J. et al. Mucosal and salivary microbiota associated with recurrent aphthous stomatitis. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 57, 2016.

LACY, B. E. et al. Functional dyspepsia: The economic impact to patients. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 2, p. 170–177, 2013.

LAN, L. et al. Symptom-based tendencies of *Helicobacter pylori* eradication in patients with functional dyspepsia. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 27, p. 3242–7, 2011.

LI, L.; GU, H.; ZHANG, G. Association between recurrent aphthous stomatitis and *Helicobacter pylori* infection: A meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 6, p. 1553–1560, 2014.

LIU, H. et al. Specific and sensitive detection of *H. pylori* in biological specimens by real-time RT-PCR and in situ hybridization. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 2689, 2008.

LOSTER, B. W. et al. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 91–100, 2006.

LUMAN, W. et al. *Helicobacter pylori* in the mouth - Negative isolation from dental plaque and saliva. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 11–14, 1996.

MALFERTHEINER, P.; SELGRAD, M. *Helicobacter pylori* infection and current clinical areas of contention. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 6, p. 618–623, 2010.

MALIK, G. M.; MUBARIK, M.; KADLA, S. A. *Helicobacter pylori* infection in endoscopic biopsy specimens of gastric antrum: Laboratory diagnosis and comparative efficacy of three diagnostic tests. **Diagnostic and Therapeutic Endoscopy**, v. 6, n. 1, p. 25–29, 2000.

MANSOUR-GHANAIE, F. et al. *Helicobacter pylori* infection in oral lesions of patients with recurrent aphthous stomatitis. **Medical Science Monitor**, v. 11, n. 12, p. 576–580, 2005.

MARCHINI, L. et al. Bacterial diversity in aphthous ulcers. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 4, p. 225–31, 2007.

MAZZOLENI, L. E. et al. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES Trial. **Archives of Internal Medicine**, v. 171, n. 21, p. 1929–36, 2011.

MAZZOLENI, L. E.; MAZZOLENI, F. Tratamento e retratamento do *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, n. 5, p. 153–164, 2010.

MIYABAYASHI, H. et al. Influence of Oral *Helicobacter pylori* on the Success of Eradication Therapy Against Gastric *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 5, n. 1, p. 30–37, 2000.

MRAVAK-STIPETIĆ, M. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in various oral lesions by nested polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 27, n.

1, p. 1–3, 2007.

NAJAFI, S. et al. Association study of interleukin-1 family and interleukin-6 gene single nucleotide polymorphisms in recurrent aphthous stomatitis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 42, n. 6, p. 428–431, 2015.

PEDERSEN, A. Psychologic stress and recurrent aphthous ulceration. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 18, n. 2, p. 119–22, 1989.

POLAT, C. et al. Association Between Anxiety, Depression, and Salivary Cortisol Levels in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. **Turk Otolarengoloji Arsivi/Turkish Archives of Otolaryngology**, v. 56, n. 3, p. 166–169, 2018.

PORTER, S. R. et al. Serum IgG antibodies to Helicobacter pylori in patients with recurrent aphthous stomatitis and other oral disorders. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 83, n. 3, p. 325–8, 1997.

POUNDER, R. E.; NG, D. The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement**, v. 9, n. 2, p. 33–9, 1995.

RIGGIO, M. P. Detection of Helicobacter pylori DNA in recurrent aphthous stomatitis tissue by PCR. **J Oral Pathol Med.**, v. 29, n. 10, p. 507–513, 2000.

RIGGIO, M. P.; LENNON, A. Identification by PCR of Helicobacter pylori in subgingival plaque of adult periodontitis patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 317–322, 1999.

RIVERA-HIDALGO, F.; SHULMAN, J. D.; BEACH, M. M. The association of tobacco and other factors with recurrent aphthous stomatitis in an US adult population. **Oral Diseases**, v. 10, n. 6, p. 335–345, 2004.

