

LAURA LÚCIA COGO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES DE VIRULÊNCIA DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Helicobacter pylori* E DETERMINAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE DIFERENTES
FITOTERÁPICOS UTILIZADOS NA MEDICINA POPULAR
BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Processos Biotecnológicos, do Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor.

Orientadora: Dra. Libera Maria Dalla Costa

Co-orientadoras: Dra. Cristina L. B. Monteiro

Dra. Marilis D. Miguel

CURITIBA

2008

“Nem sempre a vida é um corredor reto e tranqüilo que nós percorremos livres e sem dificuldades, às vezes, ela se apresenta como um labirinto de passagens, onde nos sentimos perdidos, confusos, e de vez em quando, presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos fé em Deus, e pedirmos, uma porta sempre será aberta. Talvez não aquela sobre a qual nós tanto desejávamos, mas aquela que, certamente, será perfeita para nós...”

Autor desconhecido

**À minha família e ao meu amado esposo, João
Luíz, que são os tesouros de minha vida e aos
quais dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que partilharam deste momento de minha vida e que torceram por mim e que de alguma forma me ajudaram, me incentivando e encorajando durante este período difícil.

À minha carinhosa orientadora, Dra. Libera Maria Dalla Costa, que me acudiu, quando eu mais precisei de ajuda e auxílio científico.

À minha grande amiga e co-orientadora Prof. Dra. Cristina Leise B. Monteiro, por todo ensinamento transmitido, que fez com que eu me tornasse além de uma profissional mais qualificada, um ser humano melhor.

À Prof. Dra. Marilis D. Miguel pela co-orientação, que em conjunto com o Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, contribuíram com valiosas sugestões fornecidas ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro e Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior, do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco, pela enorme contribuição oferecida, sem a qual, não seria possível a realização deste trabalho.

À Coordenação do curso, na pessoa do professor Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade da concretização deste desafio.

Aos companheiros diários de trabalho da Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, por entenderem a minha ausência nas tarefas de rotina, em especial às amigas Jussara Kasuko Palmeiro, Keite da Silva Nogueira e Maristela de Paiva, por auxiliarem efetivamente neste trabalho.

Aos colegas da Seção de Central de Soluções e Meios de Cultura do Hospital de Clínicas, por terem me ajudado, sempre que necessário.

À Mônica Evelise da Silveira, responsável pelo Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, pelo apoio constante e por ter permitido a realização da pesquisa neste serviço.

Ao Núcleo de Estudos de Bacteriologia Clínica de Curitiba, pelo efetivo apoio financeiro à execução deste trabalho e conhecimento científico transmitido ao longo destes anos.

À Newprov Produtos para Laboratório Ltda., pelo fornecimento de materiais emergenciais necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

À equipe do Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital de Clínicas, e em especial, ao Dr. Daniel Locatelli, por ter realizado as coletas das amostras clínicas analisadas, sem as quais, o trabalho não existiria.

À Dra. Heda Maria B. dos Santos Amarante, Dr. Julio César Pisani, Dr. Luiz Sergio Bizinelli, Dr. José Ederaldo Telles, por terem permitido o acesso aos sujeitos da pesquisa.

A toda equipe da UNIFAG, pela ótima convivência, em especial à querida amiga Eloá Ramalho de Camargo, pelos ensinamentos microbiológicos.

A todos os professores que contribuíram para meu desenvolvimento profissional, em especial à Professora Izabel Galarda, que sempre me incentivou, com muito carinho, a continuar estudando.

A todos os meus amigos e familiares, que durante este período, não pude dar a atenção que merecem.

Sou imensamente grata a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse levado a bom termo.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE GRÁFICOS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1. Objetivo principal.....	19
1.1.2. Objetivos secundários.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. HISTÓRICO	20
2.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	21
2.2.1. Taxonomia	21
2.2.2. Morfologia	21
2.2.3. Fatores de colonização	22
2.3. GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA.....	24
2.3.1. Gene <i>cagA</i>	24
2.3.2. Gene <i>vacA</i>	25
2.3.3. Gene <i>cagE</i>	27
2.3.4. Gene <i>iceA</i>	27
2.3.5. Gene <i>napA</i>	27
2.3.6. Outros genes de virulência	28
2.4. RESPOSTA IMUNOLÓGICA	28
2.5. PATOGENICIDADE	29
2.6. EPIDEMIOLOGIA	33

2.6.1. Prevalência.....	33
2.6.2. Transmissão	34
2.7. TERAPIA ANTIMICROBIANA	35
2.8. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	37
2.9. DIAGNÓSTICO	39
2.9.1. Técnicas que requerem endoscopia	39
2.9.1.1. Técnicas de biologia molecular	40
2.9.1.2. Teste rápido da urease.....	40
2.9.1.3. Cultura	41
2.9.1.4. Histologia	42
2.9.2. Técnicas não endoscópicas.....	43
2.9.2.1. Teste respiratório da uréia.....	43
2.9.2.2. Detecção de anticorpos	44
2.9.2.3. Detecção de antígenos nas fezes	45
2.10. FITOTERAPIA.....	45
2.10.1. Fitoquímica e propriedades farmacológicas das plantas medicinais	47
2.10.2. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais	50
2.10.3. Métodos para pesquisa de atividade antimicrobiana	51
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	53
3.1. CASUÍSTICA E AMOSTRAS	53
3.2. MÉTODOS	54
3.2.1. Semeadura das amostras	54
3.2.2. Identificação bacteriana	54
3.2.3. Criopreservação e reativação	55
3.2.4. Análise da atividade antimicrobiana dos Fitoterápicos	57
3.2.4.1. Teste de Disco Difusão.....	58
3.2.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	58
3.2.5. Extração de DNA	60
3.2.6. Amplificação por PCR	61
3.2.7. Métodos estatísticos.....	64

4. RESULTADOS	65
4.1. TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	67
4.2. OCORRÊNCIA DAS INFECÇÕES.....	75
4.3. DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA.....	75
5. DISCUSSÃO	78
5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FITOTERÁPICOS.....	78
5.2. ANÁLISE DA OCORRÊNCIA.....	83
5.3. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	83
6. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	101

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PROGRAMAS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS PARA OS DIFERENTES GENES PESQUISADOS.....	62
QUADRO 2 - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO DOS EXTRATOS DE PLANTAS PARA AS LINHAGENS <i>H. pylori</i> 26695 e J99.....	68
QUADRO 3 - RESULTADOS OBTIDOS DAS CIM (mg/mL) DOS EXTRATOS DE PLANTAS CONTRA OS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>H. pylori</i> E LINHAGENS REFERÊNCIA J99 E 26695.....	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	TESTE RÁPIDO DA UREASE.....	41
FIGURA 2 -	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA BIÓPSIA GÁSTRICA UTILIZANDO COLORAÇÃO DE GIEMSA, ONDE SE OBSERVA A PRESENÇA DE <i>H. pylori</i>	43
FIGURA 3 -	ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR.....	60
FIGURA 4 -	CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTURIAL DO <i>H. pylori</i> ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DE GRAM.....	65
FIGURA 5 -	PROVAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>H. pylori</i>	66
FIGURA 6 -	TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO PARA PESQUISA DA ATIVIDADE ANTI- <i>H. pylori</i> UTILIZANDO DISCOS IMPREGNADOS COM OS DIFERENTES EXTRATOS DE PLANTAS TESTADOS.....	67
FIGURA 7 -	TÉCNICA DA DILUIÇÃO EM ÁGAR UTILIZANDO REPLICADOR DE STEERS.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE <i>Bixa orellana</i> CONTRA AS CEPAS DE <i>H. pylori</i>	71
GRÁFICO 2 -	VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE <i>Chamomilla recutita</i> CONTRA AS CEPAS DE <i>H. pylori</i>	72
GRÁFICO 3 -	VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE <i>Ilex paraguariensis</i> (VARIEDADE ERVA-MATE VERDE) CONTRA AS CEPAS DE <i>H. pylori</i>	72
GRÁFICO 4 -	VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE <i>Ilex paraguariensis</i> (VARIEDADE MATE TOSTADO) CONTRA AS CEPAS DE <i>H. pylori</i>	73
GRÁFICO 5 -	VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE <i>Malva sylvestris</i> CONTRA AS CEPAS DE <i>H. pylori</i>	73
GRÁFICO 6 -	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS E VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA OS EXTRATOS DE <i>B. orellana</i> , <i>M. sylvestris</i> , <i>C. recutita</i> E <i>I. paraguariensis</i> (VARIEDADES ERVA-MATE VERDE E MATE TOSTADO) CONTRA OS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>H. pylori</i>	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXTRATOS DE PLANTAS UTILIZADOS NA TRIAGEM INICIAL PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI- <i>Helicobacter pylori</i>	57
TABELA 2 - GENES INVESTIGADOS, SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIALIZADORES E PRODUTO ESPERADO NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO.....	63
TABELA 3 - GENÓTIPOS DO <i>vacA</i> E <i>cagA</i> DE PACIENTES DE ACORDO COM AS PRINCIPAIS PATOLOGIAS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
µl	Microlitro
µg/ml	Microgramas por mililitro
Alp A e B	Adhesion associated lipoproteins
Bab A	Blood group antigen binding protein
cagA	Cytotoxin associated gene A
CIM	Concentração inibitória mínima
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GERD	Doença do refluxo gastroesofágico
GT	Gastrite
iceA	Induced by contact with epithelium gene
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hop Z	Helicobacter outer proteins
Hp-nap	Neutrophils activating protein gene
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
µg/mL	Microgramas por mililitro
mEq/L	Miliequivalentes por litro
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/L	Miligrama por litro
Mm	Milímetros
mmol/L	Milimoles por litro
NSAID	Droga antiinflamatória não esteróide
NUD	Dispepsia funcional ou não ulcerosa
pH	Potencial hidrogênio iônico
Sab A	Sialic acid binding adhesion A
SOD	Superóxido dismutase
sp	Espécie
spp	Espécies
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
TTC	cloreto de trifetil tetrazolium
UP	Úlcera péptica
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UNIFAG	Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia
USF	Universidade São Francisco de Bragança Paulista-SP
vacA	Vacuolating Cytotoxin gene A

RESUMO

A infecção por *H. pylori* está associada com o desenvolvimento de diversas desordens clínicas do trato gastrointestinal superior, como gastrite, doença ulcerosa péptica e câncer gástrico. Há séculos medicamentos baseados em plantas têm sido usados no tratamento de uma variedade de infecções, inclusive em desordens gastrointestinais, e vários produtos naturais têm demonstrado atividade antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori*. O presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos fluídos de algumas plantas utilizadas na medicina popular brasileira, como *Malva sylvestris*, *Chamomilla recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Plantago major*, *Rheum rhaponticum*, *Bixa orellana*, *Curcuma longa*, *Nasturtium officinale* e *Ilex paraguariensis*, contra isolados clínicos de *Helicobacter pylori*. Paralelamente foi determinada a prevalência do microrganismo nos pacientes atendidos no Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), na cidade de Curitiba-PR e pesquisada a presença de genes de virulência a partir do DNA extraído das amostras clínicas. Das 81 amostras de biópsias gástricas analisadas, 42 (51,2%) apresentaram cultura positiva para *H. pylori*. Foi observado que a prevalência do microrganismo aumentou significativamente de acordo com a idade ($p < 0,0003$): 20-29 anos 25% (2/8); 30-49 anos 51,7% (15/29); 50-80 anos 56,8% (25/44) e nenhuma diferença significativa relacionada ao sexo foi encontrada ($p=0,9526$). Entre os genes de virulência pesquisados, o gene *napA* esteve presente em 100% das amostras analisadas e o gene *cagA*, em 92,3%. Para a associação dos alelos s e m do gene *vacA*, obteve-se porcentagens de 56,2 %, 2,1%, 2,1% e 39,6% para os genótipos s1m1, s1m2, s2m1 e s2m2, respectivamente. Dos extratos vegetais analisados, o de *Ilex paraguariensis* apresentou melhor atividade anti-*Helicobacter pylori*, seguido da *Chamomilla recutita*. Estudos clínicos posteriores são necessários para confirmar a atividade anti-*Helicobacter in vivo* destes extratos.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; atividade antimicrobiana; extratos fluídos de plantas; genes de virulência.

ABSTRACT

Infection by *Helicobacter pylori* has been associated with the development of several upper gastrointestinal clinical disorders, such as gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. There are many centuries that medicine based on plants have been used on treatment of a different infections, including gastrointestinal disorders, and natural products have been shown antimicrobial activity against *H. pylori*. This work evaluated the *in vivo* antimicrobial activity of the fluids extracts of plants used on the Brazilian medical folk, such as *Malva sylvestris*, *Chamomilla recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Plantago major*, *Rheum rhaponticum*, *Bixa orellana*, *Curcuma longa*, *Nasturtium officinale* and *Ilex paraguariensis*, against *H. pylori*. Concurrently it was determined the prevalence of the microorganism in patients attended at Endoscopy Service from the Clinical Hospital of the Federal University of Parana, from Curitiba city, PR and realized the molecular characterization of virulence genes from the extracted DNA of the clinical samples. Among the 81 gastric biopsies analyzed, 42 (51,9%) presented positive culture for *H. pylori*. It was observed that the prevalence of microorganism increased significantly according to the age ($p < 0,0003$), as follow: 20-29 years 25% (2/8); 30-49 years 51,7% (15/29); 50-80 years 56,8% (25/44) and no one significant difference related to sex it was found ($p=0,9526$). Among the virulence genes searched, the *napA* gene it was present in 100% of the analyzed samples and the *cagA* gene, in 92,3 %. For the association of the alleles *s e m* do of *vacA* gene, it was achieved percentage of 56,2 %, 2,1%, 2,1% and 39,6% to the s1m1, s1m2, s2m1 e s2m2 genotypes, respectively. From the extracts of plants analyzed, *Ilex paraguariensis* shown better anti-*Helicobacter pylori* activity, followed from the *Chamomilla recutita*. Clinical further studies will be necessary to confirm the *in vivo* anti-*Helicobacter* activity of *this extracts*.

Key words: *Helicobacter pylori*; antimicrobial activity; fluids extracts of plants; virulence genes.

1. INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori é um bacilo gram negativo curvo que foi isolado pela primeira vez pelos pesquisadores australianos Barry Marshall e J. Robin Warren. Desde a sua descoberta, em 1983, este microrganismo tem sido associado à etiopatogenia de diversas doenças do aparelho digestivo, como gastrite, doença da úlcera péptica e câncer gástrico (KUSTERS *et al.*, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a distribuição do microrganismo não ocorre de maneira uniforme nos grupos populacionais, variando de acordo com a idade, raça, condição sócio-econômica e região geográfica.

A alta prevalência da infecção por *H. pylori* observada na população mundial, comparada com a presença relativamente baixa das doenças associadas a ele, sugere que os isolados bacterianos têm significados clínicos diferentes e ressalta-se, portanto a importância da pesquisa de marcadores moleculares, a fim de identificar qual genótipo bacteriano apresentaria um risco maior de desenvolver doenças severas. Assim, apenas nos indivíduos em que os sinais clínicos da infecção estariam presentes, a terapia da erradicação seria recomendada.

Há séculos medicamentos baseados em plantas têm sido usados no tratamento de uma variedade de desordens gastrointestinais, como dispepsia, gastrite e doença da úlcera péptica e vários produtos naturais têm demonstrado atividade antimicrobiana frente ao *H. pylori*.

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Durante um longo período de tempo, as plantas têm sido avaliadas como fonte de produtos naturais utilizadas no auxílio à saúde, especialmente nas últimas décadas, com estudos intensivos para a terapia natural.

Os registros sobre as espécies de plantas superiores investigadas são poucos na literatura, assim como o potencial do meio ambiente, foi pouco explorado, em relação à rica diversidade biológica do Brasil.

O alto índice de resistência observado na terapêutica tradicional utilizada no tratamento das infecções bacterianas, e entre elas, na erradicação do *H. pylori*, faz com que seja necessário desenvolver métodos alternativos. Além da falência do tratamento devido à resistência bacteriana, pode ocorrer a falta de cooperação do paciente, em decorrência dos efeitos colaterais apresentados pelos medicamentos prescritos, ou ainda a recidiva da infecção. Assim, é de extrema importância procurar novas e efetivas drogas com ação anti-*Helicobacter pylori*, e plantas se apresentam como uma alternativa importante na obtenção de novos compostos.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Caracterizar molecularmente os principais genes de virulência de *H. pylori* provenientes de biópsias gástricas e determinar sua terapêutica associada à medicina popular brasileira.

1.1.2. Objetivos específicos

- Avaliar, entre os extratos fluidos de *Bixa orellana*, *Chamomilla recutita*, *Curcuma longa*, *Ilex paraguariensis*, *Malva sylvestris*, *Maytenus ilicifolia*, *Nasturtium officinale*, *Plantago major* e *Rheum rhaponticum* testados, qual apresentou melhor atividade anti-*Helicobacter pylori* *in vitro*.
- Verificar a ocorrência do *H. pylori* nos pacientes atendidos no serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital de Clínicas da UFPR.
- Pesquisar a presença dos genes de virulência *napA*, *cagA* e *vacA* nas amostras de *H. pylori* isoladas através de técnicas moleculares.
- Investigar a associação entre a presença dos genes de virulência estudados e os achados clínicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

No final do século XIX e início do século XX, vários pesquisadores relataram a presença de um microrganismo espiralado no estômago de animais, entre eles Rappin, em 1881 (SOLNICK e SCHAUER, 2001). Posteriormente o patologista italiano Bizzozero descreveu, em 1892, a presença de microrganismos em formato de espiral associados com vacúolos nas células da mucosa gástrica de cães. Na mesma época, Pel (1899) reportou a relação entre a presença de uma bactéria semelhante no suco gástrico de humanos e desordens gastrointestinais altas. Anos mais tarde, Doenges realizando autópsias encontrou espiroquetas em grande parte (43%) dos estômagos analisados (KUSTERS e KUIPERS, 2001).

Durante várias décadas estes relatos foram considerados irrelevantes e esquecidos, provavelmente devido ao fato que os bacilos gástricos observados não podiam ser cultivados em laboratório, pela dificuldade de obtenção das amostras clínicas humanas (STORM, 2006) ou ainda pela alta prevalência desta bactéria no estômago de várias pessoas sem nenhum significado clínico (KUSTERS *et al.*, 2006). Este posicionamento perdurou até o início da década de 1980, época em que Warren e Marshall realizaram seus experimentos (MARSHALL e WARREN, 1984).

Robin Warren e Barry Marshall estavam convencidos de que a bactéria vista em cortes histológicos podia ser cultivada e esta determinação finalmente resultou, em 1983, no isolamento de uma bactéria gram-negativa flagelada em formato espiral (MURPHY, 2001). A bactéria foi inicialmente denominada *Campylobacter like organism*, passando a *Campylobacter pyloridis* e mais tarde, por correção gramatical, foi chamada de *Campylobacter pylori* (MAHON e MANUSELIS, 1995). Após vários estudos bioquímicos e genéticos, em 1989, seu

nome foi alterado para *Helicobacter pylori*, o primeiro membro de um novo gênero (SOLNICK e SCHAUER, 2001).

2.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

2.2.1. Taxonomia

O gênero *Helicobacter* pertence à subdivisão Epsilon das Proteobacterias, ordem *Campylobacterales*, família *Helicobacteraceae*. Esta família também inclui os gêneros *Wolinella*, *Flexpira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* e *Thiovulum*. Até o momento, o gênero *Helicobacter* consiste de 27 espécies, sendo que 20 destas são reconhecidas oficialmente, e as demais aguardam o reconhecimento formal (KUSTERS *et al.*, 2006).

2.2.2. Morfologia

A bactéria *H. pylori* é um bacilo espiral gram-negativo, não formador de esporos (MURRAY *et al.*, 2003), cujas dimensões variam de 0,5 µm a 1 µm de diâmetro e 3 a 5 µm de comprimento (WINDSOR e O'ROURKE, 2000). Apresenta de 4 a 6 flagelos unipolares, que diferente de outros microrganismos, contem um bulbo na porção terminal (LADEIRA *et al.*, 2003).

Outra característica morfológica importante do *H. pylori* está relacionada com seu comportamento em situações adversas, como após o cultivo prolongado *in vitro* ou terapia antimicrobiana, nestas situações a bactéria pode ser convertida da forma espiral para a forma cocóide. Assim, o microrganismo pode apresentar duas formas distintas, a de bacilo espiralado, ou também denominado helicoidal e a forma cocóide (KUSTER *et al.*, 1997).

A conversão morfológica do microrganismo ocorre através de uma etapa intermediária em que a bactéria passa por forma de “ U ” para finalmente terminar

como cocóide (SORBERG *et al.*, 1996). Acredita-se que esta última caracteriza morte celular, embora alguns pesquisadores têm sugerido que a forma cocóide possa representar um estado viável, porém não cultivável da bactéria (KUSTERS *et al.*, 2006).

Apesar da forma espiral do *H. pylori* ser normalmente considerada como a responsável pela patogenicidade, ambas as formas podem ser encontradas no estômago ou duodeno humano e, mesmo havendo vários estudos, o papel da forma cocóide na patogênese bacteriana permanece incerto (COLE *et al.*, 1997).

2.2.3. Fatores de colonização

O estômago humano ingere muitos microrganismos a cada dia, mas a maioria não consegue colonizar a região com sucesso. Uma das mais importantes propriedades do estômago é seu pH ácido, que pode ser inferior a 2 no lúmen gástrico, impedindo a proliferação da maioria das bactérias. Na camada de muco que recobre as células epiteliais gástricas, existe um gradiente de pH, de aproximadamente 2 na superfície luminal e de 5 a 6 na superfície da célula epitelial (ALGOOD e COVER, 2006).

Inúmeras substâncias produzidas pela mucosa gástrica limitam a proliferação da bactéria e impedem sua colonização no estômago. Porém, baseado na alta prevalência do *H. pylori* em humanos por todo o mundo, pode-se presumir que o mesmo possui mecanismos para se livrar destas defesas do hospedeiro (ALGOOD e COVER, 2006).

A principal adaptação do *H. pylori* ao ambiente hostil estomacal é a produção de uma enzima, a urease. A peculiaridade da urease desta bactéria em especial é a sua atividade e produção abundante, totalizando até 6% de todas as proteínas bacterianas produzidas (MÉGRAUD, 2005).

A urease atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia. A maior parte da urease sintetizada pela bactéria situa-se em seu citoplasma. Assim, a produção de

amônia depende da entrada de uréia na bactéria, que é controlada por uma proteína de membrana sensível ao pH, a *ureI*. Esta proteína atua como um canal, que também permite o refluxo de urease, aumentando o pH periplasmático e do microambiente próximo e prevenindo acúmulo tóxico de uréia dentro da bactéria. Desta maneira, a bactéria fica protegida dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago (LADEIRA *et al.*, 2003) e é capaz de colonizar e se multiplicar na mucosa gástrica (BLACK, 2002).

A bactéria, na fase precoce de colonização, necessita atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico. Tal camada é formada por um gel viscoelástico que confere proteção química e mecânica ao revestimento epitelial, inclusive contra bactérias (OWEN *et al.*, 2003). No entanto lípases e proteases sintetizadas pelo *H. pylori* degradam a camada de muco, facilitando a progressão da bactéria (LADEIRA *et al.*, 2003).

Para ser capaz de sobreviver na mucosa digestiva, onde há baixa pressão de oxigênio, é necessário que a bactéria se adapte e apresente um equipamento enzimático específico. A maioria das bactérias pertencentes ao gênero *Helicobacter* necessitam de uma tensão de oxigênio relativamente reduzida e os 21% de oxigênio presentes no ar são tóxicos para elas. O ambiente adequado para seu desenvolvimento, com estas características, é próximo aos espaços intercelulares das células epiteliais gástricas (MÉGRAUD, 2005).

A morfologia em espiral associada aos flagelos favorece a capacidade de colonização do estômago (SILVEIRA *et al.*, 2005), pois os mesmos são recobertos com uma camada de fosfolipídio, cuja função é proteger a bactéria da acidez do suco gástrico. Estes flagelos apresentam duas sub-unidades: Fla A e Fla B, e os dois genes correspondentes são responsáveis pela motilidade, como foi provado por experimentos de inativação dos mesmos. Entretanto, muitos outros genes estão envolvidos na formação e regulação da estrutura flagelar. Outra característica importante dos flagelos do *H. pylori* é que eles também estão ligados à quimiotaxia. Assim, a bactéria pode ser atraída por substâncias específicas, como a uréia (MÉGRAUD, 2005).

A presença de enzimas, como a catalase e superóxido dismutase (SOD), permite que o microrganismo escape dos compostos gerados pelo processo da fagocitose, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (LADEIRA, *et al.*, 2003). A catalase é expressa dentro e fora da célula, além do espaço periplasmático. A SOD é localizada na superfície bacteriana e mutantes da SOD se mostram incapazes de colonizar a mucosa gástrica, quando testada em modelo camundongo. A presença destas enzimas relacionadas com alteração do DNA das células epiteliais gástricas indica que elas também podem ser consideradas como fator de virulência (MÉGRAUD, 2005).

2.3. GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA

O resultado clínico da infecção pelo *H. pylori* é determinado pela complexa interação entre fatores do hospedeiro e da bactéria. Enquanto os fatores do hospedeiro permanecem desconhecidos, a identificação dos fatores específicos da bactéria avança continuamente. Até o presente, a biotipagem, a análise do genoma e a diversidade plasmídica permitiram a identificação de cerca de quarenta cepas não-relacionadas epidemiologicamente. As variações genômicas observadas nas cepas de *H. pylori* podem ser responsáveis pela codificação de diferentes fatores de virulência, capazes de determinar diversos tipos de lesão no hospedeiro (LADEIRA *et al.*, 2003).

2.3.1. Gene *cagA*

O gene *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*) foi o primeiro marcador genético detectado em *H. pylori*. O gene codifica a proteína *cagA*, que está presente, em maior frequência, em amostras isoladas de pacientes com úlceras pépticas do que nas amostras obtidas em pacientes com gastrite (COVACCI *et al.*, 1993) e está fortemente associado ao risco para desenvolvimento de câncer

gástrico (PEEK, 1999). As cepas *cagA*⁺ tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como as interleucinas IL-1b e IL-8 (BLASER e BERG, 2001), induzindo uma resposta inflamatória mais intensa (CENSINI *et al.*, 1996).

O gene *cagA* é considerado um marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*), a qual possui de 35 a 40 Kb e é composta por mais de 31 genes (MÉGRAUD, 2005). A ilha *cagPAI* é um componente do genoma do *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias e que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV. Atua como uma agulha, servindo para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (LADEIRA *et al.*, 2003).

A estrutura do gene revela uma região 5' altamente conservada, mas com uma região 3' com número variável de seqüências repetitivas, o que leva à variação do comprimento da proteína. Como a proteína *cagA* é fortemente imunogênica, qualquer variação em seu comprimento pode levar a diferentes respostas do hospedeiro, incluindo diferentes graus de resposta inflamatória (LADEIRA *et al.*, 2003).

2.3.2. Gene *vacA*

O gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin gene A*) codifica a produção de uma citotoxina vacuolizante, considerada importante fator na etiopatogênese da úlcera péptica. Apesar do gene estar presente em todas as amostras de bactéria, apenas aproximadamente metade delas produz vacuolização celular *in vitro*, o que sugere a existência de uma diversidade genética (ASHOUR *et al.*, 2002). A heterogeneidade dos alelos *vacA* pode ser um fator determinante nas variações das doenças entre os pacientes infectados por *H. pylori* (ATHERTON *et al.*, 1999).

O gene *vacA* compreende duas partes variáveis, **s** e **m**. A região **s**, que codifica o sinal peptídico, está localizada no final da cadeia 5' e possui dois alelos,

s1 ou s2, sendo que para o alelo s1 existem três subtipos: s1a, s1b e s1c. A região **m** (média) está localizada na região mediana do gene e possui os alelos m1 ou m2 (ATHERTON *et al.*, 1995; VAN DOORN *et al.*, 1998).

A combinação em mosaico dos alelos da região **s** com os alelos da região **m** determina a produção e a especificidade da atividade da citotoxina, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria (ATHERTON *et al.*, 1995; VAN DOORN *et al.*, 1998). Todas as linhagens possuem um dos tipos de seqüência sinal e um dos tipos da região mediana, ou seja, podemos ter s1m1, s1m2, s2m2 e o menos comum s2m1 (ATHERTON *et al.*, 1997).

A presença do alelo s1 está relacionada com a produção de citotoxina, e a do alelo m1, à produção em maior quantidade da proteína. Assim, os genótipos s1m1 e s1m2 codificam a produção de citotoxina e o s2m2 está presente em amostras não citotóxicas (ASHOUR *et al.*, 2002).

As cepas do tipo m1 estão associadas a maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo m2 (ATHERTON *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 1999) e alguns estudos têm demonstrado a associação entre infecção gástrica por *H. pylori* contendo o alelo s1 e um risco maior de desenvolver doença ulcerosa péptica, quando comparados com pacientes infectados com s2 (ATHERTON *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 1999).

Os efeitos celulares produzidos pelo gene *vacA*, incluem a vacuolização, alteração da função endolisossômica, formação de poros na membrana plasmática, apoptose e permeabilização da camada epitelial. A citotoxina vacuolizante atinge diferentes alvos celulares, incluindo as vesículas endocíticas, as mitocôndrias, o citoesqueleto e as junções das células epiteliais (GODOY, 2002).

2.3.3. Gene *cagE*

Cepas *cagA*⁺ de *H. pylori* são conhecidas por induzir a liberação de IL-8 pelas células epiteliais da mucosa gástrica, ocasionando a migração de neutrófilos

durante o processo inflamatório (CRABTREE *et al.*, 1995). No entanto, cepas *cagA* negativas também induzem aumento da secreção de IL-8. Isto é devido ao fato de que a proteína *cagA* não atua diretamente sobre a IL-8. O gene ligado ao aumento da produção de IL-8 é o *cagE*, que é um dos genes da ilha *cag* (LADEIRA *et al.*, 2003).

2.3.4. Gene *iceA*

Recentemente, Peek e colaboradores (1998) descreveram outro gene do *H. pylori* denominado *iceA* (*induced by contact with epithelium*), o qual apresenta dois alelos: *iceA1* e *iceA2*. A relação do gene *iceA1* com a infecção humana ainda não está muito clara e foi sugerido que este alelo estaria associado a ulcerações duodenais (VAN DOORN *et al.*, 1998). A função do alelo *iceA2* também é desconhecida (LADEIRA *et al.*, 2003).

A expressão do gene *iceA* é regulada pelo contato do *H. pylori* com as células epiteliais da mucosa gástrica e a expressão deste alelo é associada à úlcera péptica e câncer gástrico (PEEK *et al.*, 1999).

2.3.5. Gene *napA*

O gene *napA* (*neutrophils-activating protein*) foi descrito por Evans Jr. e colaboradores (1995) e sua expressão está relacionada ao potencial de indução de inflamação, inclusive em cepas *cagA* negativas.

A gastrite induzida pelo *H. pylori* é caracterizada por um infiltrado inflamatório constituído de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A intensidade da inflamação correlaciona-se com a severidade dos danos induzidos à mucosa e ao DNA. O produto do gene, a proteína *Hp-nap*, induz aderência de neutrófilos às células endoteliais e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos neutrófilos (LADEIRA *et al.*, 2003).

2.3.6. Outros genes de virulência

A capacidade do *H. pylori* em colonizar o estômago humano pode ser atribuída não só à presença de substâncias bacterianas específicas, como a urease, flagelos, mas de outras múltiplas proteínas de membranas, incluindo *Bab A* (*blood group antigen-binding protein*), *Sab A* (*sialic acid binding adhesin A*), *Alp A*, *Alp B* (*adhesion associated lipoproteins*) e *Hop Z* (*Helicobacter outer proteins*), produzidas por seus genes específicos e que podem mediar a aderência do microrganismo às células epiteliais gástricas (ALGOOD e COVER, 2006).

2.4. RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Uma resposta imune adequada consiste em eliminar o agente agressor sem comprometer a integridade e a função do órgão envolvido. Durante a infecção por *H.pylori* há predomínio de células T *helper*₁ (Th₁), enquanto as células T *helper*₂ (Th₂) estão praticamente ausentes. Isto resulta em uma resposta imune inadequada, que não consegue eliminar o microorganismo invasor. Além disso, células Th₁ induzem à produção de anticorpos e citocinas, que contribuem para o aumento do processo inflamatório, com conseqüentes danos às células do hospedeiro (LADEIRA *et al.*, 2003).

Uma resposta imune humoral ocorre no estômago das pessoas ao serem infectadas por *H. pylori* e vários tipos de leucócitos estão normalmente presentes, além dos níveis de várias citocinas, incluindo interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 e IL-18, estarem aumentados no estômago de humanos infectados com o microrganismo (ALGOOD e COVER, 2006). A IL-1 β é um importante fator de iniciação e amplificação da resposta inflamatória (LADEIRA *et al.*, 2003) e a IL-8 é um mediador de migração de neutrófilos durante o processo inflamatório (CRABTREE *et al.*, 1995).

Com o objetivo de evitar a resposta imune e colonizar a mucosa gástrica, o *H. pylori* apresenta moléculas semelhantes às do hospedeiro, como os antígenos de Lewis. Antígenos X e Y de Lewis, similares aos expressos no eritrócito humano, estão presentes em 80% das cepas. Uma consequência é a baixa toxicidade do LPS do *H. pylori* em comparação ao LPS das Enterobactérias (MÉGRAUD, 2005).

Em um estudo com voluntários infectados com *H. pylori*, anticorpos específicos da classe IgM estavam presentes no soro dos pacientes durante 4 semanas após a infecção. Anticorpos da classe IgA e IgG em indivíduos com infecção crônica são dirigidos a vários antígenos bacterianos. Células produtoras de anticorpos específicos da classe IgA e IgM são detectadas na mucosa gástrica de indivíduos infectados e anticorpos da classe IgA secretora são detectados no suco gástrico, o que sugere que a infecção por *H. pylori* também produz uma resposta imune local na mucosa gástrica (ALGOOD e COVER, 2006).

2.5. PATOGENICIDADE

A colonização por *H. pylori* é uma condição que aumenta o risco relativo de um indivíduo em desenvolver inúmeras desordens clínicas do trato gastrointestinal superior (KUSTERS *et al.*, 2006). A bactéria é aceita como a principal causa de gastrite histológica e pela maioria dos casos de doença ulcerosa péptica, duodenal ou gástrica; estando também envolvida no desenvolvimento de adenocarcinoma do estômago e linfoma primário associado ao tecido linfóide de mucosa gástrica (TYTGAT, 2000).

A mucosa do estômago contém células que secretam suco gástrico, composto por enzimas proteolíticas e ácido clorídrico. Outras células especializadas produzem uma camada de muco que protege o estômago da digestão. Se esta defesa é rompida, uma inflamação no estômago ocorre, a gastrite. Esta inflamação pode então progredir para uma área ulcerada.

Anteriormente pensava-se que o ácido era o agente primário desta inflamação e a terapia era dirigida a drogas que inibiam a liberação de ácido. O pensamento corrente é que o sistema imune reage à presença do *H. pylori* e inicia a inflamação (TORTORA *et al.*, 2000). Logo após a colonização bacteriana, desenvolve-se uma inflamação aguda, dita gastrite aguda, que evolui para gastrite crônica superficial ou ainda, para gastrite crônica ativa (PARENTE, 2003).

Apesar da colonização gástrica por *H. pylori* induzir à gastrite histológica em todos os indivíduos infectados, apenas uma minoria desenvolve algum sinal clínico aparente desta colonização. É estimado que indivíduos infectados tenham de 10 a 20% de risco de desenvolver doença ulcerosa ao longo de sua vida, e 1 a 2% de desenvolver câncer gástrico. O risco de desenvolver estas doenças depende da variedade genética da bactéria e do hospedeiro, além de fatores ambientais (KUSTERS *et al.*, 2006).

Biópsias de mucosa gástrica que são persistentemente infectadas por *H. pylori* apresentam como característica fundamental um aumento na concentração de vários tipos de leucócitos, quando comparadas com biópsias não infectadas (DIXON *et al.*, 1996). Esta resposta inflamatória ao *H. pylori* tem sido denominada gastrite crônica superficial (DIXON *et al.*, 1996; WARREN, 2000).

A gastrite crônica pode ser tão branda de modo a não causar sinais clínicos ou apresentar sinais perceptíveis, ou ainda, produzir dor e indigestão. A gastrite pode evoluir, com formação de úlceras pépticas, que são lesões ocasionadas pela eliminação do tecido inflamatório morto e pela constante exposição ao ácido (BLACK, 2002).

A forma mais comum de gastrite, com predomínio da região antral, predispõe ao aparecimento de úlceras duodenais, enquanto a gastrite do tipo atrófica ou fúndica apresenta a maior probabilidade de levar ao surgimento de úlcera gástrica e carcinoma gástrico (SUERBAUM e MICHETTI, 2002).

A forte correlação existente entre úlcera péptica e colonização com *H. pylori* tem sido constantemente demonstrada por vários pesquisadores, seja na

patogênese, como no tratamento da doença (KUIPERS e MALFERTHEINER, 2004).

Embora a gastrite esteja associada, na maioria das vezes, à colonização por *H. pylori*, outras causas podem induzir a gastrite, como doença de Crohn, anemia perniciosa, dano químico devido ao uso abusivo de álcool ou o uso prolongado de droga anti-inflamatória não esteróide (NSAID) (KUSTERS *et al.*, 2006).

A relação na interação entre *H. pylori* e o uso de NSAID na etiologia da doença ulcerosa ainda não é conclusiva, porém a erradicação do microrganismo em usuários crônicos de NSAID diminui a incidência da mesma (KUIPERS e MALFERTHEINER, 2004).

A dispepsia funcional ou não ulcerosa, patologia em que o *H. pylori* pode estar envolvido, é definida como a presença de sintomas dispépticos no trato gastrointestinal superior, sem uma anormalidade estrutural identificável durante o diagnóstico, incluindo, em particular a endoscopia digestiva. Sintomas dispépticos podem ter um caráter semelhante a outras doenças, como queimação e regurgitamento, sensação de saciabilidade, náusea, dor e vômitos (KUSTERS *et al.*, 2006). As pesquisas tentando comprovar a correlação entre dispepsia não ulcerosa e infecção pelo *H. pylori* permanecem controversas (TYTGAT, 2000).

A doença do refluxo gastroesofágico (GERD) tem sido considerada, ao longo dos anos, de ocorrência independente à presença de *H. pylori*, entretanto, estudos atuais sugerem que o microrganismo pode proteger o indivíduo no desenvolvimento da GERD. Este conceito foi reforçado pela observação repetida da baixa prevalência de *H. pylori* em pacientes com GERD, particularmente de cepas mais virulentas (FALLONE *et al.*, 2000), porém com a erradicação da bactéria, os indivíduos tratados não apresentaram um aumento no risco de desenvolvimento de novos episódios de GERD (VAIRA *et al.*, 2003).

A inflamação crônica induzida por *H. pylori* pode também, eventualmente, desencadear uma seqüência de eventos evolutivos, onde o estágio inicial é o surgimento da gastrite crônica, seguida de atrofia gástrica, metaplasia intestinal,

displasia e terminado com o desenvolvimento de câncer gástrico (CORREA, 1992). Estima-se que a colonização gástrica pelo *H. pylori* aumenta o risco de desenvolvimento do câncer gástrico em aproximadamente 10 vezes, e com este achado, *H. pylori* foi classificado como carcinógeno do grupo I pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial de Saúde (IARC, 1994).

A mucosa gástrica humana, em seu estado normal, não contém tecido linfóide, mas a infecção crônica por *H. pylori* pode resultar na aquisição um infiltrado denso de linfócitos e plasmócitos ou até apresentar a formação de pequenos agregados de hiperplasia linfóide, denominado tecido linfóide associado à mucosa (PARENTE, 2003). Em raros casos, uma população monoclonal de células B, vindas deste tecido, começam a proliferar vagarosamente até formar um linfoma, o linfoma da mucosa gástrica associado ao tecido linfóide (linfoma MALT). Este tipo de linfoma ocorre em menos de 1% dos indivíduos infectados com *H. pylori* (KUSTERS *et al.*, 2006).

Embora na maioria das pessoas não ocorram conseqüências clínicas da colonização por *H. pylori*, entre 10 a 15% irão apresentar alguma sintomatologia, como as descritas acima (FRENCK, 2003). Além de causar doenças no trato gastrointestinal, o microrganismo também está associado a desordens extra-gastrointestinais, incluindo doença cardíaca coronariana, desordens dermatológicas como a rosácea e a urticária idiopática, tireoidite autoimune, púrpura trombocitopênica, anemia por deficiência de ferro, síndrome de Guillain-Barré, entre outras (KUSTERS *et al.*, 2006).

2.6. EPIDEMIOLOGIA

2.6.1. Prevalência

H. pylori tem sido foco de intensas pesquisas realizadas nas últimas duas décadas, motivadas pelo reconhecimento de seu papel como a principal causa de úlcera péptica e um fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico. A bactéria coloniza a mucosa gástrica de mais da metade da população mundial (DATTA *et al.*, 2003) e as pesquisas têm demonstrado que a distribuição da infecção não ocorre de maneira uniforme nos diversos grupos populacionais, ela varia de acordo com a idade, raça, condições sócio-econômicas e região geográfica (BROWN, 2000).

Nos países em desenvolvimento da África, Ásia e América do Sul, a prevalência reportada pode variar de 80 a 100% e mais de 50% das crianças tornam-se infectadas antes do 10 anos de idade (PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2003). Em estudo realizado na cidade de Belo Horizonte (MG) com indivíduos entre sete meses e 16 anos, observou-se que o indivíduo mais jovem infectado tinha 3 anos e que a taxa de infecção aumentava com a idade, atingindo 82% dos indivíduos maiores de 12 anos (LADEIRA *et al.*, 2003). A alta prevalência observada nos países em desenvolvimento pode ser atribuída principalmente às condições sanitárias precárias (KUSTERS *et al.*, 2006).