SANDER, G. B. et al. Development and validation of a cross-cultural questionnaire to evaluate nonulcer dyspepsia: The porto alegre dyspeptic symptoms questionnaire (PADYQ).

Digestive Diseases and Sciences, v. 49, n. 11–12, p. 1822–9, 2004.

SANDER, G. B. et al. Influence of organic and functional dyspepsia on work productivity: The HEROES-DIP study. **Value in Health**, v. 14, n. 5 SUPPL., p. S126–S129, 2011.

SAWAIR. Does smoking really protect from recurrent aphthous stomatitis? **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 22, n. 6, p. 573–7, 2010.

SCULLY, C.; PORTER, S. Oral mucosal disease: Recurrent aphthous stomatitis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 3, p. 198–206, 2008.

SERIN, E. et al. Halitosis in patients with Helicobacter pylori-positive non-ulcer dyspepsia: An indication for eradication therapy? **European Journal of Internal Medicine**, v. 14, n. 1, p. 45–48, 2003.

SHIMOYAMA, T. et al. Helicobacter pylori in oral ulcerations. **J Oral Sci.**, v. 42, n. 4, p. 225–229, 2000.

SHIP, I. I. Epidemiologic aspects of recurrent aphthous ulcerations. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 33, n. 3, p. 400–406, 1972.

SHULMAN, J. D. An exploration of point, annual, and lifetime prevalence in characterizing recurrent aphthous stomatitis in USA children and youths. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 33, n. 9, p. 558–566, 2004.

ŚLEBIODA, Z.; SZPONAR, E.; KOWALSKA, A. Etiopathogenesis of recurrent aphthous stomatitis and the role of immunologic aspects: Literature review. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 62, n. 3, p. 205–15, 2014.

STANGHELLINI, V. et al. Gastroduodenal disorders. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1380–1392, 2016.

TACK, J. et al. Functional Gastroduodenal Disorders. **Gastroenterology**, v. 130, n. 5, p. 1466–79, 2006.

THUNG, I. et al. Review article: The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, n. 4, p. 514–533, 2016.

TUGRUL, S. et al. Total antioxidant status and oxidative stress in recurrent aphthous stomatitis. **International Journal of Dermatology**, v. 55, n. 3, p. e130–e135, 2016.

TÜZÜN, B. et al. Recurrent aphthous stomatitis and smoking. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 5, p. 358–360, 2000.

VEIGA, N. et al. Oral and gastric *Helicobacter pylori*: Effects and associations. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2015.

VICTÓRIA, J. M. N. et al. *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 4, p. 219–223, 2003.

WEBB, J. R. et al. Association of aphthous ulcers with selfreported symptoms of depression in a sample of smartphone users. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 266–70, 2013.

YASUI, K. et al. The effect of ascorbate on minor recurrent aphthous stomatitis. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 99, n. 3, p. 442–445, 2010.

YEE, J. K. C. Are the view of *Helicobacter pylori* colonized in the oral cavity an illusion? **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 11, p. e397, 2017.

ZATERKA, S. et al. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter**, v. 12, n. 1, p. 82–88, 2007.

ZHAO, Y. et al. *Helicobacter pylori* infection alters gastric and tongue coating microbial communities. **Helicobacter**, v. 24, n. 2, p. e12567, 2019.

ZIGMOND, A. S.; SNAITH, R. P. The Hospital Anxiety and Depression Scale. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 67, n. 6, p. 361–70, 1983.

14. ANEXOS

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Questionário sobre AFTAS – V1

NOME COMPLETO: _____

DATA: ____ / ____ / ____

MARQUE COM “x” AS RESPOSTAS ABAIXO. Apenas uma resposta para cada pergunta.