Em países desenvolvidos, não é comum encontrar crianças infectadas por *H. pylori*. A taxa de infecção aumenta cerca de 1% a cada ano de idade para indivíduos acima dos 20 anos, eventualmente atingindo uma média de 20 a 30% entre os adultos, como observado nos Estados Unidos (BLACK, 2002). Já em idosos, a pesquisa de anticorpos circulantes tem demonstrado que aproximadamente 50% são infectados (FORBES *et al.*, 1998).

A prevalência da infecção também pode variar de acordo com as diferentes patologias: está presente em 95% dos pacientes com úlceras duodenais, em 70% daqueles com úlcera gástrica. Na América Latina, onde as taxas de câncer no

estômago são as mais altas no mundo este microrganismo está relacionado em 89% dos casos (BLACK, 2002).

Diferenças na taxa de infecção podem ser observadas dentro de um país, como no Brasil. Em artigo de revisão realizado por Ladeira e colaboradores (2003), foi encontrada uma prevalência de 59,9% no Rio de Janeiro (RJ), 73,3% em São Paulo (SP), 83% em Santa Maria (RS) a 96% em São Luís (MA). Estas oscilações encontradas nas diferentes regiões são devido às diferentes dimensões continentais e desigualdades sócio-econômicas.

2.6.2. Transmissão

A infecção é adquirida predominantemente na infância (RAHMAN *et al.*, 2003). Estudos tanto no nosso meio como em países desenvolvidos demonstram a importância da mãe e irmãos em sua transmissão (BITENCOURT *et al.*, 2006). O risco de uma criança ser infectada está intimamente relacionado com a presença ou ausência de membros da família infectados (KIVI *et al.*, 2003).

As taxas de infecção aumentam significativamente com a idade, o que é atribuído ao efeito coorte, ou seja, a maior prevalência observada em indivíduos mais velhos reflete o maior risco de aquisição da infecção que essas pessoas tiveram quando crianças (BITENCOURT *et al.*, 2006).

As vias de transmissão do microrganismo ainda não estão completamente esclarecidas. Mais estudos epidemiológicos precisam ser realizados na tentativa de se descobrir o exato mecanismo de transmissão da infecção. O conceito de que o microrganismo seja transmitido pelas vias fecal-oral, oral-oral e gastro-oral tem sido aceito por muitos pesquisadores (MÉGRAUD e BROUTET, 2000; KIVI *et al.*, 2003).

Os seres humanos são considerados, até o momento, como a principal fonte de transmissão da infecção (VAN DUYNHOVEN e DE JONGE, 2001) e, embora tenha sido constatada a colonização no estômago de gatos e primatas por *H. pylori*, estas observações não justificariam plenamente a vasta distribuição

mundial do patógeno entre os seres humanos, tornando pouco provável que estes animais possam representar reservatórios ou fontes de transmissão da infecção (FOX, 1995).

Estudos realizados por Banatvala (1993) e Ferguson (1993) evidenciando a presença do microrganismo em placas dentárias e saliva, respectivamente, reforçam o conceito de que *H. pylori* pode ser transmitido pela via oral-oral.

Alguns autores sugerem que a via de transmissão gastro-oral poderia ser responsável pela transmissão da infecção entre crianças mais jovens, pois uma grande quantidade da bactéria está presente em amostras de vômitos (MÉGRAUD e BROUTET, 2000) e também foi relatado que trabalhar com pacientes infectados com *H. pylori* aumenta o risco de aquisição do microrganismo (MELO *et al.*, 2003).

Vários trabalhos têm demonstrado a presença de *H. pylori* em fezes de crianças e de adultos contaminados (THOMAZ, 1992; KELLY *et al.*, 1994; NOTARNICOLA *et al.*, 1996), sugerindo que a água seria o meio de propagação da bactéria. Este fato ocorreria principalmente em países em desenvolvimento, onde o tratamento dos efluentes não é adequado (HEATLEY, 1995).

Em estudos realizados por Eslick e colaboradores (1997) foi relatado que o microrganismo poderia ser transmitido sexualmente por via oral-anal (ESLICK *et al.*, 1997) e o risco de transmissão da bactéria através do procedimento de endoscopia foi descrito por Langenberg e colaboradores (1990).

Além das causas ambientais que contribuem para a transmissão de *H. pylori*, há estudos que indicam que fatores do hospedeiro exercem importante papel nas taxas de infecção e nas conseqüências patológicas induzidas pelo microrganismo (SAKAGAMI *et al.*, 1996; ATHERTON, 1997; KAPADIA, 1997).

2.7. TERAPIA ANTIMICROBIANA

O tratamento de infecções causadas por *H. pylori* tem sido objeto de um extenso número de estudos. Vários tempos de duração do tratamento, doses e

combinações de drogas têm sido propostos (KUSTERS *et al.*, 2006). Derivados imidazólicos (predominantemente metronidazol e timidazol), alguns macrolídeos (em particular a claritromicina e algumas vezes a azitromicina), tetraciclina e amoxicilina são provavelmente as drogas mais usadas para a terapia de erradicação de *H. pylori* (MÉGRAUD e LAMOULIATTE, 2003).

A utilização da monoterapia no tratamento de *H. pylori* não é recomendada, pois estudos demonstram que mesmo utilizando o antimicrobiano mais eficaz contra o microrganismo, o mesmo é ineficiente na erradicação do microrganismo (GRAHAM *et al.*, 1993; PETERSON *et al.*, 1993; MÉGRAUD, 1995).

A terapia dupla, combinação de duas doses diárias de um inibidor de bomba protônica com amoxicilina, ainda é usada em alguns países, mas a maioria tem substituído pela terapia tríplice. Esta combina dois antimicrobianos com um composto de bismuto ou um inibidor de bomba protônica (KUSTERS *et al.*, 2006; MÉGRAUD e LEHOURS, 2007). Os sais de bismuto e os inibidores de bomba protônica também apresentam atividade anti-*H. pylori*, mas para expressarem esta atividade, os mesmos necessitariam de uma alta concentração, a qual não é aceitável *in vivo*, pois seria tóxica para o organismo (MÉGRAUD *et al.*, 1991).

Uma alternativa mais moderna é a terapia quádrupla, que combina sais de bismuto, um inibidor de bomba protônica e dois antimicrobianos (KUSTERS *et al.*, 2006). Recentemente o uso da furazolidona tem sido proposto. Entretanto, como sua eficácia é limitada, e muitos pacientes não a toleram, ela é utilizada em pacientes que apresentam isolados resistentes ao metronidazol.

Ocasionalmente o uso de ciprofloxacina e outros antimicrobianos, como rifampicina e estreptomicina, tem sido relatado, mas estas drogas parecem não apresentar grandes vantagens sobre as demais (KUSTERS *et al.*, 2006).

Durante o primeiro encontro do Núcleo Brasileiro para o Estudo de *H. pylori*, realizado em 1997, foi recomendado à classe médica brasileira, dois esquemas terapêuticos iniciais para a erradicação da bactéria: terapia tripla com omeprazol, claritromicina e amoxicilina e uma opção mais econômica com subcitrato de bismuto, tetraciclina e furazolidona (CARVALHAES *et al.*, 1997).

O Núcleo também sugeriu três esquemas terapêuticos, para retratamento, compostos por: inibidor de bomba protônica, azitromicina, amoxicilina e subcitrato de bismuto; uma outra opção utilizando o inibidor de bomba protônica associado a subcitrato de bismuto, tetraciclina e metronidazol ou inibidor de bomba protônica com claritromicina e amoxicilina foi sugerida (CARVALHAES *et al.*, 1997).

2.8. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

H. pylori, assim como *M. tuberculosis* e outras poucas bactérias, adquire resistência por mutação. Assim, o mecanismo de resistência não envolve plasmídeos, que são transmitidos horizontalmente, mas mutações pontuais, as quais são transmitidas verticalmente. A transformação pode ocorrer, se duas cepas estiverem presentes simultaneamente no estômago. A consequência é um aumento progressivo na taxa de resistência devido à pressão seletiva (MÉGRAUD, 2007).

Entre os mecanismos de resistência existentes, o sistema de bomba de efluxo não representa grande impacto na resistência intrínseca aos antimicrobianos (BINA *et al.*, 2000), e a tetraciclina parece ser o único antimicrobiano que apresenta este mecanismo (DAILIDIENE *et al.*, 2002). Já o mecanismo de tolerância é observado na amoxicilina, a qual também expressa, embora raramente, o mecanismo de resistência por mutação (DORE *et al.*, 1999).

O microrganismo apresenta resistência intrínseca aos glicopeptídeos, polimixinas, ácido nalidíxico, trimetoprim, sulfonamidas, nistatina, anfotericina B e cicloheximide, sendo que alguns destes antimicrobianos são utilizados como agentes seletivos em meios de cultura no isolamento primário do microrganismo (MÉGRAUD, 2007).

O aumento na resistência a determinados antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções por *H. pylori* tem sido descrito em inúmeros trabalhos (BARDHAN *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 2002) e é considerado, atualmente, como

um problema emergente. Embora as taxas globais de resistência à amoxicilina sejam normalmente inferiores a 1% (KIM *et al.*, 2001), as taxas de resistência à claritromicina variam de 8 a 30% e ao metronidazol de 15 a 66% (HIYAMA *et al.*, 2003; MCMAHON *et al.*, 2003). Em países em desenvolvimento, a prevalência de bactérias resistentes ao metronidazol é muito mais elevada (50 a 80%) (TORRES *et al.*, 2001; NAHAR *et al.*, 2004).

Em estudo realizado com linhagens brasileiras para determinar a resistência primária aos antimicrobianos, a resistência ao metronidazol, amoxicilina e claritromicina verificada foi de 42%, 29% e 7%, respectivamente. Dados sobre a furazolidona (4%) e a tetraciclina (7%) também foram apresentados (MENDONÇA *et al.*, 2000).

As taxas de erradicação da infecção variam de acordo com a terapia escolhida, podendo oscilar de 50 a 95% (MCLOUGHLIN *et al.*, 2004) e a resistência antimicrobiana é o principal fator que influencia a eficácia do tratamento (HUNT *et al.*, 2000; MÉGRAUD e LAMOULIATTE, 2003). Outros fatores podem interferir na taxa de erradicação, entre eles, o consumo de álcool, sexo, tabagismo, idade, tipo e gravidade da infecção, carga bacteriana (NERI *et al.*, 2003) e reinfecção (MÉGRAUD e LAMOULIATTE, 2003).

A claritromicina parece ser o antimicrobiano mais relevante na terapia de erradicação contra *H. pylori*. Quando a resistência a este antimicrobiano está presente, a média na taxa de erradicação da terapia tríplice associada a um inibidor de bomba protônica diminui de 89% para 25% (SAVARINO *et al.*, 1999; DORE *et al.*, 2000). A redução na taxa de erradicação com resistência ao metronidazol também ocorre, porém não tão acentuadamente como a observada para a claritromicina, sendo encontrada em média, uma redução de 25% na eficácia do tratamento (MÉGRAUD, 2007).

2.9. DIAGNÓSTICO

A infecção por *H. pylori* pode ser diagnosticada por diferentes técnicas, invasivas ou não (KONEMAN *et al.*, 2001). Os métodos microbiológicos e histopatológicos, bem como as técnicas de biologia molecular para a pesquisa direta do microrganismo na mucosa gástrica, são considerados métodos invasivos, pois os fragmentos de mucosa são obtidos por esofagogastroduodenoscopia. Os métodos não invasivos ou indiretos, compreendem a pesquisa de anticorpos contra o microrganismo em amostras de soro, urina e saliva, a pesquisa de antígenos de *H. pylori* nas fezes e o teste respiratório com uréia marcada (FRANCISCO JR *et al.*, 2004; BITENCOURT *et al.*, 2006).

Diante da importância de *H. pylori* em doenças gastroduodenais, houve o interesse em se encontrar métodos diagnósticos que fossem sensíveis, específicos, práticos e de custos acessíveis para evidenciar sua presença na mucosa gástrica. Até o momento, porém, não há um método que preencha todos esses requisitos. Frente a esta limitação, tem sido recomendada a concordância de resultados em dois ou mais métodos para constituir um critério diagnóstico (FRANCISCO JR *et al.*, 2004).

2.9.1. Técnicas que requerem endoscopia

A endoscopia digestiva alta é o método de investigação de escolha para o diagnóstico da doença ulcerosa péptica, porém, na gastrite associada ao *H. pylori*, muitos indivíduos podem ter uma aparência normal da mucosa. A distribuição da bactéria e do processo inflamatório ocorre por zonas, o que pode levar a um erro de amostragem, resultando em resultados falso-negativos da biópsia, cultura e do teste de rápido da urease. Como recomendação mínima, duas biópsias devem ser retiradas a partir de 5 cm do piloro e múltiplas secções devem ser examinadas por histologia (DUNN *et al.*, 1997).

Além de estabelecer o diagnóstico e localização da úlcera, o método permite a obtenção de fragmentos de biópsia para estudo histopatológico e pesquisa de *H. pylori* (BITENCOURT *et al.*, 2006).

2.9.1.1. Técnicas moleculares

São usadas para diagnóstico da infecção, genotipagem dos marcadores de virulência do *H. pylori* e determinação de susceptibilidade da bactéria aos antimicrobianos, tanto em amostras isoladas, quanto em fragmentos de biópsia (BITENCOURT *et al.*, 2006).

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR) detecta seqüências específicas de ácidos nucleicos da bactéria, utilizando oligonucleotídeos sintéticos, que agem como *primers* para a replicação enzimática das seqüências de DNA definidas (FRANCISCO JR *et al.*, 2004). A PCR pode também ser realizada a partir de material incluído em parafina (CLAYTON *et al.*, 1992).

O exame é altamente específico e a sensibilidade superior a 95% (ROTIMI *et al.*, 2000; KINDERMANN *et al.*, 2000), mas por sua complexidade e custo é pouco utilizado no Brasil.

2.9.1.2. Teste rápido da urease

O teste rápido da urease é o método mais simples, menos dispendioso e que fornece resultado dentro de horas ou mesmo minutos, dependendo da densidade das bactérias presentes na mucosa (FRANCISCO JR *et al.*, 2004).

Este teste é baseado na principal característica bioquímica da bactéria, a produção da enzima urease, que hidrolisa a uréia em gás carbônico e amônia. Assim, uma amostra é inoculada em um meio contendo uréia e um indicador de pH. Caso a urease esteja presente, a uréia é convertida em amônia, gerando aumento do pH e subsequente mudança na coloração do meio de cultura (KONEMAN *et al.*, 2001).

Este teste pode produzir resultados falso-negativos, em razão da distribuição irregular da bactéria na mucosa, devido ao uso de antimicrobianos ou de inibidor de bomba protônica (BITENCOURT *et al.*, 2006) e resultados falso-positivos, se outros microrganismos produtores de urease estiverem presentes na amostra (KONEMAN *et al.*, 2001).

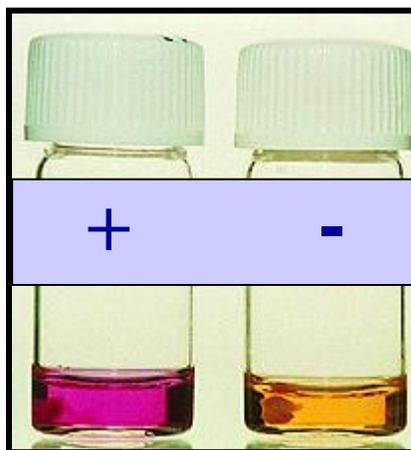


FIGURA 1 - TESTE RÁPIDO DA UREASE

FONTE: http://student.bmj.com/back_issues/0298/data/0298ed.htm student.bmj.com

2.9.1.3. Cultura

A detecção do *H. pylori* através da cultura não é fácil de ser realizada, devido à dificuldade no acesso a seu nicho ecológico e à frágil natureza deste microrganismo (MÉGRAUD, 2007). Seu isolamento a partir de fragmentos de mucosa gástrica é o método mais específico para o diagnóstico da infecção e permite, também, o estudo da amostra quanto à presença de fatores de virulência e à susceptibilidade aos antimicrobianos (BITENCOURT *et al.*, 2006).

A bactéria é microaerófila e o cultivo com sucesso da espécie requer umidade atmosférica mantida a 37°C com níveis reduzidos de oxigênio (5 a 10%)

e aumento nos níveis de dióxido de carbono (5 a 12%). Hidrogênio atmosférico (5 a 10%) também é requerido para o crescimento deste microrganismo (MURRAY *et al.*, 2003).

O crescimento bacteriano pode ser afetado por diversos fatores, como o número de biópsias analisadas, o meio de cultura utilizado, a duração e a temperatura do transporte das amostras e o próprio método de cultivo (ALVAREZ, 2006).

Apesar da especificidade elevada do método (100%) (MÉGRAUD, 2007), os valores de sensibilidade variam de 77 a 100% (WESTBLOM *et al.*, 1992; OGATA *et al.*, 2001).

2.9.1.4. Histologia

O exame histológico permite a observação direta de *H.pylori* e, ao mesmo tempo, fornece informações sobre a morfologia tecidual. Os métodos de coloração usados para demonstração do microrganismo são hematoxilina-eosina, o corante de prata Whartin-Starry e o corante de Giemsa. O corante de prata Whartin-Starry é a técnica preferível, apesar do custo. O corante de Giemsa, menos dispendioso, constitui a segunda opção (FRANCISCO JR *et al.*, 2004).

A sensibilidade e especificidade do método histológico na pesquisa do microrganismo em cortes histológicos depende principalmente, da experiência do patologista (BITENCOURT *et al.*, 2006) e podem variar de 95,6 a 96,8% e 97,7 a 100%, respectivamente (MÉGRAUD, 2007).

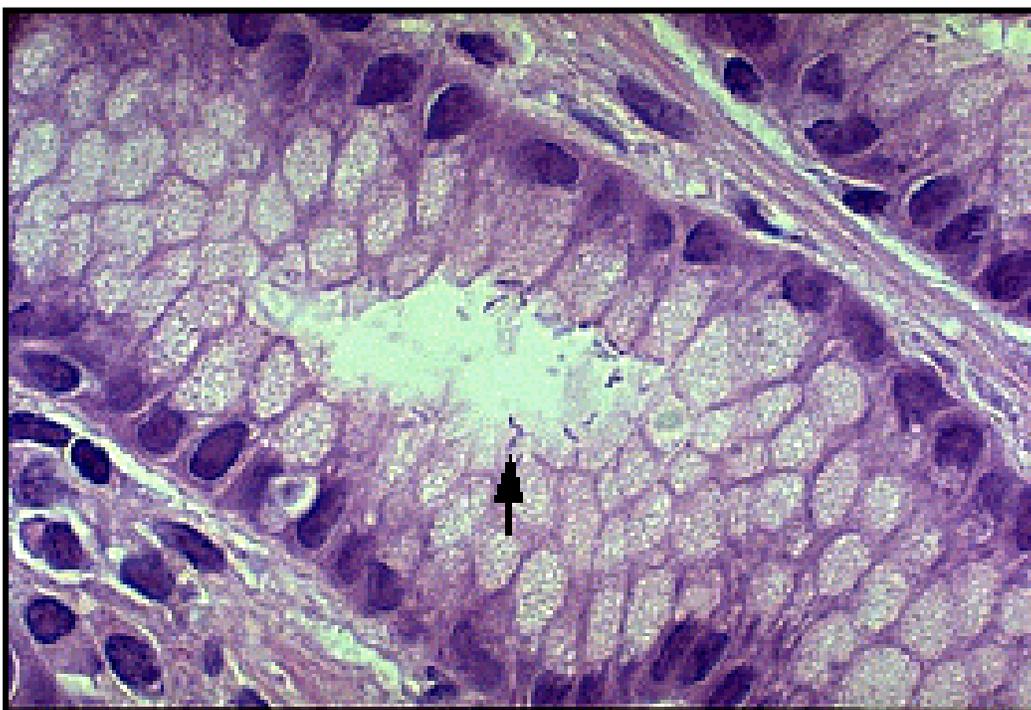


FIGURA 2 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DA BIÓPSIA GÁSTRICA UTILIZANDO COLORAÇÃO DE GIEMSA, ONDE SE OBSERVA A PRESENÇA DE *H. pylori*.

FONTE: <http://s99.middlebury.edu>

2.9.2. Técnicas não endoscópicas

2.9.2.1. Teste respiratório da uréia

O princípio do teste respiratório da uréia requer que o paciente ingira uma solução de uréia isotopicamente marcada com ^{13}C ou ^{14}C . Caso *H. pylori* esteja presente, a enzima urease catalisará a hidrólise da uréia, sendo o dióxido de carbono marcado absorvido pela corrente sangüínea e detectado pelo ar expirado. Caso o paciente não esteja infectado, não ocorrerá a liberação de dióxido de carbono marcado e a maioria do isótopo será eliminada sem modificação na urina (ATHERTON *et al.*, 1997; DUNN *et al.*, 1997).

O teste apresenta sensibilidade de aproximadamente 95%, porém resultados falso-negativos são observados quando o paciente está em uso de inibidor de bomba de prótons ou antimicrobianos (BITENCOURT *et al.*, 2006) e resultados falso-positivos podem ocorrer devido à hidrólise da uréia por outras bactérias presentes no estômago (MÉGRAUD, 2007).

2.9.2.2. Detecção de anticorpos

A infecção por *H. pylori* induz, na mucosa gástrica do hospedeiro, uma resposta imune sistêmica e local, incluindo a elevação dos níveis de IgG e IgA no soro e níveis de IgA secretora e IgM no estômago, permitindo deste modo o desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção do microrganismo. Estes métodos não invasivos são rápidos, simples de realizar e de baixo custo, quando comparados às técnicas que requerem endoscopia (DUNN *et al.*, 1997).

Entre os vários métodos disponíveis, o de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) ou aglutinação por látex são os mais usados, podendo ocorrer, porém, resultados falso-negativos em crianças, idosos, ou em indivíduos imunocomprometidos, por não desenvolverem reação imunológica contra a infecção (ATHERTON, *et al.*, 1997).

A sensibilidade e especificidade do método podem variar de acordo com a técnica empregada, a idade do paciente, amostra clínica utilizada e método comparativo, podendo a sensibilidade oscilar de 95,6 a 98,4 % e a especificidade de 88,4 a 92,6 (MÉGRAUD, 2007).

Os testes imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos na urina e saliva são ainda menos sensíveis e específicos do que os realizados no soro (BITENCOURT *et al.*, 2006).

2.9.2.3. Detecção de antígenos nas fezes

A detecção de antígenos de *H. pylori* em amostras de fezes é feita por método imunoenzimático empregando anticorpos mono ou policlonais. Como é um método não invasivo, também pode ser usado para estudos epidemiológicos (BITENCOURT *et al.*, 2006).

A sensibilidade do método é de aproximadamente 90% (MÉGRAUD, 2007), porém, deve-se salientar que o transporte e a manutenção adequados das amostras são etapas essenciais na obtenção de bons resultados e sangramento no trato gastrointestinal. O uso de antimicrobianos e de inibidor de bomba de prótons diminuem a sensibilidade do teste (BITENCOURT *et al.*, 2006).

2.10. FITOTERAPIA

As informações sobre o uso de plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram sendo acumuladas durante séculos, e muito deste conhecimento empírico se encontra disponível atualmente. De domínio público, o conhecimento de plantas medicinais representou e ainda representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Esta prática, que se caracteriza pela utilização de recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças é tão antiga quanto a espécie humana (BUFFON *et al.*, 2001).

Durante vários séculos o homem vem buscando na natureza, a cura para seus males, em especial, nos vegetais, os quais são considerados verdadeiros laboratórios bioquímicos complexos que, dentre várias substâncias, sintetizam os princípios ativos naturais. Além disso, a Fitoterapia é uma terapia tradicional recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como forma de apoio às ações de atendimento primário à saúde (COWAN, 1999).

A Fitoterapia é um método de tratamento das enfermidades que emprega vegetais frescos, drogas vegetais, ou ainda extratos vegetais preparados com

estes dois tipos de matérias primas. Atualmente, não só no Brasil, mas também em diversos países, um grande número de vegetais vem sendo utilizado como fonte alternativa de medicamentos. Segundo pesquisa realizada nos Estados Unidos, cerca de 60% dos fármacos lançados no mercado entre 1985 e 1995 são de origem natural. Entre os europeus e asiáticos observou-se um aumento de 35% desde a década de 1970. Isto significa dizer que o mundo está voltando às atenções cada vez mais para a Natureza (BRESSOLIN e CECHINEL FILHO, 2003).

Estudos revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimentava cerca de US\$ 320 bilhões ao ano, dos quais US\$ 22 bilhões são oriundos de fontes naturais. Estima-se que, no Brasil, 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica sejam derivados de plantas (SIMÕES *et al.*, 1999).

Considerando que o Brasil possui a flora mais rica do mundo em matéria prima para a produção de fitofármacos (cerca de 1/3 do total) e que apenas aproximadamente 8% da mesma foi estudada, é de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de medicamentos, visando no futuro a obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (SIMÕES *et al.*, 1999).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas (CUNICO *et al.*, 2004).

As mesmas árvores, arbustos e ervas empregados pelos povos antigos para tratar doenças e amenizar dores e incômodos continuam a ser valorizados na atualidade. Com o desenvolvimento da fitoterapia, muitos dos princípios físicos, químicos e propriedades farmacológicas das plantas medicinais e dos produtos naturais encontram-se bem estabelecidos, auxiliando no processo de desenvolvimento de novos fármacos (DI STASI, 1996).

2.10.1. Fitoquímica e propriedades farmacológicas das plantas medicinais

O número de produtos naturais produzidos por plantas é muito elevado (DEMAIN, 2000). Ao se estudar uma planta com relação às suas características fitoquímicas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, que são importantes para o seu desenvolvimento: os metabólitos primários, encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, lipídeos, entre outros e os metabólitos secundários, que são produtos do metabolismo específico, relacionados aos processos adaptativos. Os metabólitos secundários são biossintetizados a partir de metabólitos primários, com distribuição restrita a certas plantas e microrganismos (às vezes característicos de um dado gênero ou espécie); e caracterizados por uma enorme diversidade química, como por exemplo, os alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, etc. Em geral, o termo “produto natural” é sinônimo de metabólito secundário (BRESSOLIN e CECHINEL FILHO, 2003).

Uma das principais características da droga corresponde à presença de princípios ativos, que são naturalmente encontrados nas espécies vegetais, e se apresentam como substâncias quimicamente definidas responsáveis pela atividade farmacodinâmica, ou seja, pelos efeitos terapêuticos ou atividades biológicas apresentadas em determinado organismo vivo (DI STASI, 1996).

Nas últimas décadas tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes tem sido objeto de incessantes estudos, onde muitas destas substâncias apresentam possibilidades de futuramente, virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO, 1998).

Neste contexto, foram analisados os extratos obtidos a partir das plantas *Bixa orellana* L., *Chamomila recutita* L., *Curcuma longa* L., *Ilex paraguariensis* A.

St.-Hil., *Malva sylvestris* L., *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., *Nasturtium officinale* R. BR., *Plantago major* L. e *Rheum rhaponticum* L., contra a bactéria *H. pylori*.

Bixa orellana L. (urucum) apresenta nas folhas um óleo volátil contendo mono e sesquiterpenos, entre os quais se destaca ishwarano e vários flavonóides. A semente possui um óleo essencial rico em *all*-E-geranilgeraniol, monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, além de carotenóides bixina e norbixina, responsáveis pela cor, e alfa e beta-caroteno em teores mais baixos. É indicada contra doenças coronarianas, afecções do estômago e intestino, afecções respiratórias e queimaduras. (COELHO *et al.*, 2003).

Chamomila recutita L. (camomila) possui em sua constituição fitoquímica flavonóides, dentre os quais destaca-se a apigenina, e os óleos essenciais, que apresentam como principais constituintes o camazuleno, bisabolol, óxido de bisabolol e espatulenol. Além de apresentar propriedades antiinflamatórias e calmantes, é também utilizada no tratamento de cólicas gástricas, enteralgias, gastrites, úlceras, estomatites, laringites e faringites (MAPELI *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2006).

Curcuma longa L. (açafrão), apresenta pigmentos curcuminóides como a curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, além de óleo essencial, constituído por álcoois sesquiterpênicos e cetonas aromáticas, produtos secundários do metabolismo vegetal. A planta é utilizada em alimentos e bebidas, e é indicada como digestivo, carminativo, anti-espasmódico, antioxidante, anti-diarréico, diurético, excitante, nas doenças do fígado, como tônico no tratamento de úlceras, no tratamento de tosses e resfriados comuns e, externamente, como pomada na cicatrização de feridas (ALMEIDA, 2006).

A planta *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., que é consumida na forma de erva-mate verde e mate tostado, apresenta composição química complexa, contendo polifenóis, ácidos fenólicos, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, dos flavonóides rutina, canferol e quercetina, das saponinas triterpênicas derivadas

dos ácidos ursólico e oleanólico e das metilxantinas, cafeína e teobromina. É conhecida por suas propriedades digestivas e estimulantes do sistema nervoso central (SCHUBERT *et al.*, 2006).

Malva sylvestris L. (malva) possui em sua composição mucilagem, taninos, óleos essenciais e flavanóides e é utilizada em infecções, principalmente da garganta, aftas, como antiséptico, antiinflamatório e antiespasmódico (BUFFON *et al.*, 2001; MARTINAZZO e MARTINS, 2004).

O estudo fitoquímico da planta *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (espinheira santa) revela a presença de triterpenos e compostos polifenólicos, como flavonóides e taninos (XAVIER e D'ANGELO, 1996). Suas principais indicações terapêuticas são no tratamento de gastrites, úlceras gástricas e duodenais (REIS e SILVA, 2004).

Nasturtium officinale R. BR (agrião) possui em sua composição química triterpenos, esteróides, flavonóides, fenilpropanóides e saponinas (CARVALHO *et al.*, 2006). É uma planta consumida largamente na alimentação humana e que apresenta ações farmacológicas como antibacteriana, antiescorbútica, colagoga e expectorante (BUFFON *et al.*, 2005).

A planta *Plantago major* L. (tanchagem), além de ser indicada contra má digestão e dispepsia (MARTINAZZO e MARTINS, 2004), possui ação adstringente, cicatrizante, antimicrobiana, antiinflamatória, devido a presença de taninos e mucilagens (suco viscoso que funciona como anti-inflamatório, cicatrizante e protetor das mucosas) (BUFFON *et al.*, 2001).

A planta *Rheum rhaponticum* L. (ruibarbo) sintetiza antraquinonas e taninos, os quais são responsáveis pelos efeitos laxante e adstringente, respectivamente. A planta também é empregada contra diversos distúrbios, principalmente das funções do estômago e fígado (SOUSA *et al.*, 2003).

2.10.2. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais

O homem e os microrganismos partilham uma vida em comum ao longo dos tempos e, desde a pré-história os mesmos provocam doenças no homem. As causas destas doenças começaram a ser descobertas no século XIX, a partir dos experimentos de Louis Pasteur, Robert Koch e seus colaboradores, onde foi demonstrada a origem infecciosa de várias enfermidades. Após o surgimento dos antimicrobianos, nas primeiras décadas do século XX, milhares de novos agentes antimicrobianos foram descobertos, com o objetivo de curar processos infecciosos, e embora a maioria deles mostrou-se muito tóxica para ser aplicada em seres humanos, um número relativamente grande é utilizado na prática médica (BRESSOLIN e CECHINEL FILHO, 2003).

O conhecimento da presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não é um fato recente, a busca dessas substâncias teve grandes impulsos após a década de 1930 (TAVARES, 2002). As plantas são ricas em uma grande variedade de metabólitos secundários, como taninos, terpenóides, alcalóides e flavonóides, que, *in vitro*, demonstram propriedades antimicrobianas (COWAN, 1999).

A grande vantagem das plantas medicinais reside na baixa ou quase inexistência de toxicidade, quando comparados aos antimicrobianos na medicina tradicional (XAVIER *et al.*, 1995). Os agentes antimicrobianos oriundos de plantas podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos clinicamente importantes (CUNICO *et al.*, 2004).

Vários produtos naturais têm demonstrado atividade antimicrobiana contra *H. pylori* (GADHI *et al.*, 2001) e há séculos, medicamentos baseados em plantas têm sido usados tradicionalmente para o tratamento de uma variedade de distúrbios gastrointestinais, como dispepsia, gastrite e doença da úlcera péptica (BORRELI e IZZO, 2000; THOMPSON e ERNST, 2002; MAHADY *et al.*, 2003).

Devido ao alto índice de resistência com relação à terapêutica tradicional utilizada na erradicação de *H. pylori*, métodos alternativos vêm sendo amplamente

estudados com a finalidade de aumentar a eficácia de erradicação da bactéria, fornecendo uma alternativa de tratamento para os pacientes que não erradicaram o microrganismo utilizando as terapias clássicas, sugeridas anteriormente. Além disso, as terapias triplas, em algumas ocasiões causam efeitos adversos, como náuseas, vômito, dor epigástrica, desconforto abdominal e diarreia, provocando a interrupção do tratamento por parte dos pacientes, e o reaparecimento da infecção em alguns pacientes. Por esta razão, é importante procurar novas e efetivas drogas anti-*H. pylori*, sendo as plantas uma fonte lógica de novos compostos (ALVAREZ, 2006).

2.10.3. Métodos para pesquisa de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana referem-se às diferentes técnicas ou métodos laboratoriais utilizados *in vitro* a fim de determinar o potencial antimicrobiano de um determinado agente. Entre os métodos propostos encontram-se os de difusão e diluição.

No método de difusão a substância em pesquisa é colocada num reservatório (disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície), em contato com um meio de cultura sólido, inoculado com um determinado microrganismo. Após o tempo adequado de incubação, mede-se o diâmetro ou halo de inibição – zona clara onde não houve o crescimento microbiano – ao redor da substância em pesquisa (disco, cavidade, cilindro) (BRESSOLIN e CECHINEL FILHO, 2003).

No método de diluição, uma quantidade fixa de amostra a ser testada é dissolvida homogeneamente num meio sólido ou líquido conveniente. Usualmente, são utilizadas diluições da amostra original, a cada uma das quais se inocula o microrganismo em estudo. Através deste método, é possível se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo. A leitura dos resultados é feita após um período

variado de incubação, que se toma em consideração o primeiro tubo, ou placa, onde não há crescimento microbiano (BARON e FINEGOLD, 1990).

Este método tem a vantagem de ser quantitativo e pode ser usado tanto para amostra solúvel em água, quanto lipossolúvel e como desvantagem, o fato de ser excessivamente trabalhoso, além do elevado consumo de material (BARON e FINEGOLD, 1990). Para melhor adequação do microrganismo e do produto a ser testado, algumas alterações têm sido feitas nesta técnica (CLARKE *et al.*, 2001).

A forma que o produto natural é dissolvido ou diluído, antes de ser testado, depende da metodologia a ser empregada. Assim, no caso em que o solvente mantém o contato com a bactéria em estudo, como na técnica de diluição em ágar, deve ser utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) por apresentar menor toxicidade e na técnica de disco difusão, onde o solvente é evaporado antes do contato do produto natural com a bactéria, podem ser utilizados aqueles que forem mais adequados à dissolução do produto (VALGAS, 2002).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA E AMOSTRAS

Foram incluídos neste estudo 81 pacientes que apresentaram suspeita clínica de gastrite, úlcera péptica ou outros sintomas dispépticos e que procuraram o Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR) na cidade de Curitiba - PR, e de 14 pacientes que foram atendidos na Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco de Bragança Paulista - SP (USF).

Dentre os pacientes do HC-UFPR, 18 eram do sexo masculino e 65 do sexo feminino, com idades variando entre 20 e 80 anos (média de 47 anos).

O presente trabalho foi submetido aos comitês de ética do Hospital São Francisco e do HC-UFPR e aprovado por eles (ANEXO I). Foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), assinado pelo paciente e/ou pelo responsável legal, anteriormente à coleta (ANEXO II). Caso o paciente fosse incapaz de ler e/ou de fornecer o consentimento por escrito, esse era assinado por uma testemunha. Os pacientes incluídos no estudo foram devidamente esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos, assim como sobre os efeitos esperados, possíveis benefícios, desvantagens, e sobre quaisquer riscos em potencial.

As biópsias gastroduodenais dos pacientes atendidos no HC-UFPR foram obtidas através de endoscopia digestiva alta, sendo coletadas uma biópsia da região do corpo e outra do antro gástrico para cada paciente incluído no estudo. Em seguida, cada uma destas amostras foram transferidas imediatamente para um tubo contendo 0,5 mL de caldo tioglicolato e mantidas a 4°C, onde permaneceram por um período máximo de 5 horas (QUEIROZ *et al.*, 1987), tempo necessário para seu transporte ao Laboratório de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR e posterior processamento.

As amostras provenientes dos pacientes atendidos na UNIFAG foram coletadas de maneira semelhante ao Serviço de Endoscopia do HC-UFPR e após

o isolamento e identificação do *H. pylori*, as linhagens permaneceram armazenadas a -80°C, até o momento do uso no Banco de linhagens do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da instituição.

Para caracterização molecular dos genes de virulência e determinação da prevalência foram utilizadas as amostras coletadas dos pacientes atendidos no HC-UFPR e para a determinação da atividade anti-*Helicobacter* dos extratos de plantas, as amostras obtidas na UNIFAG. O diagrama em anexo (ANEXO III) representa esquematicamente os procedimentos iniciais acima descritos.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Semeadura das amostras

As amostras foram maceradas com auxílio de alça bacteriológica e semeadas em placas de cultivo contendo ágar BHI (Difco) acrescido de sangue de carneiro desfibrinado a 10%, anfotericina B (10mg/L), vancomicina (10mg/L), ácido nalidíxico (20 mg/L), com ou sem cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) (40 mg/L) (QUEIROZ *et al.*, 1987). As placas foram então incubadas em estufas bacteriológicas a 37° C e em condição de microaerofilia, que compreende 5-10% de CO₂, 80-90% de N₂ e 5-10% de O₂ (MURRAY *et al.*, 2003; OWEN *et al.*, 2003), durante 7 dias (PORTORREAL e KAWAKAMI, 2002).

3.2.2. Identificação bacteriana

As colônias que cresceram no meio seletivo foram submetidas à coloração de Gram e provas bioquímicas complementares. O microrganismo foi identificado como *H. pylori* se apresentasse no ágar colônias pequenas, circulares e translúcidas no ágar sem corante (PORTORREAL e KAWAKAMI, 2002), ou com aspecto dourado no ágar acrescido de TTC (QUEIROZ *et al.*, 1987), além de morfologia celular típica de bacilo gram-negativo curvo ou espiralado, após a

coloração de Gram, seguido dos testes positivos para catalase, oxidase e urease (LOIVUKENE *et al.*, 2002).

A atividade da catalase foi analisada através da transferência da colônia bacteriana para uma placa de vidro e, em seguida, adicionado 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. Na presença da enzima catalase ocorreria a liberação de O₂, verificada pelo aparecimento imediato de bolhas.

O teste da oxidase foi realizado friccionando a colônia em estudo em uma tira de papel impregnada com o reativo tetrametil-p-fenilenodiamina, um acceptor artificial de elétrons. A oxidação deste é verificada pela aparição da cor azul no papel (MAZA *et al.*, 2004).

Para o teste da urease, foi utilizado um tubo contendo ágar uréia (uréia 10% e vermelho de fenol a 0,12%), e incubado a 37°C. Na presença da urease, a uréia do meio é degradada em amônia, alterando o pH do meio, com a mudança de cor pela presença do indicador vermelho de fenol, passando de amarelo ao rosa.

3.2.3. Criopreservação e reativação

Após a observação do crescimento de colônias nas placas contendo ágar seletivo e procedida a identificação bacteriana, parte do crescimento foi removido com *swab* estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 500 µL de água quimicamente pura. A suspensão foi centrifugada a 6.000 g por 5 minutos e posteriormente, o sobrenadante descartado. O *pellet* foi mantido em *freezer* a -80° C, até ser realizada a extração do DNA (ASHOUR *et al.*, 2002).

Para conservação das amostras bacterianas sem perda de viabilidade, as mesmas foram suspensas em criotubos contendo uma solução de caldo Brucella (Conda) e 30% de glicerol (Merck). Em seguida, os tubos foram armazenados em freezer, a -80°C, para posteriores testes complementares a serem realizados em conjunto.

A reativação dos isolados de *H. pylori* criopreservados foi feita inoculando 50 µL de cada estoque bacteriano em placa contendo ágar Columbia (Merck) adicionado de 10% de sangue de carneiro desfibrinado, anfotericina B (10mg/L),

vancomicina (10mg/L), ácido nalidíxico (20 mg/L) e cloreto de trifetil tetrazolium (40 mg/L). As placas foram então incubadas a 37° C, em condição de microaerofilia, com umidade relativa, por um período de 48 a 72 horas. Passado este tempo, foram adicionadas às placas com crescimento 100 µL de caldo Brucella, sendo o cultivo espalhado com alça de Drigalski e, novamente reincubadas nas mesmas condições acima descritas durante 48 a 72 horas. Este procedimento foi realizado com o objetivo de se obter um maior número de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.2.4. Análise da atividade antimicrobiana dos Extratos de Plantas

Os extratos fluidos obtidos a partir das plantas *Bixa orellana* L. (urucum), *Chamomila recutita* L. (camomila), *Curcuma longa* L. (açafrão), *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (erva-mate verde e mate tostado), *Malva sylvestris* L. (malva), *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (espinheira santa), *Nasturtium officinale* R. BR (agrião), *Plantago major* L. (tanchagem) e *Rheum rhaponticum* L. (ruibarbo) utilizados na pesquisa foram produzidos segundo a Farmacopéia Brasileira (2000) e estão representados na Tabela I.