1. O(A) Sr(a) apresentou AFTAS na boca nos últimos 4 meses?

- (1) Sim (2) Não


2. Quantas vezes (crises ou episódios) o(a) Sr(a) teve nos últimos 4 meses?

- (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4-7 (5) 8 ou mais

3. Quantas aftas surgiram em cada crise?

- (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4-9 (5) 10 ou mais

4. Qual o tamanho da MAIOR afta que o(a) Sr.(a) teve nestes últimos 4 meses?

- (1) 2mm (2) 4mm (3) 6mm (4) 8mm (5) 1cm ou maior
- 

5. Em média, costumam durar por quantos dias?

- (1) 1-3 (2) 4-6 (3) 7-9 (4) 10-14 (5) 15 ou mais

6. Qual a intensidade da DOR?

- (1) Muito leve (2) Leve (3) Moderada (4) Forte (5) Muito Forte

7. Atrapalha sua alimentação?

- (0) Nada (1) Muito pouco (2) Pouco (3) Moderadamente (4) Muito

8. De uma maneira geral, quanto você é incomodado por aftas?

- (0) Nada (1) Muito pouco (2) Pouco (3) Moderadamente (4) Muito

9. O(A) Sr.(a) está com afta(s) HOJE?:

- (1) Sim (2) Não

Escala de ansiedade e depressão para hospital geral (HADS)

Nome: _____ Data: ___/___/___

Por favor, assinale uma alternativa em cada grupo abaixo, que melhor represente o seu estado de saúde hoje.

Eu me sinto tenso ou contraído:

- () 1. A maior parte do tempo
() 2. Boa parte do tempo
() 3. De vez em quando

4. Nunca

Eu ainda sinto gosto pelas mesmas coisas de antes:

1. Sim, do mesmo jeito que antes

2. Não tanto quanto antes

3. Só um pouco

4. Já não sinto mais prazer em nada

Eu sinto uma espécie de medo, como se alguma coisa ruim fosse acontecer:

1. Sim, e de um jeito muito forte

2. Sim, mas não tão forte

3. Um pouco, mas isto não me preocupa

4. Não sinto nada disto

Dou risada e me divirto quando vejo coisas engraçadas:

1. Do mesmo jeito que antes

2. Atualmente um pouco menos

3. Atualmente bem menos

4. Não consigo mais

Estou com a cabeça cheia de preocupações:

1. A maior parte do tempo

2. Boa parte do tempo

3. De vez em quando

4. Raramente

Eu me sinto alegre:

1. Nunca

2. Poucas vezes

3. Muitas vezes

4. A maior parte do tempo

Consigo sentar à vontade e me sentir relaxado:

1. Sim, quase sempre

2. Muitas vezes

3. Poucas vezes

4. Nunca

Eu estou lento para pensar e fazer as coisas:

1. Quase sempre

2. Muitas vezes

3. De vez em quando

4. Nunca

Eu tenho uma sensação ruim de medo, como um “frio na barriga” ou um “aperto no estômago”:

1. Nunca

2. De vez em quando

3. Muitas vezes

4. Quase sempre

Eu perdi o interesse em cuidar de minha aparência:

- 1. Completamente
- 2. Não estou mais me cuidando como deveria
- 3. Talvez não tanto quanto antes
- 4. Me cuido do mesmo jeito que antes

Eu me sinto inquieto, como se eu não pudesse ficar parado em lugar nenhum:

- 1. Sim, demais
- 2. Bastante
- 3. Um pouco
- 4. Não me sinto assim

Fico esperando animado as coisas boas que estão por vir:

- 1. Do mesmo jeito que antes
- 2. Um pouco menos do que antes
- 3. Bem menos do que antes
- 4. Quase nunca

De repente, tenho a sensação de entrar em pânico:

- 1. A quase todo o momento
- 2. Várias vezes
- 3. De vez em quando
- 4. Não sinto isto

Consigo sentir prazer quando assisto um bom programa de televisão, de rádio ou quando leio alguma coisa:

- 1. Quase sempre
- 2. Várias vezes
- 3. Poucas vezes
- 4. Quase nunca