Para a fase posterior, todos os extratos foram ajustados a uma concentração de 100 mg/mL (solução estoque) com água destilada estéril e armazenados, a fim de serem utilizados nos testes de disco difusão.

TABELA I – CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS DE PLANTAS UTILIZADOS NA TRIAGEM INICIAL PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori*

NOME CIENTÍFICO	FAMÍLIA	NOME USUAL	PARTE DA PLANTA	CONC. (g/mL)*
<i>Bixa orellana</i> L.	<i>Bixaceae</i>	Urucum	Semente	0,939
<i>Chamomila recutita</i> L.	<i>Asteraceae</i>	camomila	Inflorescência	0,910
<i>Curcuma longa</i> L.	<i>Zingiberaceae</i>	Açafrão	Rizoma	0,888
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	<i>Aquifoliaceae</i>	erva-mate verde	Folhas	0,2
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	<i>Aquifoliaceae</i>	Mate tostado	Folhas	0,2
<i>Malva sylvestris</i> L.	<i>Malvaceae</i>	Malva	Inflorescência e folhas	0,895
<i>Maytenus ilicifolia</i> (Schrad.) Planch.	<i>Celastraceae</i>	espinheira santa	Folhas	0,907
<i>Nasturtium officinale</i> R. BR	<i>Brassicaceae</i>	agrião	Folhas e talos	0,931
<i>Plantago major</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	tanchagem	Partes aéreas	0,900
<i>Rheum rhaponticum</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	ruibarbo	Raiz	0,938

NOTA: * Concentração inicial do extrato em g/mL

3.2.4.1. Teste de Disco Difusão

O teste de disco difusão foi utilizado como método de triagem para análise da suscetibilidade dos diferentes extratos de plantas contidos na TABELA I (NOSTRO *et al.*, 2005). Duas linhagens referência de *H. pylori*, que já tiveram seu genoma completamente seqüenciado, as cepas 26695 e a J99, foram usadas nesta fase.

As cepas acima citadas foram transferidas para 2 tubos contendo aproximadamente 2 mL de soro fisiológico estéril e os inóculos foram ajustados a uma concentração bacteriana de acordo com o tubo 2 de McFarland, que corresponde a aproximadamente $6,0 \times 10^8$ UFC/mL. Imediatamente após, 100 μ L das suspensões bacterianas foram espalhadas, com auxílio de alça de Drigalski, nas superfícies de placas contendo ágar Mueller Hinton (Merck) com 10% de sangue de carneiro desfibrinado.

Em seguida, discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro (Newprov) foram impregnados com 50 μ L de cada solução estoque (100 mg/mL), que corresponde a uma concentração de 5 mg, e após a secagem foram transferidos para a superfície do ágar inoculado. Como controle negativo foi utilizado um disco contendo etanol. As placas foram, então, incubadas em microaerofilia, a 37°C e observadas após 3 a 5 dias.

Os testes foram realizados em triplicata e a atividade antimicrobiana foi expressa pela presença de um halo de inibição produzido ao redor dos discos impregnado com os extratos de plantas testados, o qual foi determinado em milímetros através da utilização de um halômetro.

3.2.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extratos que apresentaram os melhores resultados no teste de disco difusão, foram separados para realização da concentração inibitória mínima através do método da diluição em ágar (STAMATIS *et al.*, 2003). Além das cepas

referência de *H. pylori* 26695 e J99, foram testados 14 isolados clínicos provenientes de pacientes atendidos na UNIFAG - USF.

Cada extrato foi diluído a uma concentração inicial de 100 mg/mL (solução estoque) com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que a concentração final desta substância no meio não excedeu a 1% (LI *et al.*, 2005). Em seguida, para cada solução estoque, foram realizadas diluições seriadas sucessivas, com água destilada estéril e 1 mL de cada diluição foi incorporada a 19 mL de ágar Mueller Hinton com 10% de sangue de carneiro desfibrinado e transferido para uma placa de Petri. As concentrações finais dos extratos no meio de cultura variaram de 5,0 a 0,625 mg/mL.

As bactérias foram, então, transferidas para tubos contendo aproximadamente 2 mL de soro fisiológico estéril e a densidade corrigida para aproximadamente $6,0 \times 10^8$ UFC/mL, através da comparação com o tubo 2 da escala de McFarland. Cerca de 1 μ L destas suspensões foram inoculadas nas superfícies das placas através de um replicador e incubadas a 37°C em atmosfera de microaerofila durante 72 horas.

Completado este período, procede-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que se define como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento bacteriano. Ou seja, a menor concentração do extrato que revela ausência de crescimento bacteriano e quanto menor a concentração inibitória mínima do extrato testado, melhor a atividade antimicrobiana.

Todos os testes de CIM foram realizados em triplicata, além de serem realizados dois controles de crescimento, com DMSO e etanol.

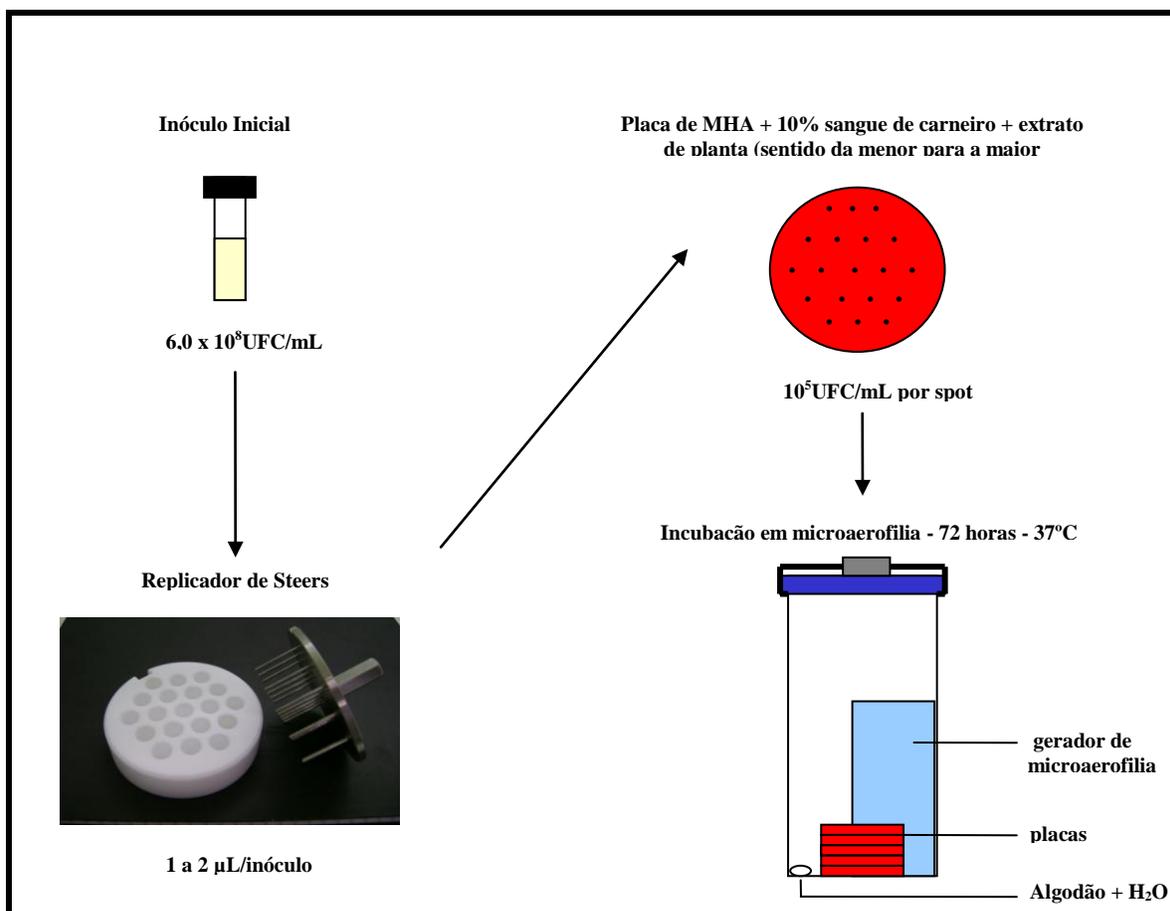


FIGURA 3 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR
 FONTE: O AUTOR

3.2.5. Extração de DNA

Foram adicionados 300 µL de solução tampão de digestão (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; EDTA e Tween 0,5%) a cada criotubo contendo os *pellets* bacterianos de *H. pylori*, sendo posteriormente misturados por inversão e incubados *overnight* a 37°C. No dia seguinte, foram adicionados 400 µL de solução PCI (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico - 25:24:1) e os tubos foram misturados por inversão durante 1 minuto. Em seguida, foram centrifugados a 13.000 rpm durante 5 minutos, sendo os sobrenadantes transferidos para outros tubos onde foram acrescentados 400 µL de solução PI (clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1), novamente misturados por inversão durante 1 minuto e centrifugados a 13.000

rpm durante 5 minutos, sendo os sobrenadantes transferidos para novos tubos e repetindo-se a extração com Cl. Depois de realizada a extração, se adicionou 600 µl de isopropanol e 100 µL de acetato de sódio (NaAc 3M) em cada tubo e os mesmos foram transferidos por 2 horas para um freezer a -20°C, a fim de produzir a precipitação do DNA. Após este procedimento, misturou-se suavemente os tubos e os centrifugou durante 5 minutos a 13.000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados com 250 µL de etanol 70° gelado a -20°C. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, sendo os sobrenadantes descartados. Os tubos foram incubados durante 15 minutos a 37°C, com as tampas abertas, para evaporação do álcool. O material genético foi dissolvido com 150 µL de água bidestilada estéril.

Para verificar a eficiência da técnica de extração de DNA acima especificada, o produto obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Aliquotas de 5 µL deste material foram misturadas a 3,0 µL de uma solução contendo azul de bromotimol 0,25% e glicerol a 40% e as mesmas foram aplicadas no gel.

A corrida eletroforética foi realizada com tampão TBE 1X (Tris-HCl 89mM; ácido bórico 89mM; EDTA 2mM pH 8.0) e submetida a uma diferença de potencial de 80V a 100V/110 mA (5V/cm), durante 30 minutos. Depois de transcorrido este tempo, o gel foi retirado da cuba e transferido para ser corado em um recipiente contendo brometo de etídeo (5 µg/mL) durante 20 minutos a temperatura ambiente, sendo visualizado em transiluminador de luz ultravioleta de onda curta.

3.2.6. Amplificação dos genes de virulência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os genes de virulência *cagA*, *vacA* (alelos s1, s2, m1, m2) e *napA* dos isolados clínicos, obtidos de pacientes provenientes do HC-UFPR, foram amplificados por meio de reação de PCR, com um volume final de 50 µL, contendo 2,5 µL de DNA genômico, 20 µmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 1,5%

de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase e tampão de reação para a enzima. As características dos ciclos e *primers* específicos para cada um dos genes pesquisados estão representados no Quadro I e Tabela II, respectivamente.

Genes	Etapa Inicial		Fases dos Ciclos (n=35)						Etapa Final	
	Desnaturação		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão	
	Tempo (min)	Temp. (°C)	Tempo (min)	Temp. (°C)	Tempo (min)	Temp. (°C)	Tempo (min)	Temp. (°C)	Tempo (min)	Temp. (°C)
<i>napA</i>	5	94	0,45	94	0,45	60	0,45	72	7	72
<i>cagA</i>						65				
<i>vacA s</i>						52				
<i>vacA m</i>						52				

QUADRO I - PROGRAMAS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS PARA OS DIFERENTES GENES PESQUISADOS.

NOTA: minuto (min); °C (graus centígrados); temp. (temperatura).

TABELA II – GENES INVESTIGADOS, SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIALIZADORES E PRODUTO ESPERADO NA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO.

GENES	SEQÜÊNCIA (5' →3')	PRODUTO DA PCR (pb)	REFERÊNCIA
<i>napA</i>	TGCAAGCGGATGCGATCGTGTT	390	EVANS et al., 1995
<i>napA</i>	GCAACTTGGCCAATTGATCGTCCGC		
<i>cagA</i>	ATAATGCTAAATTAGACAACCTGAGCGA	297	COVACCI et al., 1993
<i>cagA</i>	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCA		
<i>vacA</i> s1/s2	ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286	ATHERTON et al., 1995
<i>vacA</i> s1/s2	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacA</i> m1	GGTCAAATGCGGTCATGG	290	
<i>vacA</i> m1	CCATTGGTACCTGTAGAAAC		
<i>vacA</i> m2	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352	TUMMURU et al., 1993
<i>vacA</i> m2	CATAACTAGCGCCTTGAC		

NOTA: pares de bases (pb)

Todos os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. Uma alíquota de 5 µL de cada produto amplificado foi misturada com 3 µL de uma solução contendo azul de bromofenol 0,25%, glicerol 40% e aplicadas no gel. Para análise do produto de amplificação da PCR, foi utilizado marcador molecular de 100 pares de bases. A concentração do gel e o tempo da corrida variaram de acordo com o produto da reação obtido. Assim, para o *napA* e alelos do *vacA*, a concentração utilizada foi de 2% e do *cagA* 1,5%. O tempo de

corrida variou de 40 minutos para o *napA* e *cagA* e 60 minutos para o *vacA*. Todas as corridas eletroforéticas foram preparadas com uma diferença de potencial de 100 V e 110 mA. Decorrido o tempo estipulado, cada gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5 µg/mL) por 20 minutos, a temperatura ambiente e visualizado em transiluminador de luz UV de onda curta.

3.2.7. Métodos estatísticos

Para análise estatística dos resultados, quando necessário, foi utilizado o método estatístico de correlação de Pearson e o teste do Qui-quadrado, com 1 grau de liberdade.

4. RESULTADOS

As culturas de biópsia gástrica que apresentaram crescimento bacteriano em ágar seletivo e, posteriormente, apresentaram características morfotinturiais de bacilos gram-negativos curvos, provas da catalase, urease e oxidase positivas, foram identificadas como *H. pylori* e inseridas no trabalho. As figuras 4 e 5 representam a característica morfológica e as provas utilizadas na identificação laboratorial dos isolados clínicos de *H. pylori*, respectivamente.



FIGURA 4 - CARACTERIZAÇÃO MORFOTINTURIAL DO *H. pylori* ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DE GRAM

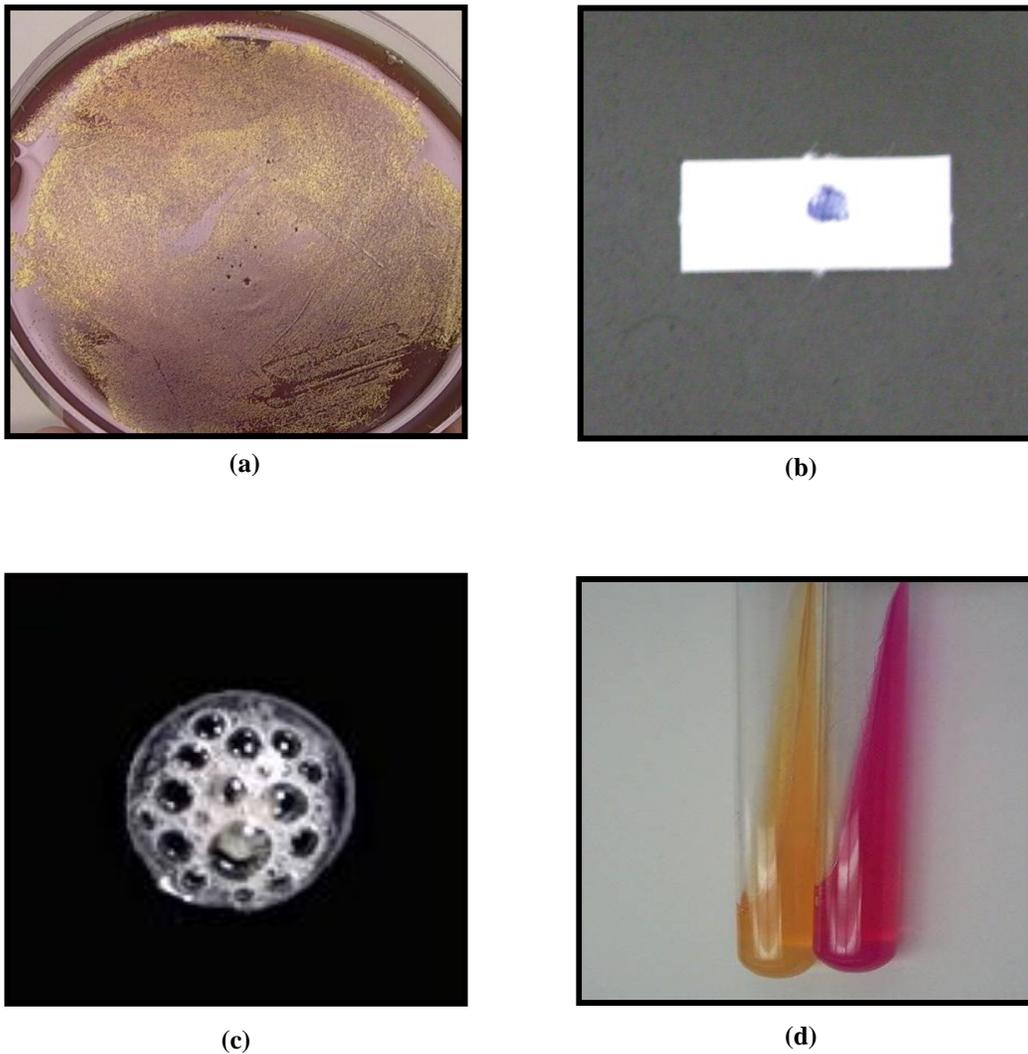


FIGURA 5 - PROVAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *H. pylori*

LEGENDA: (a) - MORFOLOGIA COLONIAL DE *H. pylori* EM MEIO SELETIVO COM TTC; (b) - PROVA DA OXIDASE POSITIVA; (c) - PROVA DA CATALASE POSITIVA; (d) - PROVA DA UREASE EM ÁGAR INCLINADO: NÃO INOCULADO (ESQUERDA) E PROVA POSITIVA (DIREITA).

4.1. TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FITOTERÁPICOS

A Figura 6 representa um exemplo da técnica de disco difusão, realizada como triagem inicial na análise da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de plantas contra as cepas *H. pylori* J99 e 26695, onde se observa uma inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos impregnados com os extratos testados.

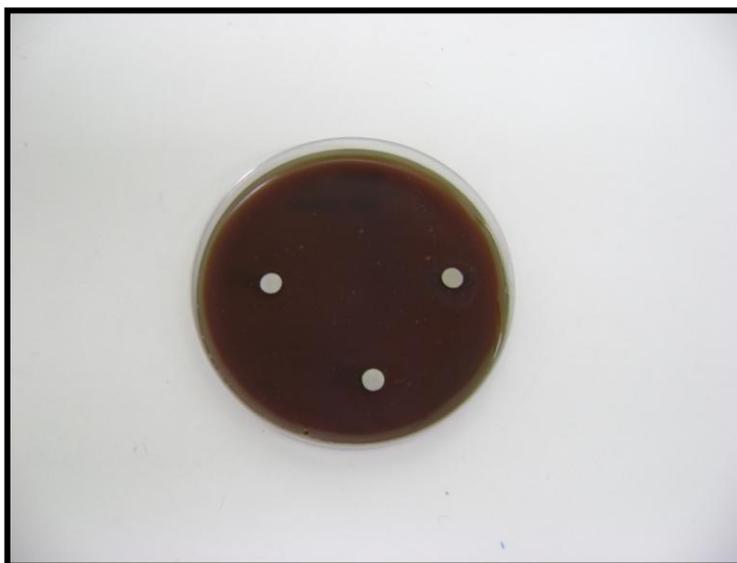


FIGURA 6 – TÉCNICA DE DISCO DIFUSÃO PARA PESQUISA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA UTILIZANDO DISCOS IMPREGNADOS COM OS DIFERENTES EXTRATOS DE PLANTAS TESTADOS.

Os resultados das médias dos diâmetros obtidos na técnica qualitativa de disco difusão, realizada em triplicata, estão apresentados no Quadro II.

EXTRATO	MÉDIA DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO* (mm)	
	<i>H. pylori</i> J99	<i>H. pylori</i> 26695
<i>Bixa orellana</i> L.	7	10
<i>Chamomila recutita</i> L.	10	11
<i>Curcuma longa</i> L.	< 6	< 6
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	9	10
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	9	9
<i>Malva sylvestris</i> L.	10	8
<i>Maytenus ilicifolia</i> (Schrad.) Planch.	8	7
<i>Nasturtium officinale</i> R. BR	7	< 6
<i>Plantago major</i> L.	< 6	< 6
<i>Rheum rhaponticum</i> L.	< 6	< 6

QUADRO II - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO DOS EXTRATOS DE PLANTAS PARA AS LINHAGENS *H. pylori* 26695 e J99.

NOTA: * Concentração de cada extrato no disco = 5 mg/disco; milímetros (mm).

De acordo com os dados demonstrados na tabela acima, os extratos que apresentaram melhor atividade anti-*Helicobacter* foram os obtidos a partir das plantas *Bixa orellana*, *Malva sylvestris*, *Chamomilla recutita* e *Ilex paraguariensis* (erva-mate verde e mate tostado). Estes extratos foram utilizados para determinação da concentração inibitória mínima, através da técnica quantitativa de diluição em ágar (FIGURA 7).

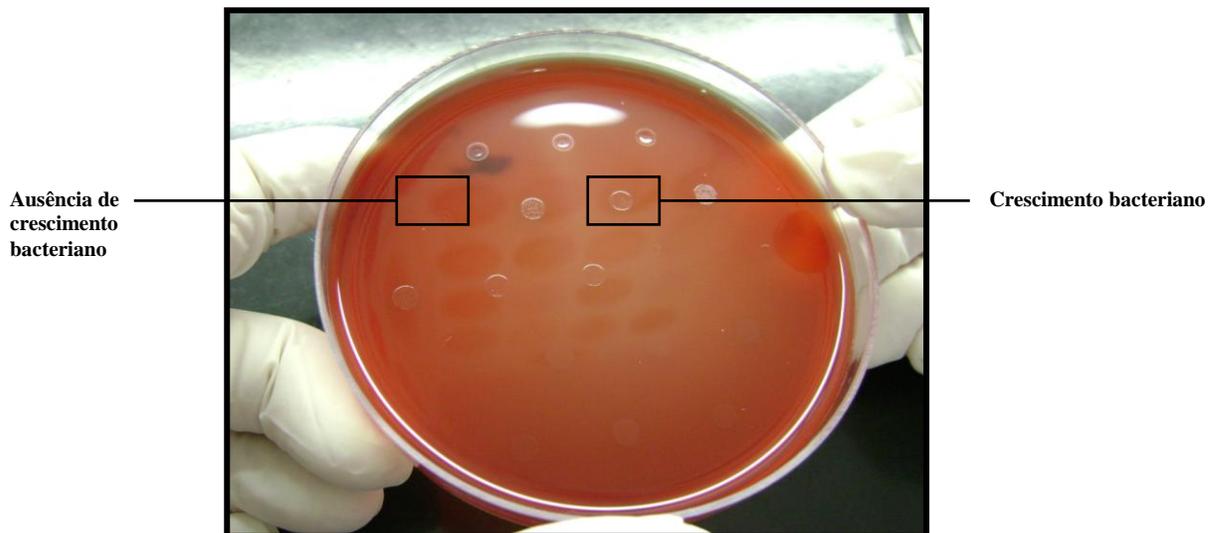


FIGURA 7 – TÉCNICA DA DILUIÇÃO EM ÁGAR UTILIZANDO REPLICADOR DE STEERS.

A figura acima demonstra o crescimento das linhagens de *H. pylori* testadas pela técnica de diluição em ágar utilizando o replicador de Steers. Pode-se observar linhagens do microrganismo que conseguiram se desenvolver na placa de cultura contendo o extrato de planta e outras que não apresentaram crescimento.

Os resultados obtidos na técnica de diluição em ágar estão contidos no Quadro III.

EXTRATO DE PLANTA	AMOSTRAS DE <i>H. pylori</i>															
	84	646	667	660	BH27	446	650	118	99	713	132	652	39 F	BH13	26695	J99
<i>Bixa orellana</i>	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,0	1,25	1,25	> 5,0	< 0,625	> 5,0	> 5,0	> 5,0	< 0,625	1,25	> 5,0	< 0,625	< 0,625
<i>Chamomilla recutita</i>	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,0	< 0,625	< 0,625	> 5,0	< 0,625	> 5,0	< 0,625	< 0,625	< 0,625	< 0,625	> 5,0	< 0,625	< 0,625
<i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate)	5,0	> 5,0	5,0	5,0	< 0,625	< 0,625	5,0	< 0,625	5,0	2,5	< 0,625	< 0,625	< 0,625	> 5,0	< 0,625	< 0,625
<i>Ilex paraguariensis</i> (mate tostado)	1,25	> 5,0	5,0	1,25	< 0,625	2,5	< 0,625	< 0,625	5,0	5,0	2,5	2,5	< 0,625	> 5,0	< 0,625	2,5
<i>Malva sylvestris</i>	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,0	> 5,0	0,625	> 5,0	2,5	5,0	2,5	> 5,0	> 5,0	< 0,625	1,25

QUADRO III - RESULTADOS OBTIDOS DAS CIM (mg/mL) DOS EXTRATOS DE PLANTAS CONTRA OS ISOLADOS CLÍNICOS DE *H. pylori* E LINHAGENS REFERÊNCIA J99 E 26695.

De acordo com o quadro acima, o extrato de *Bixa orellana* foi capaz de inibir o crescimento de 5 isolados clínicos de *H. pylori* apresentando CIM inferiores a 5 mg/mL, além das cepas referência J99 e 26695. O extrato de *Chamomilla recutita* conseguiu inibir o crescimento de 7 isolados clínicos e das duas linhagens referência, todas com CIM inferiores a 0,625 mg/mL. O extrato de *Ilex paraguariensis* (variedade erva-mate verde) apresentou apenas 2 isolados clínicos com CIM superior a 5,0 mg/mL, sendo que os 12 isolados clínicos e as duas linhagens referência apresentaram CIM inferiores a 5,0 mg/mL em concentrações variadas, os mesmos resultados foram encontrados para o extrato de *Ilex paraguariensis* (variedade mate tostado). O extrato de *Malva sylvestris* conseguiu inibir 4 isolados clínicos com CIM variadas e inferiores a 5,0 mg/mL, bem como as linhagens referência J99 e 26695.

Os gráficos a seguir representam separadamente os dados obtidos na técnica de diluição em ágar para cada extrato de planta testado contra os isolado clínicos de *H. pylori* e linhagens referência .

GRÁFICO 1 – VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE *Bixa orellana* CONTRA AS CEPAS DE *H. pylori*.

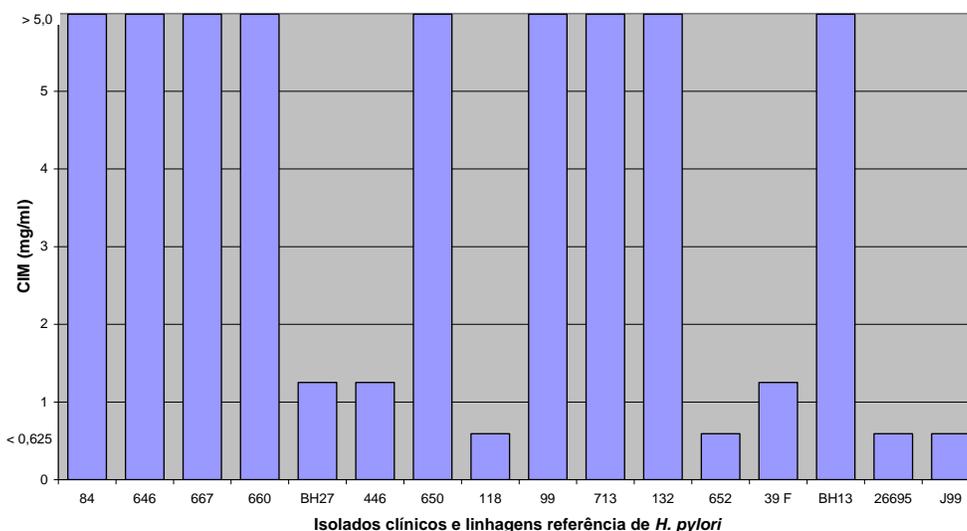


GRÁFICO 2 – VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR
 PARA O EXTRATO DE *Chamomilla recutita* CONTRA AS CEPAS DE *H. pylori*.

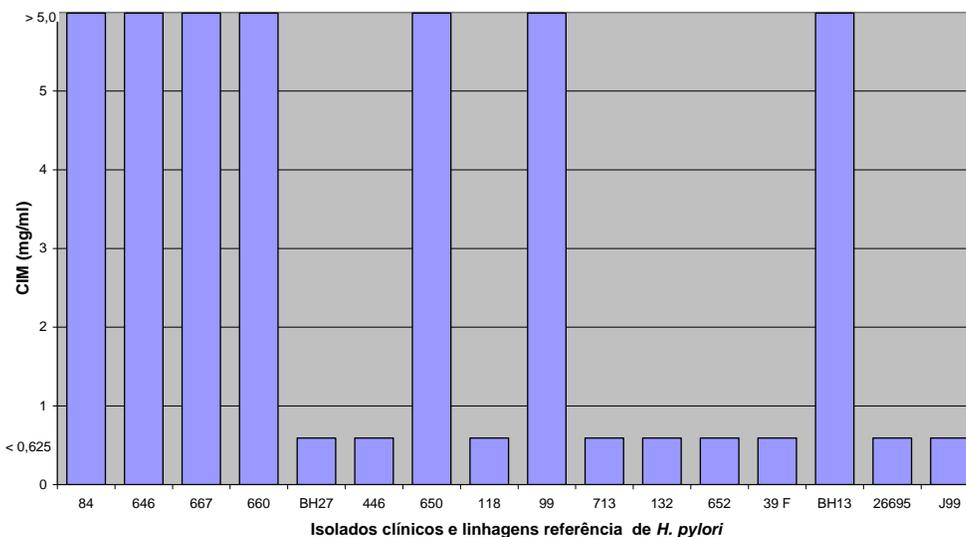


GRÁFICO 3 – VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR
 PARA O EXTRATO DE *Ilex paraguariensis* (VARIEDADE ERVA-MATE VERDE)
 CONTRA AS CEPAS DE *H. pylori*.

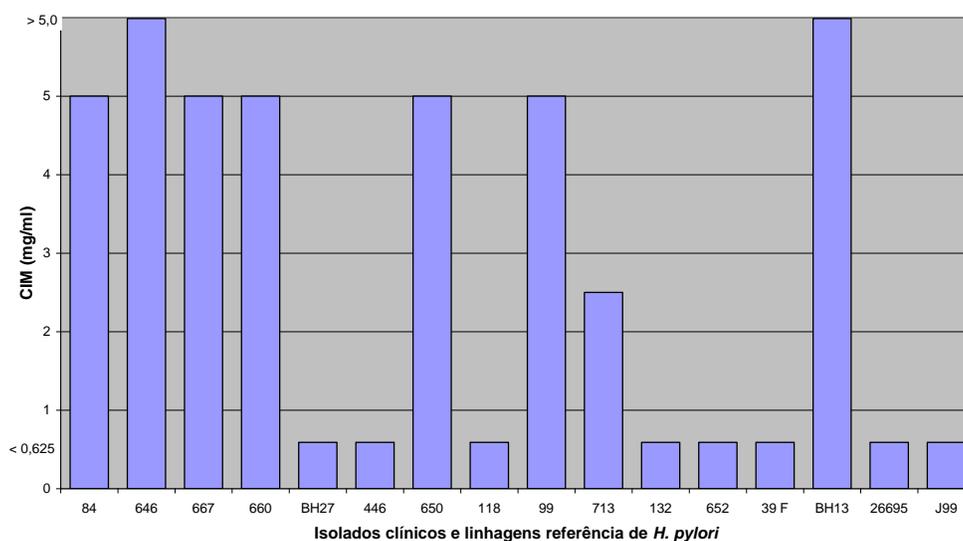


GRÁFICO 4 – VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE *Ilex paraguariensis* (VARIEDADE MATE TOSTADO) CONTRA AS CEPAS DE *H. pylori*.

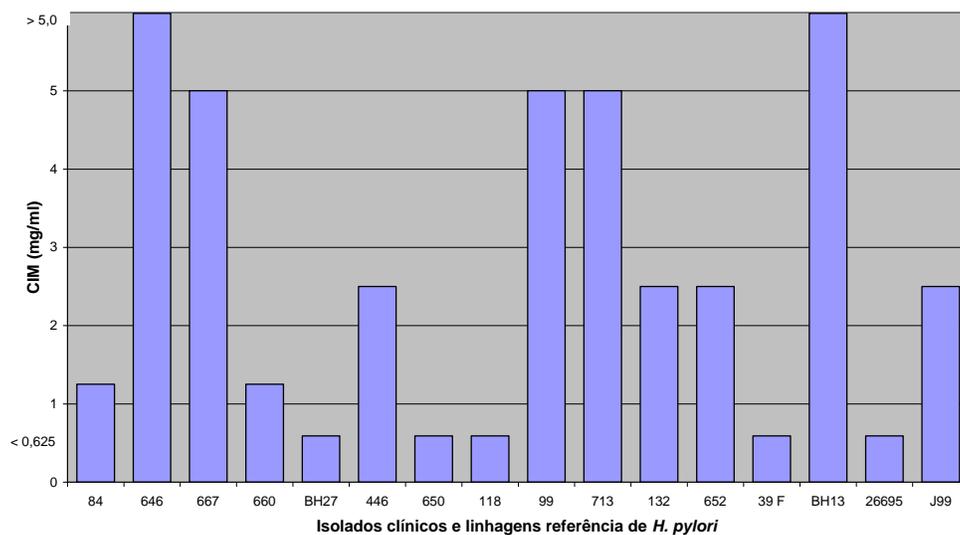
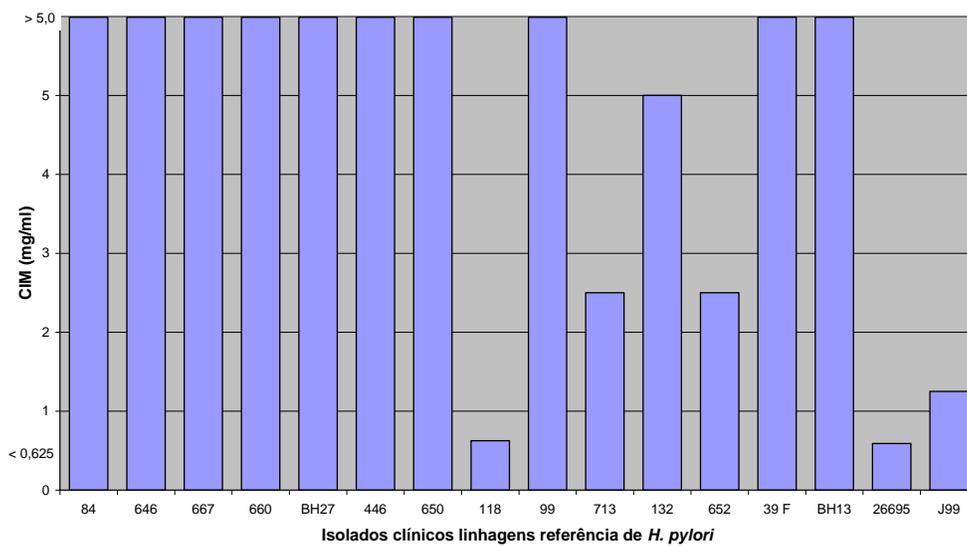
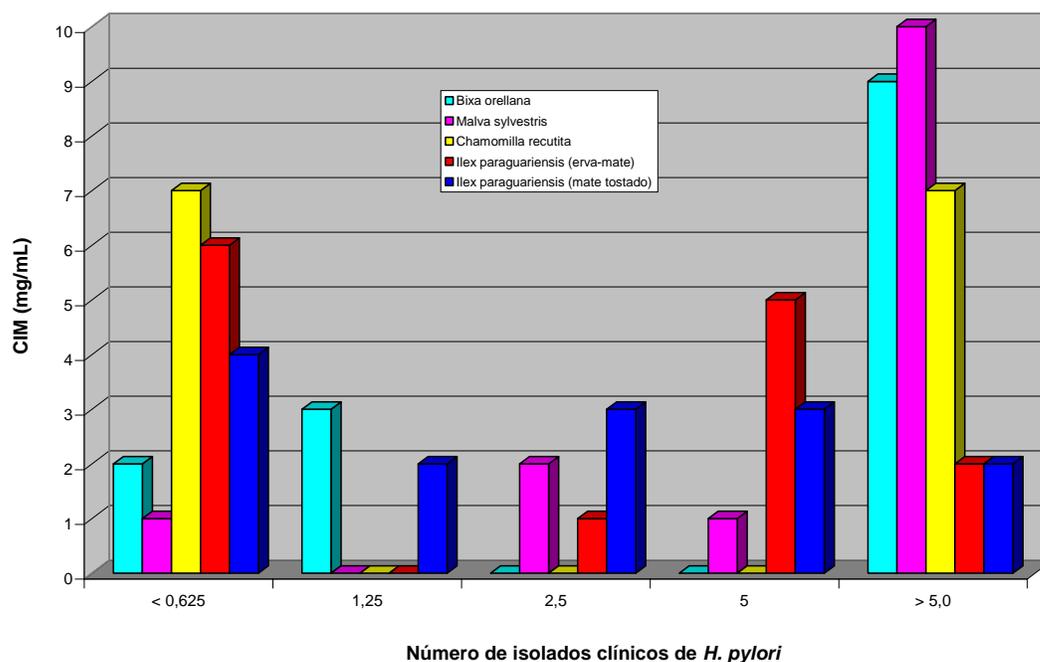


GRÁFICO 5 – VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA O EXTRATO DE *Malva sylvestris* CONTRA AS CEPAS DE *H. pylori*.



O gráfico a seguir contém as diferentes CIM obtidas na técnica de diluição em ágar para os extratos fluidos de *Bixa orellana*, *Malva sylvestris*, *Chamomilla recutita* e *Ilex paraguariensis* (variedades erva-mate verde e mate tostado) contra os isolados clínicos de *H. pylori*.

GRÁFICO 6 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS E VALORES DAS CIM OBTIDOS NA TÉCNICA DE DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA OS EXTRATOS DE *B. orellana*, *M. sylvestris*, *Chamomilla recutita* E *I. paraguariensis* (VARIEDADES ERVA-MATE VERDE E MATE TOSTADO) CONTRA OS ISOLADOS CLÍNICOS DE *H. pylori*.



Segundo o gráfico acima, o extrato que apresentou o maior número de isolados de *H. pylori* com CIM inferior a 5,0 mg/mL foi obtido a partir da planta *Ilex paraguariensis*, tanto na variedade erva-mate verde como o mate tostado conseguiram inibir 12 das 14 cepas testadas. O extrato de *Chamomilla recutita* inibiu 7 isolados clínicos com CIM inferiores a 0,625mg/mL e 7 com CIM

superiores a 5,0 mg/mL. O extrato de *Bixa orellana* inibiu 2 isolados clínicos de *H. pylori* com CIM inferiores a 0,625mg/mL e 3 com CIM de 1,25 mg/mL, sendo que o restante dos isolados (9) apresentaram CIM superiores a 5,0 mg/mL. O extrato de *Malva sylvestris* inibiu 4 isolados clínicos: uma com CIM inferior a 0,625mg/mL, duas com CIM de 2,5mg/mL e uma com CIM de 5,0 mg/mL, sendo que os 10 restantes apresentaram CIM superior a 5,0 mg/mL.

4.2. OCORRÊNCIA DAS INFECÇÕES

Dos 81 pacientes atendidos no HC-UFPR, 42 (51,9%) apresentaram cultura positiva para *H. pylori*, sendo que em 3 pacientes (7,1%) houve crescimento apenas na biópsia proveniente do corpo, em 6 (14,3%) na do antro e em 33 (78,6%) houve crescimento em ambas as biópsias cultivadas.

A ocorrência do microrganismo ficou distribuída, de acordo com a idade, conforme a seguir: 20-29 anos 25% (2/8); 30-49 anos 51,7% (15/29); 50-80 anos 56,8% (25/44), demonstrando haver uma forte correlação entre a idade e a presença de microrganismo ($p < 0,0003$).

Entre os 18 pacientes do sexo masculino analisados, 9 apresentaram cultura positiva para *H. pylori* e dos 63 pacientes do sexo feminino, 31 estavam infectadas pelo microrganismo, caracterizando não existir evidências de que o sexo do paciente e a presença do *H. pylori* estejam associados ($p = 0,9526$).

4.3. DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

Os principais fatores de virulência das linhagens de *H. pylori* isolados de pacientes da região de Curitiba - Paraná foram determinados através da técnica de PCR. Os genes estudados foram *vacA*, *cagA* e *napA*.

Ao realizar os tipos alélicos do gene *vacA* em 42 amostras, foi detectada a presença de 3 (7,7%) contendo mais de um tipo alélico na mesma amostra, sendo então, consideradas como infecções múltiplas. Estas não foram utilizadas nas análises estatísticas deste trabalho, restando assim, 39 isolados bacterianos.

Os genes *napA* e *cagA* foram encontrado em 100% e 92,3 % das amostras, respectivamente.

As taxas obtidas do subtipo s1 e s2 do *vacA* foram de 58% e 42%, respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados para os subtipos m1 (58%) e m2 (42%). Para a associação em mosaico dos tipos s e m, obteve-se porcentagens de 56,2% (s1m1), 2,1% (s1m2), 2,1% (s2m1) e 39,6% (s2m2) para os diferentes genótipos.

A comparação dos genótipos de *vacA* e *cagA* com as principais doenças encontradas neste trabalho, ou seja, gastrite, úlcera péptica e esofagite, encontra-se na Tabela III.

TABELA III - GENÓTIPOS DO *vacA* E *cagA* DE PACIENTES DE ACORDO COM AS PRINCIPAIS PATOLOGIAS.

GENÓTIPO	GT n (%)	UP N (%)	GERD n (%)
<i>cagA</i>			
<i>cagA</i> +	12 (85,7 %)	2 (100 %)	6 (100 %)
<i>cagA</i> -	2 (14,3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>vacA</i>			
s1	8 (57,1%)	2 (100%)	4 (66,7 %)
s2	6 (42,9%)	0 (0%)	2 (33,3 %)
m1	10 (71,4 %)	2 (100%)	4 (66,7 %)
m2	4 (28,6 %)	0 (0%)	2 (33,3 %)
s1m1	8 (57,1%)	2 (100%)	4 (66,7 %)
s1m2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
s2m2	5 (35,7%)	0 (0%)	2 (33,3%)
s2m1	1 (7,2 %)	0 (0%)	0 (0%)
Total	14	2	6

NOTA: gastrite (GT); úlcera péptica (UP); esofagite (GERD).

5. DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FITOTERÁPICOS

H. pylori tem sido associado a várias desordens do trato gastrointestinal, tais como gastrite crônica, doença da úlcera péptica e câncer gástrico (GADHI *et al.*, 2000), e sabe-se que o mesmo pode ser erradicado com uma combinação de agentes terapêuticos, como agentes antimicrobianos, sais de bismuto e inibidores de bomba protônica. Entretanto, além de causar efeitos colaterais, nem sempre a cura é alcançada (STAMATIS *et al.*, 2003).

O incremento do uso de antibióticos na medicina humana e veterinária, na agricultura, na preservação de alimentos, na suplementação de rações de aves e de outros animais tem ocasionado os conhecidos problemas de resistência microbiana (VALGAS, 2002). Assim, um agente natural não antibiótico, o qual seja eficaz e livre de efeitos colaterais pode ser de grande importância no auxílio à terapia de erradicação do *H. pylori*.

A escolha das plantas a serem utilizadas para análise nem sempre é uma tarefa fácil, devido à grande variedade de espécies existentes. Porém, a mesma pode ser orientada, levando-se em conta as informações da medicina popular. Outros aspectos importantes que devem ser levados em consideração são as informações botânicas e químico-taxonômicas (BRESSOLIN e CECHINEL FILHO, 2003).

Há muitos anos no Brasil, extratos botânicos têm sido utilizados como remédios na medicina popular para o tratamento de desordens dispépticas, assim, alguns destes foram escolhidos neste trabalho para análise da atividade antimicrobiana *in vitro* contra isolados clínicos e linhagens referência de *H. pylori*.

Os extratos escolhidos para este estudo foram obtidos a partir das plantas *Malva sylvestris*, *Chamomilla recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Plantago major* e *Rheum rhaponticum*. Também foram incluídas plantas usadas como condimentos ou ingredientes alimentares inseridos na cultura brasileira, como *Bixa orellana*,

Curcuma longa, *Nasturtium officinale* e *Ilex paraguariensis* (nas variedades erva-mate verde e tostada).

Para avaliar a susceptibilidade dos extratos frente ao *H. pylori* foram utilizados os métodos de disco difusão e diluição em ágar. A primeira parte do estudo consistiu de uma avaliação preliminar, pelo método de disco difusão utilizando as cepas referência J99 e 26695. Este método teve como finalidade a identificação de alguma potencialidade antimicrobiana nos extratos testados.

Os extratos que apresentaram os maiores halos de inibição foram *Bixa orellana*, *Malva sylvestris*, *Chamomilla recutita* e *Ilex paraguariensis* (erva-mate verde e mate tostado).

Apesar do método de disco difusão ser realizado em meio de cultura sólido, facilitando o desenvolvimento de *H. pylori* e a visualização dos halos de inibição, o mesmo apresenta algumas desvantagens, como a obtenção de resultados qualitativos e a impossibilidade de estabelecer uma comparação da atividade antimicrobiana dos extratos frente às amostras analisadas (BRESSOLIN e CECHINEL FILHO, 2003).

Assim, em uma etapa posterior, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas através do método de diluição em ágar para os extratos de plantas acima citados contra 14 isolados clínicos de *H. pylori*, além das duas linhagens referência J99 e 26695.

Entre os extratos avaliados pelo método de diluição em ágar, os que apresentaram melhor atividade anti-*Helicobacter* foram *Chamomilla recutita* e *Ilex paraguariensis* (erva-mate verde e mate tostado). A atividade antimicrobiana encontrada está relacionada à presença de diferentes compostos com propriedades fitoquímicas nos extratos de plantas analisados.

O extrato de *Chamomilla recutita* contém como principais constituintes químicos os flavonóides, dentre os quais destacam-se a apigenina, e os óleos essenciais, que apresentam como principais constituintes o camazuleno, bisabolol, óxido de bisabolol e espatulenol (MAPELI *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana dos flavonóides ocorre pela habilidade deste grupo em se ligar e formar

complexos com proteínas solúveis e extracelulares e também com a parede de células bacterianas. Outra característica importante observada em muitos flavonóides lipofílicos é sua capacidade de romper as membranas microbianas (COELHO *et al.*, 2003).

Em trabalho realizado por Nariman e colaboradores (2004), foi demonstrada a atividade antimicrobiana *in vitro* de seis extratos de plantas de origem iraniana contra *H. pylori*. Entre os compostos presentes nos extratos, estavam os flavonóides.

Os óleos essenciais, outro composto presente no extrato de *Chamomilla recutita*, são elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos. Tem sido estabelecido que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas. A composição química dos óleos essenciais é complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O mecanismo de ação dos terpenos ainda não está completamente elucidado, porém supõe-se que envolva ruptura de membrana dos compostos lipofílicos (MENDONZA *et al.*, 1997).

A atividade anti-*Helicobacter* de óleos essenciais obtidos de vários vegetais foi comprovada por Ohno e colaboradores (2003), destacando-se no estudo o extrato de *Cymbopogon citratus*.

O extrato que melhor apresentou atividade anti-*Helicobacter* neste trabalho foi extraído do vegetal *Ilex paraguariensis*. A planta é utilizada na alimentação brasileira nas formas de chá (mate tostado) e chimarrão (erva-mate verde). Ao serem comparadas as duas variedades de extrato, frente à bactéria *H. pylori*, não foram encontradas grandes diferenças entre as duas, sugerindo que o processo utilizado na fabricação do mate tostado, não interfere na característica antimicrobiana do mesmo.

Dentre os produtos do metabolismo secundário já relatados para a espécie de *Ilex paraguariensis*, destaca-se a presença dos ácidos fenólicos, ácido caféico,

ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, dos flavonóides rutina, canferol e quercetina, das saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico e das metilxantinas, cafeína e teobromina, sendo atribuídas a estas últimas as propriedades estimulantes da bebida (SCHUBERT *et al.*, 2006).

A característica antimicrobiana da *Ilex paraguariensis* está associada à presença de uma série de compostos que conhecidamente apresentam esta atividade, entre eles os compostos fenólicos, os quais além de inativarem enzimas, são tóxicos para as células bacterianas (MASON e WASSERMAN, 1987), os triterpenos que alteram a permeabilidade da membrana lipídica (HARAGUCHI *et al.*, 1998), ou ainda os flavonóides, que conforme descrito anteriormente, são responsáveis pela lise da parede e membrana bacterianas. Ainda há relatos que entre as características farmacológicas da rutina, encontra-se a ação antibacteriana (HARBONE e BAXTER, 1983)

Estudos realizados por Hongpattarakere e Jonhson (1999) indicam que os metabólitos secundários da *Ilex paraguariensis*, como cafeína, triterpenos, derivados do ácido clorogênico e entre outros, apresentaram efeito inibitório tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas.

Outro extrato de planta testado pelo método de diluição em ágar foi o de *Bixa orellana*. O vegetal, amplamente utilizado na culinária brasileira, revela a existência, na folha, de um óleo volátil contendo mono e sesquiterpenos, entre os quais destacam-se ishwarano e vários flavonóides. Na semente ocorre um óleo essencial rico em *all-E*-geranilgeraniol, monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, além de carotenóides bixina e norbixina, responsáveis pela cor, e alfa e beta-caroteno em teores mais baixos (COELHO *et al.*, 2003).

Ao ser avaliado neste trabalho, o extrato de *Bixa orellana* apresentou atividade anti-*Helicobacter* com as linhagens referência, porém, com a maioria dos isolados clínicos, esta atividade não foi observada.

A baixa atividade antimicrobiana encontrada para *Bixa orellana* pode estar associada com a parte da planta utilizada no processo de obtenção do extrato, a

qual altera a composição e a concentração de cada composto presente. Assim, em estudo realizado por Lans (2007), foi observada uma atividade antimicrobiana contra vários gêneros bacterianos que não *Helicobacter* com extrato obtido a partir da raiz do vegetal. Coelho e colaboradores (2003) demonstraram que foi possível inibir o crescimento de bactéria Gram positivas e Gram negativas utilizando várias partes da planta, como caule, folhas e flores.

O extrato de *Malva sylvestris*, assim como o de *Bixa orellana*, não apresentou boa ação anti-*Helicobacter*. Embora apresente na sua constituição compostos químicos como taninos, óleos essenciais, e flavonóides (BUFON *et al.*, 2001), elementos conhecidamente antimicrobianos, os mesmos não foram ativos contra a bactéria *H. pylori*.

5.2. ANÁLISE DA OCORRÊNCIA

A bactéria *H. pylori* é responsável por uma das infecções bacterianas mais frequentes no mundo, e sua incidência está bem estabelecida em vários países. Entretanto no Brasil há apenas alguns relatos epidemiológicos nas regiões Sul (Rio Grande do Sul e Paraná), Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais), Centro Oeste (Mato Grosso) e Nordeste (Maranhão), oscilando de 59,9% no Rio de Janeiro (RJ) a 96% em São Luiz (MA) (LADEIRA *et al.*, 2003). Em estudo epidemiológico realizado por Pilonetto (2001), foi determinado que a soroprevalência da infecção pelo microrganismo na cidade de Curitiba foi de 52,9%. Valores semelhantes encontrados neste trabalho (51,9%), confirmam a alta ocorrência da infecção em nosso meio. As diferentes taxas relatadas por Ladeira e colaboradores (2003) podem ser devido às diferentes dimensões continentais e desigualdades sócio-econômicas existentes no Brasil.

Foi observado neste estudo que a ocorrência do microrganismo aumentou significativamente de acordo com a idade ($p < 0,0003$). Este fato pode ser atribuído ao efeito coorte, onde a maior ocorrência observada em indivíduos

idosos reflete um risco maior de aquisição da infecção que essas pessoas tiveram quando crianças (BITENCOURT *et al.*, 2006).

Em relação ao sexo do paciente, nenhuma diferença significativa foi observada neste trabalho ($p=0,9526$). Estudos realizados por Pilonetto (2001) confirmam este dado.

Ao realizar o diagnóstico da infecção por *H. pylori* através de métodos invasivos, como a cultura, foi possível isolar o microrganismo utilizando-se tanto as biópsias do corpo como a do antro para a maioria dos pacientes estudados (78,6%), porém em uma minoria, houve crescimento do *H. pylori* apenas na biópsia do corpo (7,1%) ou do antro (14,3%).

Na obtenção de biópsia gástrica, através da endoscopia digestiva, o local para pesquisa do *H. pylori* no estômago pode ser o antro ou o corpo, porém não está claro qual o sítio mais acometido. Bayerdorffer e colaboradores e Dixon e colaboradores recomendam a necessidade da utilização de biópsia de antro e de corpo, favorecendo o diagnóstico da infecção (FRANCISCO JR *et al.*, 2004).

5.3. FATORES DE VIRULÊNCIA

Na maioria das vezes, a infecção por *H. pylori* é assintomática e o paciente apresenta algumas manifestações clínicas discretas. Apenas uma minoria desenvolve úlcera péptica, importante causa de morbidade no mundo, ou ainda gastrite crônica atrófica, considerada um fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (ASHOUR *et al.*, 2002).

Alguns fatores de virulência têm sido associados com diferentes doenças. No presente estudo, foram determinados os genes de virulência *vacA*, *cagA* e *napA* de *H. pylori* isolados de pacientes da região de Curitiba - PR (Brasil), bem como sua associação entre as diferentes doenças e a presença destes genes.

Das 42 amostras estudadas, 3 (7,7%) apresentaram genótipos múltiplos, indicando a ocorrência de infecções múltiplas nestes pacientes. Valores

superiores (15%) foram encontrados em outro trabalho realizado no Brasil (ASHOUR *et al.*, 2002). O que permitiu esta análise foi a presença de mais de uma variante alélica do gene *vacA*.

As infecções múltiplas apresentam diferentes taxas de prevalência, sendo encontrada em proporções menores que 10% em locais como Estados Unidos, França e Japão, e atingindo altas taxas como em Portugal e México (GODOY, 2002). A variação entre as taxas de infecções múltiplas pode ser explicada devido à grande diversidade de prevalência mundial da bactéria.

Os genótipos *vacA* têm sido considerados importantes marcadores de patogenicidade para *H. pylori*, decorrentes da produção de citotoxina vacuolizante, a qual causa danos epiteliais *in vivo*, além de apresentarem associação na gênese da úlcera péptica (VAN DOORN *et al.*, 1998).

Através da utilização de *primers* específicos, foi possível classificar isolados de *H. pylori* como do tipo s1 ou s2. Assim, entre as 39 amostras analisadas, a maioria (58%) foi classificada como do tipo s1 e o restante (42%) como do tipo s2.

A distribuição geográfica dos alelos do *vacA* é variável (VAN DOORN *et al.*, 1999). A frequência de s1 encontrada neste estudo foi semelhante a da França, Canadá, Itália e Estados Unidos (aproximadamente 60%) (YAMAOKA *et al.*, 1999). Valores superiores foram encontrados em estudos realizados na América do Sul (71,4%) (YAMAOKA *et al.*, 1999) e no Brasil (72,7%) (ASHOUR *et al.*, 2002).

Alguns autores propuseram que a prevalência do alelo s1 na doença da úlcera péptica, seria maior quando comparada com o alelo s2, pois a primeira secretaria uma maior quantidade de citotoxinas ativas e seriam consideradas mais virulentas (ATHERTON *et al.*, 1997). Neste trabalho apenas 2 pacientes apresentaram doença da úlcera péptica, embora 100% deles eram do alelo s1.

Ao serem analisados os alelos da região m, aproximadamente 58% das amostras foram identificadas como m1 e 42% como m2. Os alelos da região mediana (m1 e m2) estão associados com os níveis de citotoxina produzidos,

assim o alelo m1 está relacionado com produção em maior quantidade da mesma (ATHERTON *et al.*, 1995).

De maneira geral, a distribuição dos alelos m é mais homogênea do que a dos alelos s, onde metade das amostras são m1 e a outra metade m2 (VAN DOORN *et al.*, 1999). Tal fato foi constatado neste trabalho, porém, resultados diferentes foram relatados por pesquisadores brasileiros (ASHOUR *et al.*, 2002), que observaram 61,8 e 36,4% respectivamente para os alelos m1 e m2.

A associação entre o genótipo s1m1 e o desenvolvimento de úlcera péptica apresenta controvérsias na literatura (GODOY, 2002), porém alguns autores sugerem uma maior frequência do alelo em relação à doença (ASHOUR *et al.*, 2002). Este fato não pode ser analisado, devido ao baixo número (2) de pacientes com úlcera péptica incluídos no estudo.

Assim como o *vacA*, a prevalência de amostras *cagA* positivas varia de uma região geográfica para outra. Em grande parte dos países da Europa Ocidental e nos Estados Unidos, a prevalência de amostras *cagA* positivas varia entre 59 e 75%; na Itália e em Portugal, as taxas são superiores a 80% e no México, praticamente 100% dos indivíduos apresentam-se colonizados por amostras que carregam o gene (ASHOUR *et al.*, 2002). A frequência de pacientes incluídos na pesquisa, que apresentaram o gene *cagA* foi de 92,3 %.

Acredita-se que pacientes infectados com linhagens mais virulentas de *H. pylori* (*cagA* +, *vacA* s1) poderiam desenvolver uma “proteção” contra GERD (PEEK *et al.*, 1995). Várias hipóteses têm sido formuladas com o objetivo de explicar este fenômeno, entre elas que as lesões causadas no corpo gástrico resultariam em uma diminuição da secreção ácida no estômago, podendo prevenir o desenvolvimento de GERD (GODOY, 2002). Neste trabalho não foi encontrada uma relação entre a presença de linhagens menos virulentas (s2m2) do gene *vacA* e a presença de GERD.

Alguns autores sugerem a associação entre a alta prevalência do gene *cagA* e doenças severas, como a úlcera duodenal (BRITO *et al.*, 2003). Este dado não pode ser avaliado devido ao pequeno número de pacientes com esta

sintomatologia, porém a alta prevalência deste gene em doenças mais brandas, como gastrite e GERD, sugerem que o gene *cagA* não pode ser considerado um marcador específico de severidade.

O gene *napA* foi encontrado em todas as amostras de *H. pylori* analisadas, mesmo nas linhagens *cagA* negativas. O gene *napA* está presente em todos os isolados de *H. pylori*, e é responsável pela codificação de uma proteína denominada *Hp-nap*, a qual está associada com a reação inflamatória das células gástricas em resposta à infecção pelo microrganismo. Alguns estudos têm sugerido que existe uma possível variação nos níveis de expressão de *Hp-nap*, o que poderia explicar as diferenças encontradas na resposta do paciente às infecções (EVANS *et al.*, 1995).

Como o gene *napA* está sempre presente nos isolados de *H. pylori*, o mesmo pode ser utilizado como uma alternativa no auxílio ao diagnóstico das infecções.

6. CONCLUSÕES

1. A ocorrência da infecção por *H. pylori* dos pacientes atendidos no Serviço de Endoscopia Digestiva do HC-UFPR, na cidade de Curitiba, foi de 51,9% e pode-se observar que a mesma aumentou significativamente de acordo com a idade, porém não houve significância estatística em relação ao sexo do paciente.
2. Os alelos s1 e m1 do gene *vacA* são os mais freqüentemente observados, em nosso meio, nas amostras de pacientes infectados com *H. pylori* e o gene *cagA* esteve presente na maioria das amostras isoladas.
3. A elevada prevalência do gene *cagA* em doenças severas, como a úlcera péptica, não pode ser avaliada devido ao pequeno número de pacientes com esta sintomatologia, porém a alta prevalência deste gene em doenças mais brandas, como gastrite e GERD, sugerem que o gene *cagA* não pode ser considerado um marcador específico de severidade.
4. A possível associação entre uma maior freqüência do genótipo s1m1 e o desenvolvimento de úlcera péptica, também não pode ser avaliada devido ao baixo número de pacientes com úlcera péptica incluídos no estudo.
5. Neste trabalho não foi encontrada uma possível relação entre a presença de linhagens menos virulentas do gene *vacA* (s2m2) e o desenvolvimento de refluxo gastroesofágico.
6. O gene *napA* foi encontrado em todas as amostras analisadas, podendo o mesmo servir como marcador molecular no auxílio ao diagnóstico das infecções causadas por *H. pylori*.

7. Entre os extratos vegetais analisados neste trabalho, o de *Ilex paraguariensis* (erva-mate verde e mate tostado) apresentou melhor atividade anti-*Helicobacter pylori*, seguido da *Chamomilla recutita*. Estudos clínicos e análise dos componentes dos princípios ativos serão realizados posteriormente para confirmar a atividade anti-*Helicobacter in vivo* destes extratos.

8. O extrato vegetal de *Malva sylvestris* apresentou atividade antimicrobiana com as linhagens referência de *H. pylori* J99 e 26695, porém, com a maioria dos isolados clínicos, esta atividade não foi observada. Resultado semelhante foi encontrado para o extrato de *Bixa orellana*.

9. A busca de componentes bioativos em plantas deve ser incorporada a programas de pesquisa, a fim de legitimar o uso de plantas medicinais no tratamento das diferentes patologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGOOD, H. M.; COVER, T. L. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.4, Oct, p.597-613. 2006.

ALMEIDA, L. P. D. **Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa* L., Avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese *in vitro* na produção de curcuminóides e óleos essenciais.** Belo Horizonte, 2006. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (Doutorado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

ALVAREZ, M. C. **Avaliação da Atividade Anti-*Helicobacter* da Resina, do Óleo Essencial e da Mistura de Alfa e Beta amirinas de *Protium heptaphyllum* March.** Bragança Paulista, 2006. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-graduação, Universidade São Francisco.

ASHOUR, A. A. *et al.* Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.33, n.3, Jul 12, p.173-8. 2002.

ATHERTON, J. C. *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem**, v.270, n.30, Jul 28, p.17771-7. 1995.

ATHERTON, J. C. *et al.* Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.112, n.1, Jan, p.92-9. 1997.

ATHERTON, J. C. *et al.* Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. **Curr Microbiol**, v.39, n.4, Oct, p.211-8. 1999.

BANATVALA, N. *et al.* *Helicobacter pylori* in dental plaque. **Lancet**, v.341, n.8841, Feb 6, p.380. 1993.

BARDHAN, K. D. *et al.* Pantoprazole-based 10-day triple therapy is effective in *Helicobacter pylori* eradication. **Aliment Pharmacol Ther**, v.12, n.2, Feb, p.185-9. 1998.

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology.** 8 ed. St. Louis.: C. V. Mosby. 1990

BINA, J. E. *et al.* *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, n.2, Feb, p.248-54. 2000.

BITTENCOURT, P. F. *et al.* Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **J Pediatr**. Rio de Janeiro, v.82, n.5, Sep-Oct, p.325-34. 2006.

BLACK, J. G. **Microbiologia - Fundamentos e Perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002

BLASER, M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J Clin Invest**, v.107, n.7, Apr, p.767-73. 2001.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytother Res**, v.14, n.8, Dec, p.581-91. 2000.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas - Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: Univali, v.1. 2003. 7-107 p.

BRITO, C. A. *et al.* Prevalence of *cagA* and *vacA* genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, Sep, p.817-21. 2003.

BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol Rev**, v.22, n.2, p.283-97. 2000.

BUFON, M. C. M. *et al.* Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". **Visão Acadêmica**, v.2, n.1, p.31-38. 2001.

BUFON, M. C. M. *et al.* Estudo do efeito do extrato de *Nasturtium officinale*, R. BR. no controle do crescimento de microrganismos presentes na cavidade bucal e placa dentária *in vitro*. **Visão Acadêmica**, v.6, n.1, p.25-32. 2005.

CARVALHAES, A. *et al.* Terapêutica e Epidemiologia da Infecção por "H. pylori". Recomendações do primeiro seminário promovido pelo "Núcleo Brasileiro para Estudo do "Helicobacter pylori". **GED**, v.16, p.99-100. 1997.

CARVALHO, J. L. S. *et al.* Screening Fitoquímico do *Nasturtium officinale* R. BR.: controle de qualidade. **Visão Acadêmica**, v.7, n.2, p.25-32. 2006.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105. 1998.

CENSINI, S. *et al.* CagA, pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci. U S A**, v.93, n.25, Dec 10, p.14648-53. 1996.

CLARKE, J. M. *et al.* **J. Microbiol. Meth.**, v.46, n.3, p.261. 2001.

CLAYTON, C. L. *et al.* Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.30, n.1, Jan, p.192-200. 1992.

COELHO, A. M. S. P. S. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v. 21, n.1/2, p.47-54. 2003.

COLE, S. P. *et al.* Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. **Infect Immun**, v.65, n.2, Feb, p.843-6. 1997.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res**, v.52, n.24, Dec 15, p.6735-40. 1992.

COVACCI, A. *et al.* Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci. U S A**, v.90, n.12, Jun 15, p.5791-5. 1993.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582. 1999.

CRABTREE, J. E. *et al.* *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. **J Clin Pathol**, v.48, n.1, Jan, p.41-5. 1995.

CUNICO, M. M. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Mig. (*Piperaceae*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, n.2, p.97-103. 2004.

DAILIDIENE, D. *et al.* Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.12, Dec, p.3940-6. 2002.

DATTA, S. *et al.* Virulence genes and neutral DNA markers of *Helicobacter pylori* isolates from different ethnic communities of West Bengal, India. **J Clin Microbiol**, v.41, n.8, Aug, p.3737-43. 2003.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v.69, p.1-39. 2000.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista. 1995

DIXON, M. Pathological consequences of *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v.215, p.21. 1996.

DORE, M. P. *et al.* Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. **Dig Dis Sci**, v.45, n.1, Jan, p.68-76. 2000.

DORE, M. P. *et al.* Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. **J Antimicrob Chemother**, v.43, n.1, Jan, p.47-54. 1999.

DUNN, B. E. *et al.* Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. **Infect Immun**, v.65, n.4, Apr, p.1181-8. 1997.

ESLICK, G. D. Sexual transmission of *Helicobacter pylori* via oral-anal intercourse. **Int J STD AIDS**, v.13, n.1, Jan, p.7-11. 2002.

EVANS, D. J., Jr. *et al.* Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infect Immun**, v.63, n.6, Jun, p.2213-20. 1995.

FALLONE, C. A. *et al.* Is *Helicobacter pylori* eradication associated with gastroesophageal reflux disease? **Am J Gastroenterol**, v.95, n.4, Apr, p.914-20. 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo 2000.

FERGUSON, D. A., Jr. *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. **J Clin Microbiol**, v.31, n.10, Oct, p.2802-4. 1993.

FORBES, A. B. *et al.* **Bailey & Scott' Diagnostic Microbiology.** EUA: Mosby. 1998. 575-576 p.

FOX, J. G. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther**, v.9 Suppl 2, p.93-103. 1995.

FRANCISCO Jr, A. P. *et al.* Detecção gástrica de *Helicobacter pylori* em pacientes pediátricos sintomáticos através da reação em cadeia de polimerase (PCR), teste

de urease e exame histológico. **Pediatria**, v.26, n.1, p.34-42. 2004.

FRENCK Jr, J. C. **Microbes and infections - Editions scientifiques et medicales**. Elsevier SAS. 2003

GADHI, C. A. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel extracts. **J Ethnopharmacol**, v.75, n.2-3, May, p.203-5. 2001.

GODOY, A. P. O. D. **Estudo da Associação entre a Resistência Primária aos Antimicrobianos Amoxicilina, Claritromicina, Furazolidona, Metronidazol e Tetraciclina com os Fatores de Virulência vacA, iceA, cagA e cagE do *Helicobacter pylori***. Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Estadual de Campinas.

GOODWIN, C. S. *et al.* Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. **J Clin Microbiol**, v.27, n.5, May, p.938-43. 1989.

GRAHAM, D. Y. *et al.* Short report: a non-metronidazole triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection-tetracycline, amoxicillin, bismuth. **Aliment Pharmacol Ther**, v.7, n.1, Feb, p.111-3. 1993.

HARAGUCHI, H. *et al.* Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. **Phytotherapy Research**, v.13, n.2, p.151-156. 1998.

HARBONE, J. B. H. B. **Phytochemical Dictionary: a handbook of a bioactive compounds from plants**. London: Taylor & Frost. . 1983. 791 p.

HEATLEY, R. V. **The *Helicobacter pylori* handbook**. Osney Mead: Blackwell Science. 1995

HIYAMA, T. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and metronidazole determined by 23S ribosomal RNA and rdxA gene analyses in Hiroshima, Japan. **J Gastroenterol Hepatol**, v.18, n.10, Oct, p.1202-7. 2003.

HONGPATTARAKERE, T.; JOHNSON, E. A. Natural antimicrobial components isolated from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*). **Food Research Institute**, v.11, n.3. 1999.

HUNT, R. H. *et al.* Implications of antibiotic resistance in the management of *Helicobacter pylori* infection: Canadian *Helicobacter* Study Group. **Can J Gastroenterol**, v.14, n.10, Nov, p.862-8. 2000.

IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Working Group on the

Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.** 61: 1-241 p. 1994

KAPADIA, C. R. Host factors in Helicobacter infection. **Gastroenterology**, v.113, n.1, Jul, p.361-2. 1997.

KELLY, S. M. *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterology**, v.107, n.6, Dec, p.1671-4. 1994.

KIM, H. S. *et al.* Comparison of the efficacy and safety of different formulations of omeprazole-based triple therapies in the treatment of Helicobacter pylori-positive peptic ulcer. **J Gastroenterol**, v.36, n.2, Feb, p.96-102. 2001.

KINDERMANN, A. *et al.* Influence of age on 13C-urea breath test results in children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.30, n.1, Jan, p.85-91. 2000.

KIVI, M. *et al.* Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. **J Clin Microbiol**, v.41, n.12, Dec, p.5604-8. 2003.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido.** Rio de Janeiro: Medsi. 2001. 343-348 p.

KUIPERS, E. J; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. **Helicobacter**, v.9 Suppl 1, p.29-34. 2004.

KUSTERS, J. G; KUIPERS, E. J. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*. **Symp Ser Soc Appl Microbiol**, n.30, p.134S-44S. 2001.

KUSTERS, J. G. *et al.* Coccoid forms of Helicobacter pylori are the morphologic manifestation of cell death. **Infect Immun**, v.65, n.9, Sep, p.3672-9. 1997.

KUSTERS, J. G. *et al.* Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.3, Jul, p.449-90. 2006.

LADEIRA, M. S. P. *et al.* Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.335-342. 2003.

LANGENBERG, W. *et al.* Patient-to-patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. **J Infect Dis**, v.161, n.3, Mar, p.507-11. 1990.

LANS, C. Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.3, n.3, p.1-12. 2007.

- LI, Y. *et al.* In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. **J Ethnopharmacol**, v.98, n.3, Apr 26, p.329-33. 2005.
- LOIVUKENE, K. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolates in Estonia during 1995-2000 in comparison to the consumption of antibiotics used in treatment regimens. **Clin Microbiol Infect**, v.8, n.9, Sep, p.598-603. 2002.
- MAHADY, G. B. *et al.* In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to isoquinoline alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. **Phytother Res**, v.17, n.3, Mar, p.217-21. 2003.
- MAHON, C. R.; MANUSELIS JR, G. **Textbook of Microbiology**. USA: W. B. Saunders Company. 1995. 505-511 p.
- MAPELI, N. C. V. *et al.* Produção de biomassa e de óleo essencial dos capítulos florais da camomila em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.jan-mar, p.32-37. 2005.
- MARSHALL, B. J; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.1, n.8390, Jun 16, p.1311-5. 1984.
- MARTINAZZO, A. P. e MARTINS, T. PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS PELA POPULAÇÃO DE CASCAVEL/PR. **Arg. Ciênc. Saúde Unipar**, v.8, n.1 , jan./abr, p.3-6. 2004.
- MASON, T. L.; WASSERMAN, B. P. Inactivation of red betaglucan synthase by native and oxydized phenolic compounds. **Phytochemistry**, v.26, p.2197-2202. 1987.
- MAZA, L. M. *et al.* **Color Atlas of Medical Bacteriology**. Washington, D. C.: ASM Press. 2004. 292 p.
- MCLOUGHLIN, R. *et al.* Therapy of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.9 Suppl 1, p.42-8. 2004.
- MCMAHON, B. J. *et al.* The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. **Ann Intern Med**, v.139, n.6, Sep 16, p.463-9. 2003.
- MEGRAUD, F. Rationale for the choice of antibiotics for the eradication of *Helicobacter pylori*. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.7 Suppl 1, Aug, p.S49-54. 1995.

_____. Helicobacters: from Bacterial Adaptation to Pathogenicity. **Adv Clin Exp Med**, v.14, n.1, p.5-10. 2005.

_____. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. **Gut**, v.56, n.11, Nov, p.1502. 2007.

MEGRAUD, F. *et al.* Activity of lansoprazole against *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v.337, n.8755, Jun 15, p.1486. 1991.

MEGRAUD, F.; BROUTET, N. Review article: have we found the source of *Helicobacter pylori*? **Aliment Pharmacol Ther**, v.14 Suppl 3, Oct, p.7-12. 2000.

MEGRAUD, F.; LAMOULIATTE, H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther**, v.17, n.11, Jun 1, p.1333-43. 2003.

MEGRAUD, F.; LEHOURS, P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**, v.20, n.2, Apr, p.280-322. 2007.

MELO, E. T. *et al.* Seroprevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in medical students and residents in Recife, Brazil. **J Clin Gastroenterol**, v.36, n.2, Feb, p.134-8. 2003.

MENDONÇA, S. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, v.5, n.2, Jun, p.79-83. 2000.

MENDOZA, L. *et al.* Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (*Asteraceae*). **J Ethnopharmacol**, v.58, n.2, Oct, p.85-8. 1997.

MEYER, J. M. *et al.* Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. **Ann Intern Med**, v.136, n.1, Jan 1, p.13-24. 2002.

MORAIS, T. C. V. *et al.* Produção de biomassa e teor de óleos essenciais da camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) em função das adubações com fósforo e nitrogênio. **Rev. Bras. Plan. Med.**, v.8, n.4, p.120-125. 2003.

MURPHY, M. S. *Helicobacter pylori*. **Arch Dis Child**, v.84, n.6, Jun, p.525. 2001.

MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D.C: ASM Press. 2003. 304, 346, 348, 915, 922, 1049, 1138 p.

NAHAR, S. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated

in Bangladesh. **J Clin Microbiol**, v.42, n.10, Oct, p.4856-8. 2004.

NARIMAN, F. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. **Helicobacter**, v.9, n.2, Apr, p.146-51. 2004.

NERI, M. *et al.* Role of antibiotic sensitivity testing before first-line *Helicobacter pylori* eradication treatments. **Aliment Pharmacol Ther**, v.18, n.8, Oct 15, p.821-7. 2003.

NOSTRO, A. *et al.* Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. **Phytother Res**, v.19, n.3, Mar, p.198-202. 2005.

NOTARNICOLA, M. *et al.* Low density lipoprotein receptors and polyamine levels in human colorectal adenocarcinoma. **J Gastroenterol**, v.30, n.6, Dec, p.705-9. 1995.

OGATA, S. K. *et al.* Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children and adolescents. **Sao Paulo Med J**, v.119, n.2, Mar, p.67-71. 2001.

OHNO, T. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.8, n.3, Jun, p.207-15. 2003.

OLIVEIRA, R. A. G. *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.77-82. 2006.

OWEN, R. J. *et al.* Identification of *cagA* tyrosine phosphorylation DNA motifs in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patients by novel PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time fluorescence PCR assays. **J Clin Microbiol**, v.41, n.7, Jul, p.3112-8. 2003.

PARENTE, J. M. L. **Prevalência da Infecção pelo *Helicobacter pylori* em crianças até 12 anos de idade.** Mestrado em Ciências Médicas, área de Medicina Interna. , Universidade Estadual de Campinas, 2003. 133 p.

PEEK, R. M. *et al.* Role of *Helicobacter pylori cagA(+)* strains and specific host immune responses on the development of premalignant and malignant lesions in the gastric cardia. **Int J Cancer**, v.82, n.4, Aug 12, p.520-4. 1999.

PEEK, R. M. J. *et al.* Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. **Lab Invest**, v.73, n.6, Dec, p.760-70. 1995.

PEEK, R. M. J. *et al.* Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a

Helicobacter pylori gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. **Proc Assoc Am Physicians**, v.110, n.6, Nov-Dec, p.531-44. 1998.

PEREZ-PEREZ, G. I. *et al.* Transient and persistent *Helicobacter pylori* colonization in Native American children. **J Clin Microbiol**, v.41, n.6, Jun, p.2401-7. 2003.

PETERSON, W. L. *et al.* Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized, double-blind trial. **Am J Gastroenterol**, v.88, n.11, Nov, p.1860-4. 1993.

PILONETTO, M. **Soroepidemiologia da infecção pelo *Helicobacter pylori* em Curitiba**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná.

PORTORREAL, A.; KAWAKAMI, E. [Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents]. **Arq Gastroenterol**, v.39, n.3, Jul-Sep, p.198-203. 2002.

QUEIROZ, D. M. *et al.* Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, v.25, n.12, Dec, p.2378-9. 1987.

RAHMAN, M. *et al.* DNA-level characterization of *Helicobacter pylori* strains from patients with overt disease and with benign infections in Bangladesh. **J Clin Microbiol**, v.41, n.5, May, p.2008-14. 2003.

REIS, M. S.; SILVA, S. R. **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa**. Brasília: Ibama, 2004.

ROTIMI, O. *et al.* Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. **J Clin Pathol**, v.53, n.10, Oct, p.756-9. 2000.

SAKAGAMI, T. *et al.* Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. **Gut**, v.39, n.5, Nov, p.639-48. 1996.

SAVARINO, V. *et al.* Head-to-head comparison of 1-week triple regimens combining ranitidine or omeprazole with two antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther**, v.13, n.5, May, p.643-9. 1999.

SCHUBERT, A. *et al.* Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1233-1236. 2006.

SILVEIRA, J. A. *et al.* Fatores de virulência e características epidemiológicas de *Helicobacter pylori*. **Revista Médica Ana Costa**, v.10, n.2, p.28-32. 2005.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999

SOLNICK, J. V.; SCHAUER, D. B. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.1, Jan, p.59-97. 2001.

SORBERG, M. *et al.* Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.15, n.3, Mar, p.216-9. 1996.

SOUSA, O. V. *et al.* Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, p.30-34. 2003.

STAMATIS, G. *et al.* In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. **J Ethnopharmacol**, v.88, n.2-3, Oct, p.175-9. 2003.

STORM, M. **Identification and Characterization of Biomarkers in Bacterial Infections**. Uppsala, Suécia, 2006. Dissertação (Doutorado em Filosofia). Departamento de Ciências Médicas, Universidade de Uppsala.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**, v.347, n.15, Oct 10, p.1175-86. 2002.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, p.811-812. 2002.

THOMAS, J. E. *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. **Lancet**, v.340, n.8829, Nov 14, p.1194-5. 1992.

THOMPSON COON, J.; ERNST, E. Systematic review: herbal medicinal products for non-ulcer dyspepsia. **Aliment Pharmacol Ther**, v.16, n.10, Oct, p.1689-99. 2002.

TORRES, J. *et al.* Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. **J Clin Microbiol**, v.39, n.7, Jul, p.2677-80. 2001.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed. 2000. 228-300, 442, 670,671 p.

TYTGAT, G. *Helicobacter pylori*: past, present and future. **J Gastroenterol Hepatol**, v.15 Suppl, Oct, p.G30-3. 2000.

VAIRA, D. *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* eradication on development of dyspeptic and reflux disease in healthy asymptomatic subjects. **Gut**, v.52, n.11, Nov, p.1543-7. 2003.

VALGAS, C. **Avaliação de Métodos de Triagem para Determinação de Atividade Antibacteriana de Produtos Naturais**. Florianópolis, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina.

VAN DOORN, L. J. *et al.* Distinct variants of *Helicobacter pylori* *cagA* are associated with *vacA* subtypes. **J Clin Microbiol**, v.37, n.7, Jul, p.2306-11. 1999.

_____. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.115, n.1, Jul, p.58-66. 1998.

VAN DUYNHOVEN, Y. T.; DE JONGE, R. Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? **Bull World Health Organ**, v.79, n.5, p.455-60. 2001.

XAVIER, M. N. *et al.* A Fitoterapia no combate às afecções bucais. João Pessoa: Idéia 1995.

XAVIER, H. S.; D'ANGELO, L. C. A. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.1. jan/jun., 1996.

WARREN, J. R. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Clin North Am**, v.29, n.3, Sep, p.705-51. 2000.

WESTBLOM, T. U. *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult and pediatric patients by using Pyloriset, a rapid latex agglutination test. **J Clin Microbiol**, v.30, n.1, Jan, p.96-8. 1992.

WINDSOR, H. M.; O'ROURKE, J. Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Clin North Am**, v.29, n.3, Sep, p.633-48. 2000.

YAMAOKA, Y. *et al.* Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. **J Clin Microbiol**, v.37, n.7, Jul, p.2274-9. 1999.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Helicobacter pylori é um bacilo Gram negativo curvo ou helicoidal, responsável pela etiopatogenia de diversas doenças do aparelho digestivo, como a gastrite e a úlcera péptica. Você ou seu acompanhante tem a possibilidade de ter esta bactéria no trato gastrointestinal e por isso, está sendo convidado a participar do estudo intitulado: Análise Antimicrobiana “in vitro” de diferentes fitoterápicos em cepas de *Helicobacter pylori*.

É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina e sua participação ou de acompanhante é de fundamental importância.

O objetivo desta pesquisa é isolar e caracterizar cepas de *H. pylori* a partir de biópsias gastroduodenais e posteriormente identificar diferentes fitoterápicos que apresentem atividade antimicrobiana “in vitro” contra estas cepas.

Caso você ou seu acompanhante participe da pesquisa, no momento de realizar a endoscopia digestiva pelo médico, um fragmento de biópsia gástrica a mais será coletado, sem ocorrer danos à sua saúde.

As coletas serão realizadas durante a consulta ambulatorial, obedecendo a um protocolo de avaliação dos fatores de risco para doença péptica.

O Dr. Julio César Pisani, responsável clínico pela pesquisa poderá ser contatado no Hospital de Clínicas, 3º andar, no telefone 360-1800 ramal 7841 e fará o acompanhamento clínico de qualquer problema conforme consta no padrão ético vigente no Brasil.

A sua participação ou de seu acompanhante neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceita a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.

Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de responsabilidade do paciente e nem de seus pais ou responsáveis.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito de forma codificada, para que a confidência seja mantida.

Pela sua participação ou de seu acompanhante no estudo, não haverá remuneração em dinheiro.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome ou de seu acompanhante, e sim um código.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo ao qual fui convidado a participar. Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

Assinatura do Paciente ou responsável

Local: _____ Data ____/____/____

ANEXO 3

DIAGRAMA INICIAL DE PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

DIAGRAMA INICIAL DE PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS