

**UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO
LUIS FERNANDO SILVA DE OLIVEIRA**

**PROSPECÇÃO DE NOVOS PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A
*HELICOBACTER PYLORI***

**SÃO PAULO
2010**

**LUIS FERNANDO SILVA DE OLIVEIRA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMÁCIA**

**PROSPECÇÃO DE NOVOS PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A
*HELICOBACTER PYLORI***

Monografia de conclusão de curso
apresentado à banca examinadora
para obtenção do grau de Mestre
Profissional em Farmácia da
Universidade Bandeirante de São
Paulo.

**SÃO PAULO
2010**

Oliveira, Luis Fernando Silva de

Prospecção de novos produtos naturais e sintéticos bioativos com atividade antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* / Luis Fernando Silva de Oliveira. – São Paulo: [s.n.], 2010.

119 f.; il.; 30 cm.

Monografia (Pós-Graduação) – Universidade Bandeirante de São Paulo, Mestrado Profissional em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Mendonça

1. *Helicobacter pylori* 2. Avaliação antimicrobiana 3. Produtos naturais e sintéticos I. Título

Dedico este trabalho a todos àqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Sérgio de Mendonça, pela constante atenção, apoio e orientação durante o trabalho de elaboração desta dissertação.

Agradeço a Professora Dr. Maria Cristina Marcucci Ribeiro (UNIBAN – BRASIL), ao Professor Dr. José Agustín Pablo Quincoces Suárez (UNIBAN – BRASIL), a Professora Dr. Luciane Cruz Lopes (UNISO – Universidade de Sorocaba) e ao Professor Dr. Arturo San Feliciano (Universidade de Salamanca – Espanha) por fornecer as amostras presentes neste trabalho.

Agradeço a todos os Professores Doutores do Programa de Mestrado Profissional de Farmácia, pela dedicação e competência que de alguma formam contribuíram para o meu crescimento profissional.

Agradeço aos alunos da graduação e pós-graduação pela valiosa amizade e colaboração prestada.

Agradeço principalmente a minha família, pelo amor, carinho e dedicação em todos os momentos de minha vida.

Agradeço aos amigos pelos momentos de descontração.

Perder tempo em aprender coisas que não
interessam, priva-nos de descobrir coisas
interessantes.

Carlos Drummond de Andrade
(1902 – 1987)

RESUMO

OLIVEIRA, L. F. S. **Prospecção de novos produtos naturais e sintéticos bioativos com atividade antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori***. 2010. 119 f. Monografia de Conclusão de Curso – Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2010.

Helicobacter pylori é uma bactéria que infecta a mucosa gástrica causando gastrites, úlceras pépticas e com o tempo câncer, é considerada como a mais freqüente infecção crônica que ocorre em humanos. O tratamento para a erradicação da bactéria tem sido um grande desafio para os clínicos, porque é necessário encontrar a combinação correta de antibióticos, além de manipular o pH gástrico na tentativa de assegurar a erradicação e evitar o desenvolvimento da resistência bacteriana. Devido aos altos índices de falências terapêuticas, existe a necessidade de se investigar novos tratamento, a partir de extratos de plantas de uso medicinal popular e alterações de compostos químicos já existentes. Neste trabalho foram avaliados qualitativa e quantitativamente, a própolis vermelha e suas frações, extratos de plantas, frações dos extratos de plantas e compostos isolados de diversas plantas nativas da América Latina, e ainda compostos químicos sintéticos modificados por reações de síntese orgânicas. Muitas das amostras testadas neste trabalho tiveram excelentes resultados, porém existe ainda, à necessidade de se realizar mais estudos para que possam ser incluídas no tratamento contra *Helicobacter pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*. Avaliação antimicrobiana. Compostos naturais e sintéticos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. F. S. **Prospecting of new natural products and synthetics bioactives with antimicrobial activity before *Helicobacter pylori***. 2010, 119 f. Monografia de Conclusão de Curso – Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2010.

Helicobacter pylori is a bacterium that infects the gastric mucos by causing gastrics, peptic ulcer and câncer along the time, and it's considered as the most frequent chronicle infection than occurs in human beings. The treatment for the eradication of the bacterium has been a great challenge for physics, because it's necessary to find out the proper combination of antibiotics and besides to manipulate the gastric pH in the attempt of assuring the eradication and avoid the development of the bacterium resistance. On account of high levels of therapeutic fails, there is a need of investigating new treatments from the extract of plants of popular medical use and changes of chemical compounds already existent. It were evaluated in this work qualitative and quantitative the red propolis and its fractions, extract of plants, fraction of extract of plants and isolated compounds from diverse native plants of Latin America, and still chemical synthetic compounds modified by reactions of organic synthesis. Many of the tested sample in this work had excellent results. However, there is still the need of realizing more study for that they may be included in the treatment against *Helicobacter pylori*.

Key-words: *Helicobacter pylori*. Antimicrobial evaluation. Natural and synthetic compounds.

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetros
AA	Diamina lipídica
AC	Aminoácido lipídico
AO/OA	Aminoálcool lipídico
BHA	Brain heart agar
BHI	Brain heart infusion
CBM	Concentração bactericida mínima
CLO	<i>Campylobacter Like Organism</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EBD	Extrato bruto em diclorometano
EBE	Extrato bruto etanólico
ECL	Enterocromafin cell like
EEP	Extrato etanólico da própolis vermelha
H ₂	Receptores de histamina do tipo 2
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IBP	Inibidor da bomba de prótons
IL	Interleucina
kDa	Quilo Dalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia plimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Radical
RGE	Refluxo gastroesofágico

SS1	Sydney Strain 1
Th	Células T helper
TNK	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Associação de <i>H. pylori</i> em pacientes com queixa dispéptica.....	19
Tabela 2 - Infecção global pelo <i>Helicobacter pylori</i>	20
Tabela 3 - Prevalência do <i>Helicobacter pylori</i> em países em desenvolvimento.....	20
Tabela 4 - Classificação endoscópica de Savary-Miller modificada.....	32
Tabela 5 - Classificação endoscópica de Los Angeles.....	33
Tabela 6 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para a própolis vermelha, suas frações e suas sub-frações.	74
Tabela 7 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para as amostras fracionadas do extrato de <i>Solanum cernuun</i>	75
Tabela 8 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para as amostras do grupo Pigastrin.	75
Tabela 9 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para as amostras fracionadas do extrato de <i>Piper carpunya</i>	76
Tabela 10 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados das aminocicloalcalonas.	77
Tabela 11 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados da benzalftalida.	78
Tabela 12 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados da benzalftalazinona.....	79
Tabela 13 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados do Imidazosoindol.....	80
Tabela 14 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados de chalconóide.....	81
Tabela 15 – Halos de inibição ao crescimento da <i>H. pylori</i> SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados da vanilina.....	82
Tabela 16 – Determinação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> dos produtos naturais através da CBM obtida pelo método de microdiluição.....	83
Tabela 17 – Determinação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> dos produtos sintéticos através da CBM obtida pelo método de microdiluição.....	84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagem em microscopia eletrônica da <i>Helicobacter pylori</i>	16
Figura 2 – Transformação da forma espiralada em forma cocóide.....	18
Figura 3 - Esquema ilustra o gene <i>vacA</i> , evidenciando as regiões que codificam o peptídeo sinal (s) e a mediana (m) e o produto primário traduzido pelo gene.....	39
Figura 4 - Esquema das atividades biológicas relacionadas com a patogenicidade.....	41
Figura 5 - Representação esquemática das interações de CagA com células epiteliais.....	42
Figura 6 - Representação esquemática do gene <i>iceA</i> que se encontra entre os genes <i>cysE</i> e <i>hpyIM</i> . Comparação entre os alelos <i>iceA1</i> e <i>iceA2</i> ; e os subtipos de <i>iceA2</i> ..	44
Figura 7 - Interação bactéria-hospedeiro na patogênese da infecção por <i>H. pylori</i>	46
Figura 8 - Relação entre a topografia da inflamação, fisiologia gástrica e resultado clínico.....	48
Figura 9 – Estruturas das aminocicloalcalonas.....	63
Figura 10 – Estrutura da benzalftalida.....	63
Figura 11 – Estrutura da ftalazinona.....	64
Figura 12 – Estrutura da cumarina.....	64
Figura 13 – Estrutura do imidazoisindol.....	65
Figura 14 – Estrutura do chalconóide.....	65
Figura 15 – Estrutura do pirimidoisindol.....	66
Figura 16 – Estrutura química da vanilina.....	67
Figura 17 – Esquema para preparação da microplaca.....	72

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	14
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1 Micro-organismo.....	15
1.1 Características microbiológicas.....	16
1.2 Morfologia.....	17
2 Epidemiologia.....	18
3 Prevalência.....	19
4 Transmissão.....	22
4.1 Fonte de infecção.....	22
4.1.1 Animais como reservatório de <i>Helicobacter pylori</i>	23
4.1.2 Reservatórios de água como fonte de transmissão de <i>Helicobacter pylori</i>	24
4.2 Transmissão fecal-oral.....	25
4.3 Transmissão oral-oral.....	26
4.4 Transmissão gastro-oral.....	26
5 Fatores de risco.....	27
5.1 Status socioeconômico.....	27
5.2 Predisposição genética.....	28
6 Patogenicidade.....	28
6.1 Fatores de colonização.....	28
7 Doenças associadas.....	29
7.1 Refluxo gastroesofágico.....	30
7.2 Gastrite.....	33
7.3 Úlcera.....	34
7.4 Linfoma MALT.....	35
7.5 Câncer gástrico.....	36
8 Fatores de virulência.....	37
8.1 Citotoxina vacuolizante VacA.....	38
8.2 CagA e CagE.....	41
8.3 IceA.....	43
9 Resposta inflamatória.....	44

10 Tratamento.....	49
10.1 Esquema terapêutico.....	50
10.1.1 Primeira linha terapêutica.....	50
10.1.2 Segunda linha terapêutica.....	50
10.1.3 Terceira linha terapêutica.....	51
10.2 Eficácia terapêutica.....	51
11 Modelo animal.....	53
12 Estudos de tratamento antimicrobiano.....	54
13 Produtos naturais: alternativa terapêutica.....	55
14 Plantas medicinais e fitoterapia.....	55
15 Química de produtos naturais.....	58
16 Compostos testados.....	59
16.1 Própolis vermelha.....	59
16.2 <i>Solanum cernuum</i> e <i>Solanum variabile</i>	59
16.3 <i>Cordia eucalyculata</i>	60
16.4 <i>Piper carpunya</i>	61
16.5 <i>Cissus sulcicaulis</i>	61
16.6 <i>Sweetia subelegans</i>	62
16.7 <i>Leonurus sibiricus</i>	62
16.8 Aminocicloalcalonas.....	63
16.9 Benzalftalida.....	63
16.10 Ftalazinona.....	64
16.11 Cumarina.....	64
16.12 Imidazoisindol.....	65
16.13 Chalconóide.....	65
16.14 Pirimidoisindol.....	66
16.15 Vanilina.....	66
III – Objetivos.....	68
1 Objetivos gerais.....	68
2 Objetivos específicos.....	68
IV – Materiais e Métodos.....	69
1 Preparação dos produtos naturais e sintéticos.....	69
2 Linhagem selecionada.....	70
3 Reativação de <i>H. pylori</i> em meio sólido.....	70

4 Identificação das linhagens.....	71
5 Método de difusão em disco.....	71
6 Método de microdiluição.....	72
V – Resultados	74
1 Avaliação qualitativa da influência no crescimento bacteriano dos produtos naturais e sintéticos.....	74
2 Determinação da CBM.....	83
VI – Discussão	87
VII – Conclusão	94
REFERÊNCIAS	95

I - INTRODUÇÃO

A infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) na mucosa gástrica é considerada como a mais freqüente infecção crônica que ocorre em humanos. Estima-se que a metade da população mundial esteja infectada por este micro-organismo, tornando-o um dos principais agentes patogênicos da espécie humana e destacando-o como um importante problema de saúde pública.

Devido ao alto número de pessoas infectadas com *H. pylori* no mundo, e a possibilidade da evolução do quadro clínico de gastrites para úlceras e carcinomas, diversos estudos evidenciaram opções regionais de tratamento de erradicação. Entretanto, foram observados altos índices de falências terapêuticas nos tratamentos utilizados, provocados tanto pelos efeitos colaterais que levavam a uma interrupção precoce dos tratamentos, quanto ao aumento da quantidade de bactérias *H. pylori* resistentes aos antibióticos utilizados. Por isso, métodos alternativos de tratamento estão sendo investigados por diversos grupos de pesquisadores com a finalidade de desenvolver algumas alternativas mais adequadas de tratamento, especialmente para aqueles casos de pacientes com reincidência da infecção. A maior parte das recentes pesquisas avalia os extratos vegetais de uso popular e alterações químicas de compostos isolados conhecidos. Estes estudos se baseiam nos conhecimentos etnobotânicos e etnofarmacológicos, bem como no desenvolvimento da fitoquímica, pois permitem que os princípios ativos com propriedades farmacológicas das plantas medicinais e dos produtos naturais utilizados durante centenas de anos pelos povos primitivos possam ser estabelecidos, inclusive quanto aos mecanismos de ação das substâncias isoladas destes produtos, auxiliando no processo de desenvolvimento de novos fármacos.

Neste sentido, este projeto avaliou qualitativa e quantitativamente a potencial atividade anti-*Helicobacter* de extratos de plantas do Brasil, Argentina e Panamá, popularmente utilizadas em infusões para tratamento de sintomas gastrointestinais. Os compostos que apresentaram atividade anti-*Helicobacter* foram analisados em ensaios *in vitro* para a quantificação desta atividade, com a finalidade de estabelecer parâmetros de concentração para ensaios posteriores de atividade antimicrobiana *in vivo* com camundongos.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste trabalho, optou-se por estender a revisão bibliográfica, com o objetivo de enviar o trabalho para uma possível publicação, em revista científica, de uma revisão relacionada à *Helicobacter pylori*.

1 Micro-organismo

A bactéria, hoje conhecida como *Helicobacter pylori*, tem sido o objeto de intensas pesquisas desde seu primeiro cultivo a partir de uma biópsia gástrica realizada em 1982. Desde o começo, este micro-organismo tem provocado o interesse de diversos profissionais da área da saúde, entre médicos, farmacêuticos, biólogos e até pesquisadores na área da oncologia. A possibilidade de que uma bactéria pudesse causar gastrites, úlceras pépticas e com o tempo câncer, era um conceito difícil de se aceitar. Entretanto, a evidência do envolvimento de um micro-organismo no desenvolvimento de úlceras em animais de experimentação já era de conhecimento dos pesquisadores desde o século XIX. A presença de organismos espiralados, conhecidos como espiroquetas, já havia sido previamente informada em 1893. Ao redor de 1940, foram identificadas espiroquetas nas amostras gástricas humanas, e a maioria parecia estar presente em pacientes com úlceras gástricas. Entretanto, o interesse dos pesquisadores em associar uma bactéria como o agente causal de úlcera diminuiu devido aos relatos da literatura da época que destacaram uma provável associação entre vírus e úlcera péptica. Steer renovou o interesse na associação entre úlcera e bactéria em 1975, mas falhou no isolamento e identificação dos micro-organismos que observou, assumindo como contaminação do endoscópio.

Em 1984, Warren e Marshall relataram a presença de uma bactéria espiralada em pacientes com úlceras pépticas e gastrites crônicas, evidenciando a similaridade entre estes micro-organismos e o gênero *Campylobacter*, dando-lhes a denominação de *Campylobacter Like Organism* (CLO). Posteriormente o micro-organismo recebeu a denominação de *Campylobacter pyloridis*, para logo depois ser corrigido gramaticalmente para *Campylobacter pylori*. Trabalhos posteriores, entretanto, evidenciaram diferenças bioquímicas e moleculares entre esta bactéria e

o gênero *Campylobacter*, e finalmente em 1989 foi reconhecida como um novo gênero, *Helicobacter*. Assim, ao *Helicobacter pylori*, foram incluídos, no gênero, o *Helicobacter felis* e o *Helicobacter mustelae* (HEATLEY, 1995), sendo que em 2009 o National Center for Biotechnology Information (NCBI) apresentam 42 espécies já confirmadas neste gênero.

1.1 Características microbiológicas

O *Helicobacter pylori* é um bacilo espiral Gram negativo, de crescimento lento, microaerofílico. Apresenta mobilidade pela presença de flagelos unipolares, que podem estar presentes na quantidade de quatro a seis, como demonstra a figura 1 (PETERSON; GRAHAM, 1998). Figura 1 – Imagem em microscopia eletrônica da *Helicobacter pylori*.

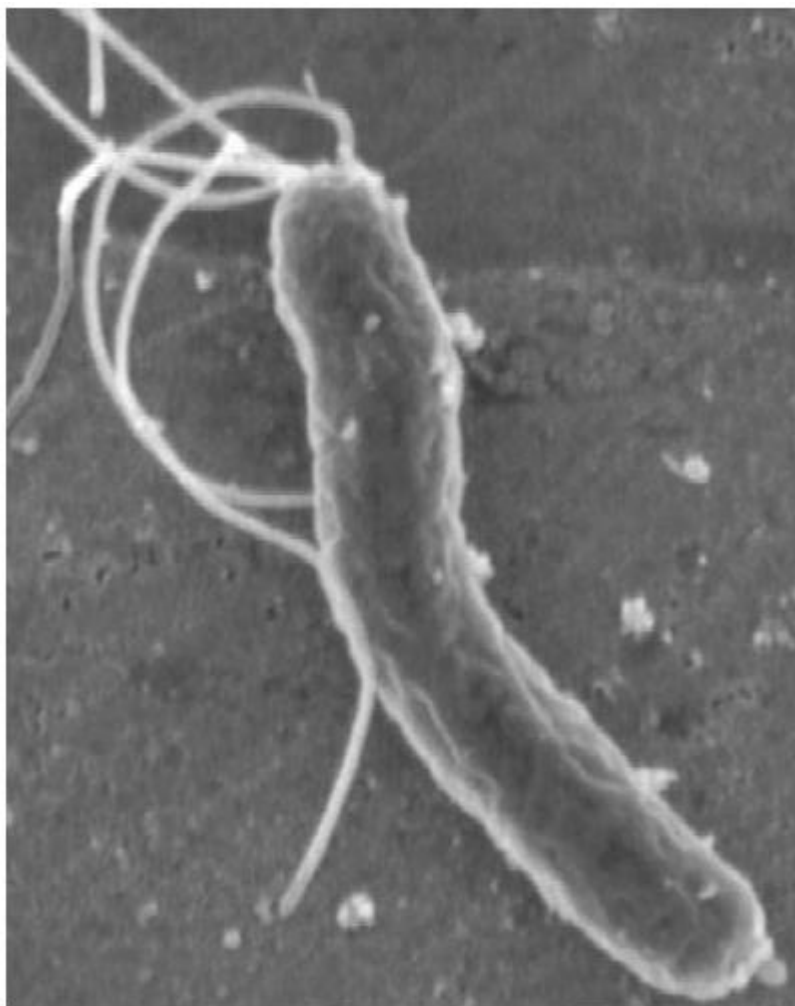


Figura 1 - Imagem em microscopia eletrônica da *Helicobacter pylori*.

Fonte: Thompson, L. *et al.*, 2001.

Sua principal característica bioquímica é a abundante produção de enzima urease, que tem um papel importante na fase inicial de colonização do epitélio gastrintestinal, já que a mesma realiza a hidrólise da uréia, alterando deste modo o pH da mucosa gástrica e tornando-a mais adequada para sua sobrevivência. Esta enzima tornou-se um importante marcador da presença do micro-organismo, sendo utilizada em testes de diagnóstico clínico (PETERSON; GRAHAM, 1998).

1.2 Morfologia

A bactéria pode ser encontrada em duas morfologias diferentes, a forma de bacilo espiral e a forma cocóide. A forma espiral é considerada a forma ativa ou viável do micro-organismo, possuindo entre 3 a 5 μm de comprimento e aproximadamente 0,5 μm de diâmetro. Esta bactéria, em condições adversas não forma esporo, porém, podem sofrer alterações no citoesqueleto celular se transformando em uma forma esférica ou cocóide. Muita controvérsia existiu quanto a importância desta forma cocóide na sobrevivência e consequente transmissão bacteriana, entretanto, atualmente existe um consenso de que, em um primeiro momento de exposição a fatores adversos esta forma poderia propiciar um recurso de sobrevivência, mas devido a perda de DNA em uma etapa posterior, a recuperação de uma forma de bacilo viável seria pouco provável, sendo portanto considerada neste caso como morte bacteriana (NILIUS et al., 1993; KUSTERS et al., 1997; MARAIS et al., 1999). A figura 2 demonstra a transformação da bactéria, de sua forma espiralada para forma cocóide.

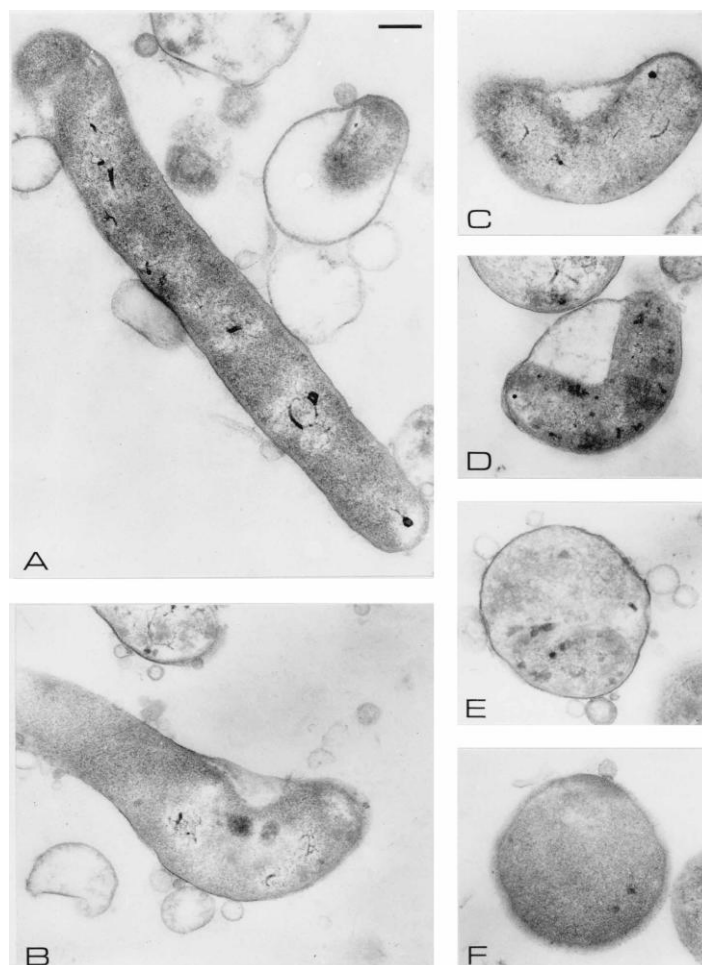


Figura 2 - Transformação da forma espiralada em forma cocóide.

Fonte: Kusters, J. G. *et al.*, 1997.

2 Epidemiologia

A infecção causada pela bactéria *H. pylori* na mucosa gástrica é considerada como a mais freqüente infecção crônica que ocorre em humanos (GRAHAM et al, 2000). Estimou-se que metade da população mundial tenha sido infectada por esta bactéria, tornando-a um dos principais patógenos da espécie humana e destacando-a como um importante problema de saúde pública (IARC, 1994; ADHF, 1997). A Tabela 1 apresenta dados da literatura com relação às doenças gastroduodenais associadas com a infecção pela bactéria *H. pylori*.

Tabela 1: Associação de *H. pylori* em pacientes com queixa dispéptica

Diagnóstico	Nº de estudos revisados	Nº de pacientes estudados	Presença de <i>H. pylori</i> (%)
Dispepsia não-ulcerosa	9	1.293	51
Gastrite crônica	15	1.411	83
Histologia Gástrica normal	15	569	4
Úlcera duodenal	12	620	92
Úlcera gástrica	12	312	69

Fonte: FERNANDEZ, 1999.

As evidências experimentais e clínicas que permitiram o estabelecimento de uma correlação entre a presença da bactéria e as doenças foram obtidas tanto de forma direta quanto indireta. Como evidencia direta pode ser destacado o desenvolvimento de gastrite em voluntários humanos sadios que foram inoculados experimentalmente com uma dose entre 3×10^5 e 10^9 da suspensão bacteriana de *H. pylori*; comprovando o observado, porém com acometimento crônico, em outros experimentos envolvendo modelos animais. Em ambos os experimentos mostrou-se que a eliminação da infecção com a utilização de terapias adequadas permitiu a regressão da doença (FERNANDEZ, 1999).

3 Prevalência

Apesar da incidência de infecção pelo *H. pylori* em cerca de metade da população mundial, a prevalência desta infecção apresenta variação, associada ao desenvolvimento sócio-econômico regional. Notadamente, nos países em desenvolvimento, o número de pessoas infectadas é muito superior ao detectado em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos e Europa, como exemplo, a taxa de infecção oscila entre 10 a 40%, enquanto em países como Brasil, Tailândia e Índia a prevalência atinge entre 80 a 100% (HEATLEY, 1995; MITCHELL, 1999). As tabelas 2 e 3 representam a taxa de infecção global e a prevalência *H. pylori* em países em desenvolvimento.

Tabela 2 - Infecção Global pelo *Helicobacter pylori*

País	%
México, Américas Central e do Sul	70-90
África	70-90
Ásia	50-80
Europa Oriental	70
Europa Ocidental	30-50
Estados Unidos e Canadá	30
Austrália	20

Fonte: WGO Practice Guidelines: *Helicobacter pylori* em países em desenvolvimento, 2006.

Tabela 3 - Prevalência da *Helicobacter pylori* em países em desenvolvimento

Região e país	Adultos (> 21 a) (%)	Crianças
África		
Etiópia	> 95	48% (2-4 a) a 80% (6 a)
Gâmbia	> 95	95% (5 a)
Nigéria	91	82% (5-9 a)
Ásia		
Bangladesh	> 90	58% (0-4 a) a 82% (8-9 a)
China	55	41% (3-12 a)
Índia	88	22% (0-4 a) a 87% (10-19 a)
Sibéria	85	30% (5 a) a 63% (15-20 a)
Sri Lanka	72	67% (6-19 a)
Oriente Médio		
Egito	90	50% (3 a)
Jordânia	82	-
Líbia	94	50% (1-9 a) a 84% (10-19 a)
Arábia Saudita	80	40% (5-9 a)
Turquia	80	64% (6-17 a)
América Central		
Guatemala	65	51% (5-10 a)
México	-	43% (5-9 a)

Continuação da tabela 3

América do Sul		
Bolívia	-	54% (5 a)
Brasil	82	30% (6-8 a) a 78% (10-19 a)
Chile	72	36% (3-9 a)
Peru	-	52% (3 a)

Legenda: a – idade em anos.

Fonte: WGO Practice Guidelines: *Helicobacter pylori* em países em desenvolvimento, 2006. a – idade em anos.

Alguns autores acreditam que a variação na prevalência da infecção em diferentes populações esteja relacionada com a taxa de aquisição da bactéria, que ocorre durante a infância (FELDMAN et al., 1998).

Nos países desenvolvidos, a infecção é relativamente rara em crianças, e é adquirida em uma taxa constante de, aproximadamente, 0,5-2,0% ao ano, alcançando a prevalência de 20-40% na população adulta (ROWLAND; DRUMM, 1998). De modo complementar, Mitchell (1999) verificou que a taxa de infecção em crianças com idade inferior a 10 anos, nesses países, varia de 0 a 5%. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, o *H. pylori* é adquirido durante a primeira infância, e a prevalência da bactéria pode variar de 80 a 100%. Na China, por exemplo, a taxa de infecção pode chegar a 70% entre os adolescentes; e na Nigéria, a prevalência chega a 58% em crianças com um ano de idade, atingindo índice de 91% aos dez anos (THOMAS; PRETOLANI, 1994; ROWLAND; DRUMM, 1998; TORRES et al., 2000).

Em países desenvolvidos o aumento da relação prevalência da infecção com a idade está relacionada ao efeito coorte, pois a maioria das pessoas foi infectada na infância quando as condições sócio-econômicas e de saneamento básico eram piores. Este grupo de pessoas infectadas, obviamente, mudou de faixa etária, e com o passar do tempo as gerações mais jovens foram infectadas menos freqüentemente, devido à melhoria do saneamento básico (VAN DER ENDE et al., 1997). A incidência da infecção por *H. pylori* nos países desenvolvidos é menor do que a taxa detectada em países em desenvolvimento, sugerindo que a situação sócio-econômica realmente seja um fator determinante para a aquisição da infecção (HEATLEY, 1995).

No Brasil, um estudo realizado no estado do Mato Grosso mostrou uma alta taxa de infecção pela *H. pylori* entre as crianças e adolescentes (77,5%), atingindo 84,7% na população adulta (SOUTO et al., 1998). Outro estudo, realizado em Belo Horizonte, apresentou taxa de prevalência para esta bactéria de 34,1% em crianças e 81,7% em adultos (OLIVEIRA et al., 1999). Posteriormente, Rodrigues et al. (2004) verificaram em uma população de baixa renda do Ceará que a prevalência do *H. pylori* aumentava significativamente com a idade, com cerca de 35% das crianças já infectadas até os dois anos e índice de 74,5% de infecção em adolescentes de até 14 anos.

4 Transmissão

A maneira exata como a *H. pylori* é transmitida ainda é controversa. Embora a transmissão interpessoal seja a mais provável, vários estudos nesta área ainda se fazem necessários. Quanto a possíveis reservatórios naturais do *H. pylori* em animais domésticos, os estudos já realizados descartam esta possibilidade (VAN DER ENDE et al., 1997). Existem evidências que indicam para uma transmissão oral-oral ou fecal-oral, sendo essa última mais comum em crianças de países em desenvolvimento. O fato da *H. pylori* possuir a capacidade de sobreviver por determinado tempo no suco gástrico capacita, em teoria, o vômito como um possível meio de transmissão entre pessoas, principalmente crianças (THOMAS; PRETOLANI, 1994; HEATLEY, 1995). Alguns estudos também relataram a ocorrência da *H. pylori* em placas dentárias e em fezes, evidenciando a saliva e a influência das condições sanitárias, respectivamente, como possíveis fatores de transmissão (CELLINI et al., 1994; THOMAS; PRETOLANI, 1994; HEATLEY, 1995).

4.1 Fonte de Infecção

Apesar do grande avanço no conhecimento de diversos aspectos relacionados com a fisiopatologia associada com esta bactéria, muitas questões ainda não foram respondidas em relação aos mecanismos exatos de transmissão. A alta incidência de infecção no mundo antes do início das terapias de erradicação e a associação com o *status* sócio-econômico, em especial relacionado com a presença de

saneamento básico, famílias numerosas e com hábitos comportamentais caracterizados por muito contato associado com pouca higiene, sugerem alguns caminhos sem, entretanto, excluir outras possibilidades (PAJARES, 1995).

4.1.1 Animais como reservatórios de *Helicobacter pylori*

A possibilidade da infecção pela *H. pylori* poder ser transmitida para o homem através de hospedeiros intermediários, como os animais domésticos, surgiu da publicação de dois estudos que mostraram uma prevalência maior de infecção por *H. pylori* em pastores e outros trabalhadores da pecuária, quando comparados com a prevalência em indivíduos que não tinham contato com os animais (MORRIS et al., 1986; VAIRA et al., 1988). Esta sugestão, entretanto, foi posteriormente questionada por alguns pesquisadores que argumentaram a possibilidade do aumento da prevalência sorológica nestes trabalhadores poder ter ocorrido por uma reatividade cruzada entre os anticorpos para a *H. pylori* e de outros micro-organismos gastrointestinais geneticamente aparentados, como *Campylobacter jejuni* (MITCHELL, 1993; FOX, 1995). Dore e colaboradores (1999), entretanto, relataram uma associação positiva entre a prevalência da *H. pylori* em pastores e em seus rebanhos de ovinos e os próprios cães. Neste estudo, 98% dos pastores apresentaram positividade para a infecção por *H. pylori*, uma prevalência significativamente mais elevada que entre os próprios familiares, que não mantinham contato regular com os ovinos (73%) e doadores de sangue da região (43%). Esses autores concluíram que o ciclo de infecção pela *H. pylori* poderia, em determinadas circunstâncias, incluir etapas nos animais domésticos de pessoas infectadas (DORE et al., 1999).

Em outros estudos soroepidemiológicos foram analisadas as possíveis associações entre animais domésticos e a prevalência da *H. pylori* nestes e nos humanos que mantêm uma maior proximidade sem, entretanto, ser possível comprovar esta hipótese de forma conclusiva (WEBB et al., 1994; ANSORG et al., 1995; SATHAR et al., 1997; BODE et al., 1998).

4.1.2 Reservatórios de água como fonte de transmissão de *Helicobacter pylori*

Um dos primeiros estudos que sugeriram reservatórios de água potável como possível fonte de infecção pela *H. pylori*, publicado por Klein e colaboradores (1991), foi realizado com crianças peruanas que obtiam água a partir de poços externos de abastecimento. Estas crianças apresentaram uma prevalência de infecção três vezes maior que em crianças cujas casas possuíam uma fonte de abastecimento de água interna, de uma central de tratamento. Entretanto neste e em estudos posteriores os autores não obtiveram sucesso nas tentativas de cultivo bacteriano, sendo os resultados apresentados baseados na detecção da presença da bactéria através de métodos moleculares de amplificação de DNA. Este aspecto levou os pesquisadores a contradizerem esta associação por argumentarem que a presença de fragmentos de DNA em reservatórios de água não seria suficiente para provar a existência de formas viáveis à colonização humana (HULTEN et al., 1996). Outros estudos realizados em Bangladesh e Coréia também não obtiveram sucesso na tentativa de associar a transmissão da infecção pela *H. pylori* e uma fonte de abastecimento de água (CLEMENS et al., 1996; MALATY et al., 1996). A presença de fragmentos específicos de DNA de *H. pylori* em nascentes de água foi relatada por diversos estudos (HULTEN et al., 1996; SASAKI et al., 1999). Na Suécia, por exemplo, Hulten e colaboradores (1996) demonstraram que 9 de um total de 24 poços particulares, 3 entre 25 poços municipais e 3 de 25 amostras de águas residuais foram positivas para *H. pylori*.

As tentativas de cultivo da *H. pylori* a partir de amostras de água têm-se revelado infrutíferas. Uma das possíveis razões pode estar relacionada com o fato da *H. pylori*, quando exposta a condições ambientais adversas adquirir uma forma viável, mas não cultivável, a forma cocóide (BODE et al., 1993). A controvérsia já é antiga e diversos estudos relataram a elucidação da participação da forma cocóide como fundamental para a elucidação do mecanismo exato de transmissão (EATON et al., 1995; KUSTERS et al., 1997; FAN et al., 1998; ENROTH et al., 1999; VELAZQUEZ; FEIRTAG, 1999). Embora estudos preliminares indicassem que a forma cocóide de *H. pylori* seria metabolicamente ativa, pesquisas posteriores sugeriram que não seriam formas viáveis, porém latentes, representando as etapas iniciais de morte

bacteriana (KUSTERS et al., 1997).

4.2 Transmissão fecal-oral

Em 1994 foi publicado o primeiro trabalho sobre o isolamento de *H. pylori* a partir de amostras de fezes humanas. Nesse estudo, Thomas e Pretolani (1994) descreveram o isolamento de *H. pylori* em fezes de crianças e adultos infectados em Gâmbia (África). Dois anos mais tarde, KELLY e colaboradores (1994) também isolaram esta bactéria em fezes de indivíduos dispépticos infectados. Estudos posteriores, entretanto, mostraram que a *H. pylori* aparentemente não possui capacidade de adaptação para tecidos intestinais, o que dificultaria a sobrevivência deste micro-organismo ao se utilizar desta via de transmissão, além da influência letal da bile, sugerindo que esta transmissão, se possível, deva ser incomum (MITCHELL et al., 1992).

Mapstone e colaboradores (1993) e Russo e colaboradores (1999) descreveram a presença de DNA da *H. pylori* em um número elevado de amostras de fezes de seres humanos contaminados (89,6% e 95,6%, respectivamente). Por outro lado, Namavar e colaboradores (1995), observaram um número bem menor (7%) de DNA desta bactéria em fezes de outras amostras analisadas. Ainda assim, a detecção do material genético da *H. pylori* em fezes humanas não significa, necessariamente, que a bactéria esteja viável e apresente a capacidade de colonizar um novo hospedeiro (MITCHELL, 1999; DELTENRE; KOSTER, 2000). Porém, se considerarmos a possibilidade da *H. pylori* ser transmitida via fecal-oral, muito provavelmente a água seria o meio de propagação. Em um estudo epidemiológico sobre o modo de transmissão de *H. pylori* em crianças peruanas, Klein e colaboradores (1991) propuseram uma associação entre a prevalência do micro-organismo e a água potável. Adicionalmente, Hopkins e colaboradores (1993) sugeriram que a contaminação na agricultura, por meio da utilização de água contaminada na irrigação das lavouras, seguida do consumo de frutas e vegetais não cozidos poderia ser um modo de transmissão da *Helicobacter pylori* (MITCHELL, 1999; DELTENRE; KOSTER, 2000).

4.3 Transmissão oral-oral

Alguns trabalhos apontam para a possibilidade da *H. pylori* permanecer ou transitar pela área bucal, na placa dental ou mesmo na saliva. Além disso, já foi estabelecida a capacidade desta bactéria sobreviver algum tempo no suco gástrico, o que por si só é suficiente para sugerir a possibilidade da transmissão pela via oral-oral (MITCHELL 1999; DELTENRE; KOSTER, 2000).

Em apoio a esta hipótese, Varoli e colaboradores (1991) e Mitchell (1999) mostraram evidências de que o vômito e o refluxo esofágico podem ser considerados como meio de propagação do micro-organismo, pois verificaram que 58% dos pacientes infectados apresentaram *H. pylori* no suco gástrico. Desse modo, sugere-se uma possível transmissão gastro-oral, que ocorreria nos momentos em que um indivíduo entrasse em contato com vômito contaminado, fato muito comum na infância (AXON, 1995; MITCHELL, 1992).

Em alguns estudos sobre a possibilidade de transmissão da *H. pylori* por via oral, Krajden e colaboradores (1989) e Cellini e colaboradores (1995) conseguiram isolar algumas bactérias de placa dentária de pacientes positivos ao micro-organismo. Posteriormente, Desai e colaboradores (1991) em um estudo com pacientes dispépticos da Índia, detectaram cerca de 98% de *H. pylori* em amostras de placa dental. Estes estudos, entretanto, tiveram a metodologia utilizada criticada, pois a presença da bactéria foi analisada através do teste da urease, que não é específico para esta bactéria, possibilitando a ocorrência de falsos positivos devido a presença de outras bactérias da microbiota oral produtoras desta enzima (MITCHELL, 1999). Mesmo assim, estes dados sugerem a possibilidade de transmissão oral-oral ou gastro-oral por esta bactéria (DELTENRE; KOSTER, 2000).

4.3 Transmissão gastro-oral

Alguns estudos demonstraram a possibilidade da transmissão da *H. pylori* através do contato com secreções gástricas. Nestes estudos foi verificada a presença da *H. pylori*, através de PCR e cultivo, em vômito induzido de pacientes infectados (PARSONNET; SHMNUELY; HAGGERTY, 1999). Estes autores sugeriram que a transmissão através dos vômitos poderia ter grande importância na

infecção infantil, principalmente em países em desenvolvimento onde as condutas de higiene são inadequadas e as crianças apresentam comportamento de aglomeração elevado, principalmente em creches e famílias numerosas.

Outra possibilidade de transmissão gastro-oral poderia ocorrer através de tubos endoscópicos e de pinças de biópsias mal desinfetadas. Alguns estudos, entretanto, avaliaram a eficiência da desinfecção de endoscópios pelos procedimentos recomendados, e concluiu-se que os métodos de desinfecção são eficientes, caso sejam respeitadas todas as etapas do procedimento de desinfecção (NURNBERG et al. 2003; GODOY et al, 2003).

5 Fatores de risco

Diversos estudos foram realizados nas últimas décadas na tentativa de identificar os aspectos mais importantes para a transmissão da infecção por *H. pylori*. Apesar das surpreendentes dificuldades em elucidar o mecanismo de transmissão com os recursos tecnológicos de investigação que os pesquisadores dispõem atualmente, parece certo que o *status* socioeconômico baixo, famílias numerosas com muitas crianças que dividem o mesmo quarto e, às vezes, a mesma cama, e hábitos comportamentais como o de algumas mães provarem o alimento antes de alimentar as crianças são aspectos associados com o aumento de infecção em seres humanos (MALATY et al., 1998).

5.1 Status socioeconômico

Diversos estudos têm demonstrado que o status sócio-econômico de uma população, especialmente para as crianças, é considerado como um fator determinante para a infecção por *H. pylori* (MALATY; GRAHAM, 1994; VAN ZANTEN, 1995; MURRAY et al., 1997; ROTHENBACHER et al., 1997).

Baixos níveis de saneamento básico foram associados com o aumento da prevalência de infecção por *H. pylori* (AL-MOAGEL et al., 1990; PEREZ-PEREZ et al., 1990; MENDALL et al., 1992), em especial, a falta de água canalizada em casas durante a infância (MENDALL et al., 1992). Curiosamente, soldados irlandeses expostos a condições de vida e de saneamento básico deficientes por 6 meses não

mostraram qualquer mudança significativa na prevalência de infecção por *H. pylori*, sugerindo que, por motivos ainda desconhecidos, haja uma maior facilidade em se adquirir esta infecção durante a infância (BASSO et al., 1994). Hábitos culturais e comportamentais também são de fundamental importância, tanto em países em desenvolvimento quanto em algumas populações de países desenvolvidos (TORRES et al., 1998; OLMOS et al., 2000).

5.2 Predisposição genética

Até o momento, existem poucos estudos que tenham analisado o papel da predisposição genética em relação à infecção por *H. pylori*. Em uma tentativa para analisar a importância de fatores genéticos sobre a aquisição de infecção por *H. pylori*, Malaty e colaboradores (1994) compararam a seroprevalência de infecção por *H. pylori* em 100 e 169 gêmeos monozigóticos criados juntos e criados separados. Os resultados deste estudo demonstraram um coeficiente de correlação de aproximadamente 0,66 para a importância relativa da predisposição genética para a aquisição da infecção por *H. pylori*, sendo os valores complementares relacionados com fatores ambientais (20%) e não ambientais (23%). Como resultado deste estudo, os autores concluíram que efeitos genéticos influenciam a aquisição da infecção por *H. pylori*.

6 Patogenicidade

6.1 Fatores de colonização

A sobrevivência da *H. pylori* no ambiente gástrico pode ser atribuída ao desenvolvimento de algumas características, sendo a mais importante delas a capacidade de colonizar a superfície deste epitélio, logo abaixo da camada do muco (MCGOWAN et al., 1996). Os mecanismos de colonização desta bactéria, de maneira geral, seguem três passos: penetração, ajuste ao meio e aderência (BEACHEY, 1981).

Os fatores de penetração são aqueles que possibilitam a infecção da bactéria no organismo. São a sua forma espiralada e a presença de cinco ou seis flagelos

unipolares que permitem que a *H. pylori* se movimente rapidamente da luz do estômago, onde o pH é muito ácido, até uma área onde o pH seja menos ácido, podendo assim tornar este ambiente nas condições de pH neutro favoráveis para seu crescimento. Seus flagelos são compostos por subunidades de flagelina e cobertos por uma dupla camada de fosfolipídeos que têm como finalidade protegê-los da acidez gástrica (SUERBAUM et al., 1993; MARAIS et al., 1999).

A *H. pylori* é caracterizada bioquimicamente por sua alta taxa de produção de urease, e esta é uma enzima essencial para a sua colonização, pois favorece seu ajuste ao meio. O papel desta é hidrolisar a uréia da mucosa gástrica, transformando-a em dióxido de carbono e amônia, a qual tampona a acidez gástrica e otimiza o pH ao redor da bactéria permitindo, assim, o crescimento bacteriano (MCGOWAN et al., 1996). A transformação da uréia em amônia também funciona como fonte de nitrogênio para a síntese de proteínas, necessárias para a aderência bacteriana (EATON; KRAKOWA, 1995).

Outra enzima que exerce um papel importante na colonização é a catalase, que protege a bactéria contra os efeitos danosos dos metabólitos de peróxido de hidrogênio produzidos pelos neutrófilos, permitindo assim a sobrevivência da bactéria na superfície da mucosa gástrica inflamada (PAJARES, 1995; MCGOWAN et al., 1996).

7 Doenças associadas

A presença da *H. pylori* está associada a diversas doenças, tais como gastrite crônica, úlcera péptica, linfoma MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) e o câncer gástrico. A diversidade sintomática parece estar ligada às características genéticas bacterianas, além de fatores genéticos do hospedeiro, que juntamente com fatores ambientais, como uma dieta inadequada e a administração contínua de alguns medicamentos como os anti-inflamatórios não esteroidais influenciam o tipo de doença associada com a infecção. (MOBLEY, 1997; VAN DOORN et al., 1997; MARAIS et al., 1999).

7.1 Refluxo gastroesofágico

Um dos aspectos mais controversos e de grande interesse atual é o papel de *H. pylori* na doença do refluxo gastroesofágico (DRGE).

A Doença do Refluxo Gastroesofágico é uma das mais freqüentes queixas dispépticas na prática médica. A enfermidade agrupa sob a mesma denominação apresentações clínicas tão distintas como a pirose ocasional, a tosse crônica e a asma refratária e, no plano diagnóstico, condições endoscópicas muito variadas, como, de um lado, a ausência de lesão e, de outro, a presença de complicações importantes, como o esôfago de Barrett (BLASER, 1998).

Um conceito emergente é o de que a *H. pylori* possa apresentar-se não só como comensal, mas também com uma relação simbiótica com o homem. Inicialmente, estudos publicados mostraram uma incidência significativamente menor de infecção pela *H. pylori* em pacientes com esofagite de refluxo do que em grupos controle (HACKELSBERGER, 1997; BLASER, 1998). Além disso, observou-se que pacientes infectados com cepas *cagA*⁺ (marcador genético para patogenicidade tipo 1) apresentavam DRGE menos severa, assim como menor incidência de esôfago de Barrett e de adenocarcinoma de esôfago distal do que os não infectados. Outros estudos, ainda, mostraram um aumento na prevalência de esofagite erosiva após a erradicação do *H. pylori*. Labenz e Malfertheiner (1997) em estudo prospectivo demonstraram que aproximadamente 25% dos pacientes ulcerosos duodenais que tiveram a *H. pylori* erradicada desenvolveram esofagite erosiva em um período de 3 anos após a erradicação. Estes estudos iniciais geraram uma polêmica quanto a um possível papel protetor da *H. pylori* em algumas situações relacionadas com DRGE.

Nas últimas décadas também foi observada uma diminuição da prevalência de infecção por *H. pylori* devido ao tratamento de erradicação com antibióticos, associado a um aumento da incidência de DRGE nos países em desenvolvimento (EL SERAG; SONNENBERG, 1998). Alguns estudos continuaram demonstrando que a erradicação de *H. pylori* em pacientes com úlcera duodenal poderia provocar DRGE (FELDMAN et al., 1999; FALLONE et al., 2000). Estes resultados, entretanto, não foram confirmados por outros pesquisadores (TEFERA et al., 1999; VAKIL et al., 2000). Resultados conflitantes também foram observados em estudos que avaliaram

a associação entre a DRGE e a infecção por *H. pylori*. Em alguns, os índices de infecção por *H. pylori* foram menores em pacientes com DRGE do que na população controle (KOIKE et al., 2001), enquanto em outros a prevalência da infecção por *H. pylori* foi semelhante (NEWTON et al., 1997; TEFERA et al., 1999) ou mesmo maior (MANES et al., 1999).

Pacientes colonizados por linhagens *cagA*⁺ costumam apresentar inflamação gástrica mais grave (BLASER et al., 1995; QUEIROZ et al., 1998) o que pode explicar o menor nível de produção de ácido e o aumento da proteção contra a DRGE. De fato, recentemente foram publicados estudos associando fatores de virulência bacterianos com proteção contra lesões mais severas de DRGE, como carcinoma distal de esôfago ou esôfago de Barrett (VICARI et al., 1998). Entretanto, variáveis como o número de pacientes incluídos, a sensibilidade dos métodos de determinação da infecção pela bactéria, ou mesmo as diferenças entre as populações estudadas reforçam a necessidade de novos estudos que, além destes aspectos, considerem o local da infecção pela bactéria no estômago, a capacidade de expressão dos fatores de virulência que podem servir como marcadores genéticos e a relação da erradicação bacteriana com a alteração do pH gástrico e o efeito no esôfago de pacientes suscetíveis (VICARI et al., 1998).

Um método diagnóstico empregado para avaliar e diagnosticar a DRGE é a pHmetria esofágica por 24 horas. Este método, além de altamente sensível e específico, tem como vantagens a possibilidade de relacionar eventos como apnéia, crises de broncoespasmo, dor retroesternal, tosse, mudanças de posição, irritabilidade e distúrbio do sono com presença de refluxo gastroesofágico (RGE). Esta técnica permite identificar também diversos parâmetros, tais como, número de episódios de RGE por 24hs, número de RGE com duração superior a 5 minutos, duração do refluxo mais longo e tempo total de RGE, considerando a porcentagem do tempo decorrido com pH inferior a 4 (FLORA-FILHO et al., 2000).

O exame endoscópico é, geralmente, o método de escolha para o diagnóstico das lesões causadas pelo refluxo gastroesofágico, permitindo avaliar a gravidade da esofagite e realizar biópsias onde e quando necessário. São consideradas conseqüências do refluxo gastroesofágico as erosões, úlceras, estenose péptica e esôfago de Barrett (ARMSTRONG, 1996; LUNDELL et al., 1999).

A existência de várias classificações endoscópicas que se baseiam nos graus de esofagite demonstra a dificuldade em se uniformizar diagnósticos e, conseqüentemente, em comparar os resultados dos diferentes estudos. As classificações mais empregadas são a de Savary-Miller modificada (Tabela 4) e, mais recentemente, a de Los Angeles (LUNDELL et al., 1999) (Tabela 5). No Brasil a classificação de Los Angeles foi recomendada como preferencial pelo I Consenso Brasileiro de Doenças do refluxo gastroesofágico.

Tabela 4 - Classificação endoscópica de Savary-Miller modificada

Grau	Achado
0	Normal
1	Uma ou mais erosões lineares ou ovaladas em uma única prega longitudinal
2	Várias erosões situadas em mais de uma prega longitudinal, confluyente ou não, mas que não ocupam toda a circunferência do esôfago
3	Erosões confluentes que se estendem por toda a circunferência do esôfago
4	Lesões crônicas: úlceras e estenose, isoladas ou associadas às lesões nos graus 1 e 3
5	Epitélio colunar em continuidade com a linha Z: circunferencial ou não, de extensão variável, associado ou não a lesões de 1 a 4

Fonte: LUNDELL et al., 1999

Tabela 5 - Classificação endoscópica de Los Angeles

Grau	Achado
A	Uma ou mais erosões menores do que 5 mm
B	Uma ou mais erosões maiores do que 5 mm em sua maior extensão, não contínuas entre os ápices de duas pregas esofágicas
C	Erosões contínuas (ou convergentes) entre os ápices de pelo menos duas pregas, envolvendo menos que 75% do órgão
D	Erosões ocupando pelo menos 75% da circunferência do órgão

Fonte: LUNDELL et al., 1999

7.2 Gastrite

A gastrite causada pela *H. pylori* é uma das formas mais comuns de gastrites. As gastrites podem ser classificadas como agudas ou crônicas, de acordo com características sintomatológicas e inflamatórias diferenciais.

A forma aguda ocorre quando o indivíduo tem sua primeira infecção pela *H. pylori*, ocorrendo no processo inflamatório uma infiltração característica de neutrófilos e eosinófilos na lâmina própria, edema, congestão e re-epitelização celular, característicos de uma defesa inata do sistema imune. Geralmente, nesta fase, os pacientes são assintomáticos, podendo ocorrer desconforto gástrico, dor epigástrica, náuseas e vômitos em alguns casos (CRABTREE, 1994).

A fase aguda é normalmente de curta duração. Em uma minoria de pessoas infectadas, e especialmente na infância, os micro-organismos podem ser erradicados espontaneamente, pelo sistema de defesa inato. Na maioria, porém, a resposta imune não consegue eliminar a infecção e ao longo das próximas 3 ou 4 semanas ocorre uma concentração gradual e constante de células inflamatórias que predominam em um exame histológico de biópsia gástrica. Como consequência, o diagnóstico de uma gastrite aguda neutrofílica evolui para uma gastrite crônica ativa (SOBALA et al., 1991).

Na forma crônica, a inflamação gástrica de longa duração induzida pela *H. pylori* evolui frequentemente para uma gastrite atrófica, que é considerada a primeira etapa importante na histogênese do câncer gástrico. A distribuição da bactéria na

mucosa gástrica pode ser homogênea, uma pangastrite, que em parte dos pacientes se desenvolve para uma metaplasia intestinal (CASSARO et al., 2000). Quando ocorre uma atrofia de uma grande parte do corpo gástrico, o quadro evolui para uma hiposecreção de ácido e níveis diminuídos de pepsinogênio. Esta baixa acidez do suco gástrico facilitaria a colonização do estômago por outra bactéria, que poderia promover a formação de fatores carcinogênicos como, por exemplo, compostos nitrogenados, associados com a metilação do DNA celular. Este comportamento é muito importante, pois foi observado que na gastrite crônica atrófica ocorre um aumento na proliferação das células epiteliais da mucosa, e como consequência, a presença de células relativamente imaturas nas glândulas gástricas. (CASSARO et al., 2000)

7.3 Úlcera

A infecção pela *H. Pylori* é um fator importante na etiologia da doença ulcerosa péptica (COHEN, 2000). Sua associação é mais evidente com a úlcera duodenal do que com a gástrica e acredita-se que o mecanismo de lesão seja diferente nestas duas localizações.

Nas úlceras duodenais a colonização bacteriana e a gastrite associada predominam no antro. Desta atividade inflamatória resulta a produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral e interleucina 8, que influenciam a liberação de somatostatina e gastrina pelas células D (células secretoras de somatostatina) e G (células secretoras de gastrina). Além disto, a alta concentração de amônia resultante da ação da urease produzida pelo micro-organismo, reduz a sensibilidade das células D antrais ao ácido, reduzindo o efeito inibitório sobre a liberação de gastrina. A consequência de tais alterações é a hipersecreção de ácido pelo estômago, achado quase universal, nos pacientes com úlceras duodenais ou duodenites (EL-OMAR et al., 1995; BEALES et al., 1997).

A infecção também está associada a uma redução na secreção de bicarbonato no duodeno. Este fator, associado ao aumento da acidez que extravasa pelo piloro e atinge o duodeno, é um importante fator associado com o desenvolvimento de metaplasia gástrica. A *H. pylori* é capaz de colonizar estas áreas de metaplasia no duodeno, agora com características gástricas, levando a uma duodenite com

prejuízo para a integridade da mucosa e, eventualmente, o desenvolvimento de úlceras (HOGAN et al. 1996). Existem cepas da bactéria que provavelmente induzem a um maior risco de lesões duodenais. Dentre elas, a presença do gene *cagA* e da variantes s1a/m1 do gene *vacA* parecem ser as mais relevantes, mas o mecanismo de lesão a eles relacionados não está totalmente esclarecido (SEGAL et al., 1999).

Nos pacientes com úlceras gástricas, a gastrite associada à *H. pylori* é do tipo difusa ou predominante no corpo. A inflamação desta região, onde se concentram as células parietais, leva a uma redução da secreção ácida. Alterações genéticas do hospedeiro como polimorfismo do gene IL-1 β aumentam a resposta de citocinas à infecção, levando a um maior risco de atrofia, úlcera e câncer. A colonização é mais evidente na transição entre antro e corpo e é nesta região que predominam as úlceras gástricas (UEMURA et al., 2001).

7.4 Linfoma MALT

Em 1992, Stolde correlacionou o Linfoma MALT do estômago com a presença da *H. pylori*. O tecido linfoide não é encontrado em estômago normal e o seu aparecimento se deve, na maioria das vezes, à infecção por *H. pylori* (GENTA et al., 1993). Hussel e colaboradores em 1993, estudaram a resposta imunológica do Linfoma MALT de baixo grau *in vitro*, quando exposto a *H. pylori*, e observaram uma proliferação de linfócitos T específicos e, posteriormente, aumento de imunoglobulina no tumor e liberação de interleucina 2. Com a publicação dos primeiros estudos epidemiológicos demonstrou-se a ligação e os riscos de desenvolvimento de linfoma gástrico nos portadores da bactéria (PARSONNET et al., 1994).

Diversas evidências sugerem uma ligação entre a gastrite crônica devido ao *H. pylori* e o Linfoma Gástrico Primário do tipo MALT. Entre eles pode-se destacar a resposta imunológica crônica com formação de folículos linfóides no estômago associada com a infecção pela *H. pylori* (HUSSEL et al., 1993), a presença de micro-organismos na mucosa gástrica de praticamente todos os casos, e a regressão do linfoma MALT de baixo grau após a erradicação da *H. pylori* (GENTA et al., 1993; HUSSEL et al., 1993; AHMAD et al., 2003).

Em 1993, Wotherspoon e colaboradores, publicaram uma proposta de ordenamento dos sintomas evolutivos provocados pela *H. pylori* e o desenvolvimento de Linfoma MALT, com índices de 0 a 5 em ordem de gravidade, descrito a seguir:

- 0 – Normal
- 1 – Gastrite crônica ativa
- 2 – Gastrite crônica ativa com folículos linfóides
- 3 – Infiltrado linfóide suspeito, provável reação
- 4 – Infiltrado linfóide suspeito, provável linfoma
- 5 – Linfoma MALT.

Neste processo evolutivo, a infecção por *H. pylori* estimularia a produção de interleucinas pela mucosa, levando a ativação de neutrófilos e, em sequência, a produção de radicais livres de oxigênio induzindo alterações do DNA por bloqueios nos mecanismos de reparação dos mesmo (ROLLISON et al., 2003).

7.5 Câncer gástrico

Marshall e Warren em 1984 foram os primeiros a postular uma relação casual entre a *H. pylori* e o câncer gástrico. Esta associação foi posteriormente confirmada por trabalhos retrospectivos, associações epidemiológicas, sendo a bactéria reconhecida em 1994 pela Agencia Internacional para Pesquisa sobre o Câncer como um agente carcinogênico tipo 1 (IARC, 1994).

Na maioria dos casos, a gastrite crônica precede a formação de câncer gástrico. Uma grande porção de tumores clínicos ocorre em conexão com formas avançadas de gastrite crônica, como por exemplo, a gastrite crônica atrófica acentuada e a metaplasia intestinal extensa (SIPPONEN et al., 1998).

Nos países desenvolvidos, a incidência de carcinoma gástrico vem decrescendo acentuadamente. Esta queda tem relação evidente com as alterações de alimentação, higiene, medidas sanitárias e o conseqüente decréscimo na taxa de prevalência da *H. pylori* (SIPPONEN et al., 1998; AXON, 2002).

Em 1965, Lauren classificou o câncer gástrico em dois subtipos, os quais apresentam aspectos epidemiológicos, etiológicos e prognósticos diferentes: a forma difusa e a forma intestinal (LAUREN, 1965). A forma intestinal é a mais comum e

caracteriza-se pela formação de estruturas tubulares semelhantes a glândulas, que mimetizam as glândulas intestinais. Esta forma de câncer desenvolve-se como consequência da gastrite crônica atrofica, via metaplasia glandular e displasia (HOUGHTON; WANG, 2005). A forma difusa é menos diferenciada, formada por células pequenas, pouco coesivas. São tumores mais agressivos, infiltram-se por todo o estômago e não apresentam estruturas glandulares. O câncer se desenvolve no estômago seguindo a inflamação crônica sem passar pelas etapas intermediárias de gastrite atrófica ou metaplasia intestinal. A gravidade da inflamação da mucosa e as características do hospedeiro podem induzir diretamente eventos mutagênicos que por fim, induzem ao câncer (NARDONE et al., 2004).

Estudos indicam que ambas as formas de câncer gástrico estão fortemente associadas à infecção pela *H. pylori* (PETERSON, 2002). Portanto, mesmo que sejam caracterizados por diferentes caminhos fisiopatológicos, a participação da infecção pela bactéria é um fator importante. A infecção pela *H. pylori* aumenta em duas a três vezes o risco para o câncer gástrico em estudos que compararam com grupos controles de pacientes com câncer gástrico sem a infecção (HUANG; HUNT, 2000). Em pacientes com gastrite predominantemente de antro, uma condição estreitamente associada à úlcera duodenal, o risco relativo para adquirir o câncer gástrico relacionado à *H. pylori* é muito baixo, embora a infecção possa causar ambas as patologias. Por outro lado, pacientes com úlcera gástrica, com pangastrite ou gastrite predominante de corpo e hipocloridria têm maior propensão de apresentar câncer gástrico relacionado ao *H. pylori*. Além disso, a presença do marcador genético *cagA* aumenta significativamente o risco de câncer gástrico. (HUANG et al., 2003)

8 Fatores de virulência

Além dos fatores de colonização anteriormente mencionados, a *H. pylori*, assim como outras bactérias patogênicas, causam danos aos tecidos através da liberação de toxinas. Na década passada, foram identificados alguns genes do *H. pylori* relacionados ao desenvolvimento de doenças gástricas (BLASER et al., 1995; XIANG et al., 1995; BLASER, 1997).

Primeiramente foi descrita uma citotoxina com capacidade de produzir vacúolos (VacA). Esta proteína é codificada pelo gene *vacA*, que é encontrado em todas as linhagens de *H. pylori*. Entretanto, cerca de 50% das cepas produzem a citotoxina ativa, capaz de induzir a vacuolização em células eucariontes (COVER; BLASER, 1992; COVER et al., 1994; ATHERTON et al., 1995).

Outra proteína associada com as manifestações clínicas é o antígeno de superfície CagA, codificado pelo gene *cagA*. Este não está presente em todas as linhagens de *H. pylori*, sendo considerado como marcador para presença da ilha de patogenicidade (*cag* PAI), que é uma seqüência de 40 genes que se posicionam próximos no cromossomo bacteriano, responsáveis pela construção de uma estrutura protéica complexa associada com a secreção de proteínas para o exterior da célula bacteriana, incluindo algumas toxinas (VAN DOORN et al., 1998). As cepas de *H. pylori* *cagA* positivo (*cagA*+), chamadas de tipo 1, parecem ser mais prevalentes em pacientes com úlceras pépticas quando comparadas à pacientes com gastrite. Recentemente, alguns genes também estão sendo relacionados a ulcerações, como é o caso do *cagE*, também presente na *cag* PAI, e o gene *iceA*. (FALLONE et al., 2000; VAN DOORN et al., 2000).

8.1 Citotoxina vacuolizante VacA

A produção da citotoxina vacuolizante (VacA), codificada pelo gene *vacA*, é um importante fator de virulência do *H. pylori* por induzir a vacuolização citoplasmática em células eucariontes (MONTECUCCO et al., 1999).

Embora todas as cepas desta bactéria secretem o produto VacA, foi detectada por vários autores uma considerável variação entre as linhagens na atividade vacuolizante desta toxina (ATHERTON et al., 1995; FORSYTH et al., 1998). Acredita-se que a heterogeneidade alélica de *vacA* possa ser um fator determinante nas variações das manifestações clínicas entre pacientes infectados por *H. pylori* (COVACCI et al., 1999; GERHARD et al., 1999; VAN DOORN et al., 1999).

Existem duas regiões variáveis no gene *vacA*. A primeira é uma região de aproximadamente 50 pb denominada *s*, localizada na região 5' terminal e que codifica o peptídeo sinal (figura 1). De acordo com a seqüência gênica, dois subtipos (*s*1 e *s*2) podem ser identificados. Além disso, o alelo *s*1 pode ser classificado como

s1a, s1b, s1c (ATHERTON et al., 1995; VAN DOORN et al., 1998). A segunda região que apresenta uma grande heterogeneidade, chamada de **m**, apresenta aproximadamente 700 pb e está localizada na região mediana do gene (ATHERTON et al., 1995). Esta região, de acordo com a seqüência gênica, apresenta os subtipos **m1** e **m2**, sendo que o m2 ainda pode ser classificado como m2a e m2b (ATHERTON et al., 1995; VAN DOORN et al., 1998).

A combinação em mosaico desses tipos alélicos distintos (s e m) determina a produção e a especificidade da atividade da citotoxina e está associada à patogenicidade bacteriana (VAN DOORN et al., 1998; WANG et al., 1998). Todas as linhagens possuem um dos tipos de seqüência sinal e um dos dois tipos da região mediana, assim sendo podemos ter as combinações s1m1, s1m2, s2m2 e a menos comum s2m1 (MORALES-ESPINOSA et al., 1999; MARTINEZ et al., 2001). Análises bioquímicas revelaram que linhagens *vacA* s1m1 produzem uma citotoxina muito mais ativa *in vitro* do que as cepas *vacA* s1m2 e as bactérias *vacA* s2m2 produzem citotoxinas inativas (ATHERTON et al., 1995).

O gene *vacA* codifica uma citotoxina vacuolizante com aproximadamente 140 kDa de massa (Figura 3). Um fragmento amino-terminal na seqüência sinal e um fragmento carboxi-terminal são proteoliticamente retidos durante o processo de secreção da VacA, a toxina madura que é exportada para o espaço extracelular possuindo aproximadamente 88 KDa, com aproximadamente 821 aminoácidos (YAHIRO et al., 1999; NGUYEN et al., 2001).

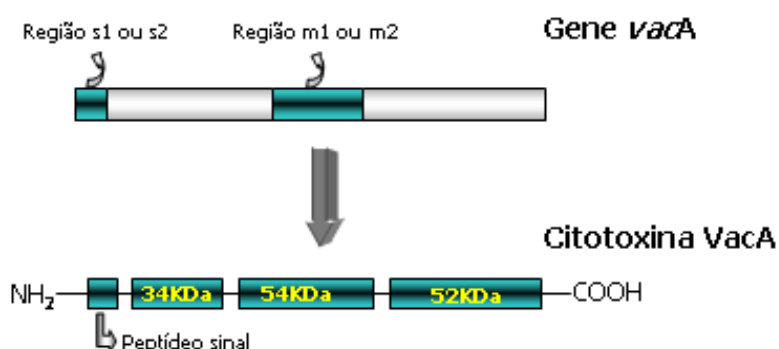


Figura 3 – Esquema que ilustra o gene *vacA*, evidenciando as regiões que codificam o peptídeo sinal (s) e a mediana (m) e o produto primário traduzido pelo gene.

Fonte: (COVER; BLASER, 1992)

Desse modo, a toxina VacA é secretada para o espaço extracelular e também é retida parcialmente na superfície celular bacteriana. Em pH neutro a VacA agrupa-se em um grande complexo oligomérico, solúvel em água, composto predominantemente de 12 ou 14 monômeros idênticos (LUPETTI et al., 1996; COVER et al., 1997). Quando exposto a pH ácido ou alcalino, este complexo desassocia-se em monômeros e estes estão associados a um aumento da citotoxicidade da VacA (YAHIRO et al., 1999; MCCLAIN et al., 2000). Os efeitos celulares induzidos pela proteína VacA incluem a vacuolização, alteração da função endolisossômica, formação de poros na membrana plasmática, apoptose e permeabilização da camada epitelial. A VacA atinge alguns diferentes alvos celulares, incluindo as vesículas endocíticas, as mitocôndrias, o citoesqueleto e as junções das células epiteliais (PAPINI et al., 2001).

Vários estudos têm considerado os genótipos *vacA* (s1m1 e s1m2) como marcadores para a patogenia da *H. pylori*, devido à produção de citotoxina vacuolizante, que pode causar danos epiteliais e estão associados ao desenvolvimento de doenças gástricas (ATHERTON et al., 1997; VAN DOORN et al., 1998).

A sequência de nucleotídeos da região mediana do gene *vacA* costuma estar correlacionada aos níveis de citotoxina produzidos, desse modo o *vacA* m1 parece ser mais freqüente em pacientes com injúrias do epitélio gástrico. Sabe-se que as proteínas oriundas de *vacA* m1 e *vacA* m2 podem reagir com diferentes receptores das células epiteliais gástricas humanas, resultando em uma resposta fisiológica particular (ATHERTON et al., 1997).

A relação entre o genótipo *vacA* s1m1 e o desenvolvimento de úlcera péptica não é uma unanimidade na literatura (ZHENG et al., 2000; ARENTS et al., 2001). Assim como relatado por outros autores, foi detectado uma relação significativa entre os mosaicos *vacA* e a presença de úlcera duodenal, (GODOY et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003). Alguns estudos realizados *in vitro* apóiam esta associação, indicando que a citotoxina VacA s1m1 teria maior atividade vacuolizante, causando assim maiores lesões no epitélio gástrico (COVER, et al. 1992; ATHERTON, et al. 1995; LEUNK, et al. 1988). A figura 4 representa um esquema das atividades biológicas de VacA.

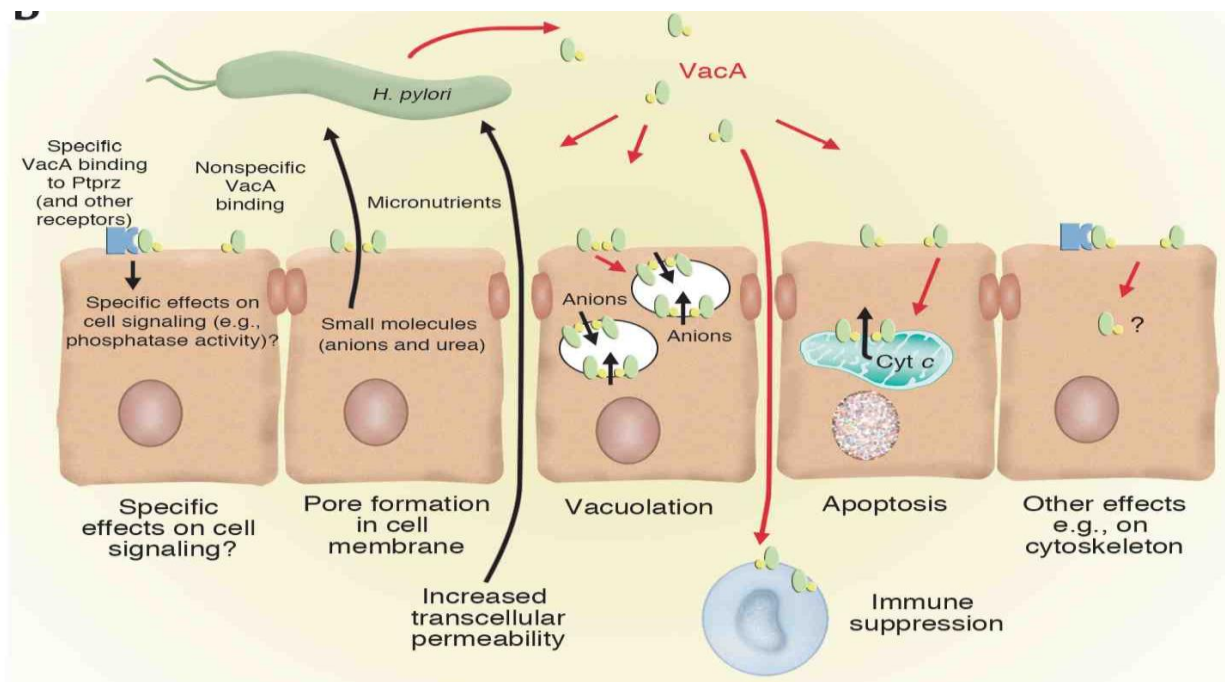


Figura 4 - Esquema das atividades biológicas relacionadas com a patogenicidade.

Fonte: Modificado de BLASER et al. 2004.

8.2 CagA e CagE

O antígeno de superfície CagA é um possível fator de virulência do *H. pylori* e é codificado pelo gene *cagA*. A produção desta proteína está associada com a progressão das doenças gastrointestinais (TUMURU et al., 1993; COVER et al., 1995; BLASER et al., 1995; CENSINI et al., 1996). O gene *cagA* é convencionalmente usado como um marcador da ilha de patogenicidade *cag* PAI contida nas linhagens mais virulentas, chamadas de tipo 1. Alguns estudos sugerem que não se use apenas o gene *cagA* como marcador da presença da PAI, pois esta pode não estar íntegra. Linhagens obtidas de pacientes dispépticos, podem possuir a maioria dos genes da PAI, incluindo a região promotora do gene *cagA*, mesmo que ele esteja ausente, sugerindo assim que outros genes, como o *cagE*, devam ser usados como marcador da presença da ilha de patogenicidade (MAEDA et al., 1998; IKENOUE et al., 2001). Células de *H. pylori* com uma ilha de patogenicidade *cag* íntacta possuem um pilus composto pela proteína CagY. O produto de CagA é injetado no citoplasma da célula hospedeira, onde resíduos de tirosina (Y) próximos à extremidade carboxi (COOH) terminal são fosforilados. Os CagA fosforilados interagem com diversas vias de transdução de sinal da célula hospedeira, afetando

diversos fenótipos, como morfologia celular, proliferação e apoptose (BLASER et al., 2004). Como demonstra a figura 5.

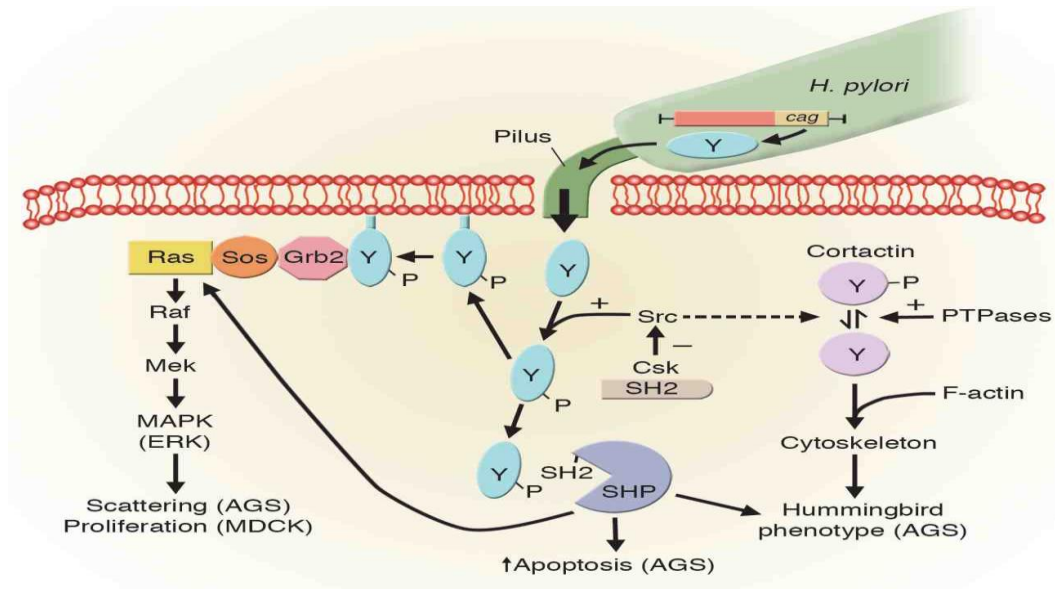


Figura 5 - Representação esquemática das interações de CagA com células epiteliais.

Fonte: Modificado de BLASER et al., 2004.

As linhagens *cagA*+ são conhecidas por induzir a secreção de IL-8 pelas células epiteliais, um importante mediador da migração de neutrófilos durante o processo inflamatório (CRABTREE et al., 1994). Entretanto, recentes estudos têm indicado que não apenas o *cagA*, como outros genes contidos na ilha, são responsáveis pela indução de IL-8. A inativação de *cagE* pode causar uma redução da habilidade do *H. pylori* em induzir a produção IL-8 (SHARMA et al., 1995; CENSINI et al., 1996; AKOPYANTS et al., 1998; MAEDA et al., 1998; OGURA et al., 1998)

A ligação entre os genes *cagA* e *cagE* com as manifestações clinicamente distintas mantêm-se controversa. De acordo com os resultados de pesquisadores, acredita-se que os genes *cagA* e *cagE* não deveriam ser utilizados como marcadores para “predizer” as manifestações clínicas causadas nos pacientes pela infecção do *H. pylori* (GODOY et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003).

8.3 IceA

Há alguns anos atrás Peek e colaboradores (1998) descreveram um gene denominado *iceA* (*Induced by Contact with Epithelium*), estes autores mostraram que haviam duas variantes para este gene, os alelos *iceA1* e *iceA2*.

A expressão de *iceA1* é regulado através do contato da bactéria com células epiteliais (PEEK et al., 1998; VAN DOORN et al., 1998). O produto gênico de *iceA1* é uma provável endonuclease de restrição, que apresenta uma homologia de cerca de 60% com os nucleotídeos do gene *nlalIIR* da *Neisseria lactamica*, que codifica a endonuclease de restrição *NlalI* CATG[↓] - (VAN DOORN et al., 1998).

A relação do produto gênico *iceA1* com a infecção humana ainda não está muito clara (VAN DOORN et al., 1998; ITO et al., 2000), embora a presença do alelo *iceA1* tenha sido relacionada a ulcerações devido a um aumento da indução de IL-8 e com a intensidade de infiltração neutrofílica (NISHIYA et al., 2000; PEEK et al., 2000). Vários estudos epidemiológicos falharam ao tentar associar a presença desse alelo com úlceras pépticas (KIDD et al., 2000; KIM et al., 2001; MIEHLKE et al., 2001; GODOY et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003), sugerindo que esta variante alélica não deveria ser usado como um marcador para prever as manifestações clínicas causadas em pacientes infectados pela *H. pylori*.

Em contraste com o *iceA1*, o tipo alélico *iceA2* não apresenta homologia com proteínas conhecidas, e sua estrutura revela padrões de repetições de cassetes. A sua forma mais comum codifica uma proteína de 59 aa (aminoácidos), o qual possui dois domínios conservados nas extremidades (14 aa e 10 aa, respectivamente) e outros três domínios internos com 13, 16 e 6 aa respectivamente (Figura 6). Análises das sequências de várias linhagens mostraram que o cassete interno, composto por 35 aa, pode estar ausente ou se repetir em até três vezes, resultando assim em proteínas compostas por 24, 59, 94 ou 129 aa (FIGUEIREDO et al., 2001). O gene *iceA2* apresenta aproximadamente 40% de homologia com os nucleotídeos do *iceA1*, mas sua estrutura gênica é totalmente diferente (PEEK et al., 1998; Van DOORN et al., 1998).

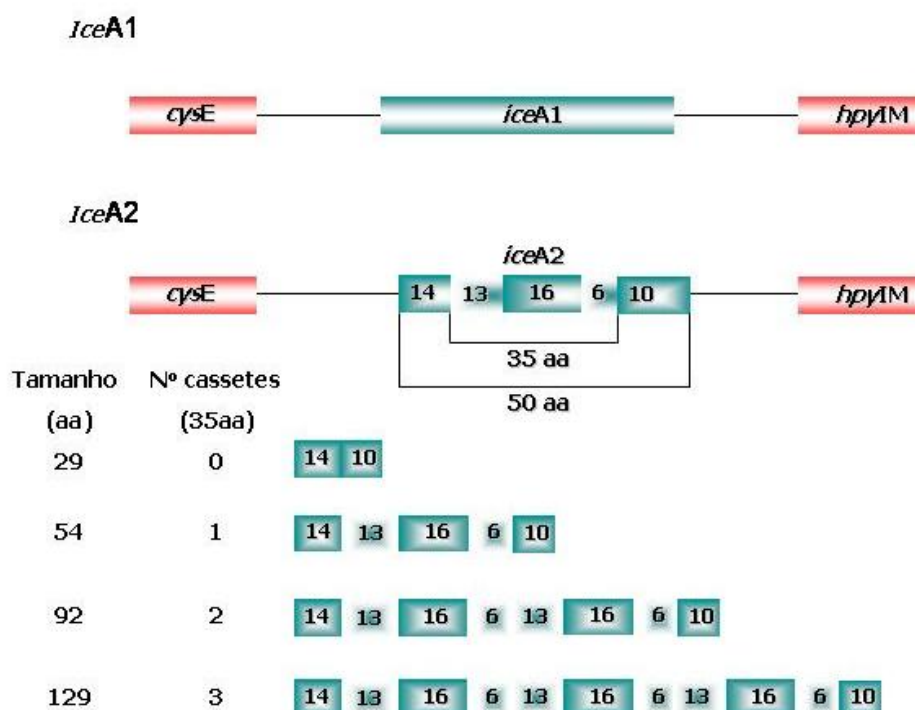


Figura 6 - Representação esquemática do gene *iceA* que se encontra entre os genes *cysE* e *hpyIM*. Comparação entre os alelos *iceA1* e *iceA2*; e os subtipos de *iceA2*.

Fonte: PEEK et al., 2000.

Muito embora alguns estudos epidemiológicos indiquem que o alelo *iceA1* foi mais frequentemente detectado (VAN DOORN et al., 1998; YAMAOKA et al., 1999; KIM et al., 2001) outros autores indicam que o alelo *iceA2* é o mais prevalente (ASHOUR et al., 2001; GODOY et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003). Dado a essas controvérsias epidemiológicas acredita-se que essa variante alélica também não deveria ser usada como marcador de patogenicidade da bactéria.

9 Resposta inflamatória

Além destes principais fatores de virulência, a *H. pylori* apresenta outras características, que permitem que esta bactéria possa evadir-se do sistema imune do hospedeiro e colonizar de maneira persistente a mucosa gástrica humana (BLASER; ATHERTON, 2004).

A primeira característica que possibilita essa evasão do sistema imune é o fato de que grande parte da população bacteriana se encontrar presente no lúmen do estômago, onde as células do sistema imune e os anticorpos não conseguem agir

(LAMARQUE; PEEK, 2003). Além disso, a *H. pylori* possui diversas particularidades que a possibilitam escapar da resposta imune inata do hospedeiro, dentre as quais destaca-se a baixa toxicidade do LPS (PIOTROWSK et al., 1995), o alto grau de metilação do DNA e a baixa antigenicidade dos flagelos (BLASER; ATHERTON, 2004).

A *H. pylori* pode, também, escapar da resposta imune adquirida gerada contra ela devido a vários fatores, dentre eles o processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos, principalmente através de efeitos da toxina VacA (MOLINARI et al., 1998); a supressão tanto da ativação quanto da proliferação de células T específicas (GEBERT et al., 2003; SUNDRUD et al., 2004); a indução da morte celular de células T específicas por apoptose (GEBERT et al., 2003); a inibição da fagocitose em macrófagos ativados (ALLEN et al., 2000; ZHENG; JONES, 2003); a mimetização de antígenos do hospedeiro, exemplificado pela expressão de antígenos gástricos epiteliais fucosilados (Lewis) por essa bactéria (WIRTH et al., 1997); e a resistência a moléculas reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos ativados, devido principalmente à presença do gene *ahpC* que codifica para a proteína alquil hidroperóxido redutase, que catalisa a redução de peróxidos orgânicos (OLCZAK et al., 2003).

A infecção, entretanto, por *H. pylori* induz a uma considerável ativação do sistema imune. Isso foi demonstrado pela presença, no epitélio gástrico de pessoas infectadas, de níveis aumentados de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α (KEATES et al., 1999), e um grande infiltrado de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (PEEK et al., 1995).

A infecção gera, na maioria das vezes, uma resposta predominante Th1 (BAMFORD et al., 1998; HARRIS et al., 2000) predominantemente citotóxica e ineficaz para a erradicação deste patógeno; entretanto, níveis vigorosos de anticorpos sistêmicos e de mucosa contra *H. pylori*, característicos de uma resposta Th2, podem ser encontrados em pacientes colonizados (PEREZ-PEREZ et al., 1997). Essa produção de anticorpos, geralmente, não é suficiente para a erradicação desse micro-organismo, mas pode contribuir para o dano tecidual do hospedeiro, desenvolvendo os sintomas relacionados com a infecção. Alguns pacientes infectados possuem uma resposta humoral cruzada, dirigida contra as ATPases H⁺/K⁺ das células gástricas parietais, podendo esta resposta estar

relacionada com a atrofia do corpo gástrico, associada com a evolução para a malignidade dos sintomas (NEGRINI et al., 1997).

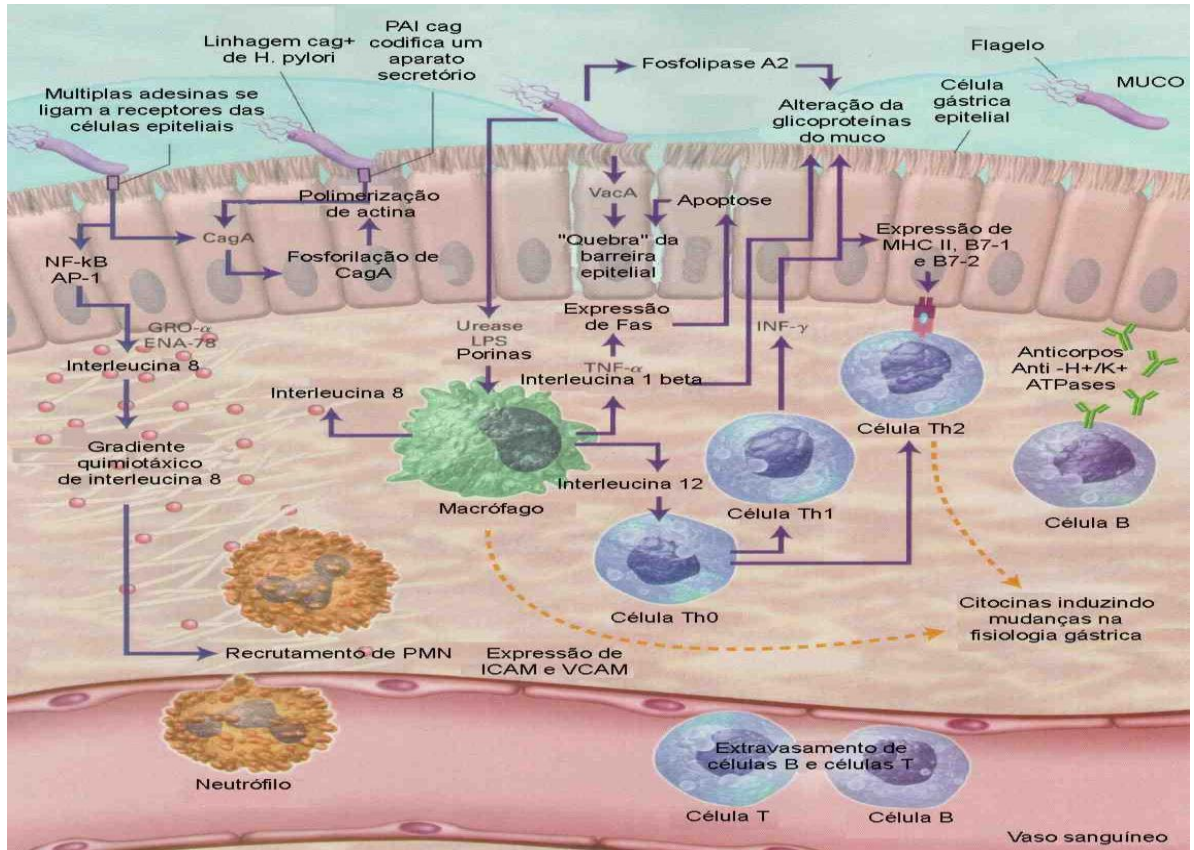


Figura 7 - Interação bactéria-hospedeiro na patogênese da infecção por *H. pylori*.

Fonte: SUERBAUM; MICHETTI, 2002.

A resposta imune, e em particular seu componente Th1, constitui um importantíssimo fator associado com a patogenicidade desta bactéria (MOHAMMADI et al., 1996; SMYTHIES et al., 2000). Camundongos com uma resposta predominante Th1 desenvolvem mais inflamação gástrica durante a colonização por *H. pylori* que aqueles com uma resposta Th2 predominante (MOHAMMADI et al., 1996). Em humanos, a ulceração péptica é rara durante supressão imune com ciclosporina A ou gravidez, um estado no qual as mulheres apresentam uma resposta predominante Th2 (SUERBAUM; MICHETTI, 2002). Além de induzir dano tecidual, essa orientação Th1 parece favorecer a persistência de *H. pylori* na mucosa. O dano tecidual pode resultar muitas vezes da ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por neutrófilos ativados (ZHANG et al., 1996) (Figura 7).

A indução de citocinas pró-inflamatórias e a inflamação afetam várias linhagens celulares gástricas importantes para a homeostase ácida típica de um indivíduo normal, incluindo células D, produtoras de somatostatina, células G produtoras de gastrina e células parietais produtoras de ácido (MOSS et al., 1992; BEALES; CALAM, 1998). A inflamação gástrica leva ao quadro clínico conhecido como gastrite, a qual, por sua vez, causa uma redução nos níveis de somatostatina (MOSS et al., 1992). A somatostatina inibe a produção de gastrina, o que, em um caso de inflamação gástrica onde a produção de somatostatina está reduzida, pode levar a um quadro de hiper-gastrinemia, causando um aumento do número de células parietais e hipertrofia da mucosa gástrica (LEVI et al., 1989). Além disso, a produção de gastrina pode ser aumentada por um efeito estimulante direto das citocinas pró-inflamatórias que tiveram sua expressão induzida pela colonização por *H. pylori* (BLASER; ATHERTON, 2004).

O efeito do nível de gastrina na homeostase ácida depende principalmente da distribuição topográfica de *H. pylori* no estômago e da inflamação resultante desta distribuição. Em uma gastrite predominantemente antral, as células enterocromafins (enterocromafin cell like – ECL) e as células parietais produtoras de ácido não são afetadas pela inflamação e, conseqüentemente, o alto nível de gastrina produzida leva tanto a um aumento da secreção ácida (EL-OMAR et al., 1995), como um aumento na massa de células parietais (GILLEN et al., 1998). O aumento da carga ácida no duodeno pode induzir a uma metaplasia gástrica nesse local. A *H. pylori* não coloniza o duodeno normal, devido às características diferenciais do epitélio intestinal, mas coloniza as células metaplásicas gástricas que estão surgindo no local. Essa colonização, por sua vez, pode provocar uma inflamação que se correlaciona com úlceras duodenais (HAMLET et al., 1996; OHKUSA et al., 2003).

Esse quadro de gastrite predominantemente antral e hipercloridria é muito comum na infância e é visto muitas vezes como benéfico, pois, aumenta a barreira protetora ácida contra outros patógenos, como os que causam diarreia (ROTHENBACHER et al., 2000). Esse processo parece ser conveniente em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias são geralmente precárias e conseqüentemente a taxa de diarreia é alta.

Quando a inflamação envolve também o corpo do estômago, como em uma pangastrite, ocorre uma inibição na secreção de ácido devido tanto à supressão na

produção de histamina, como pelo dano causado nas próprias células parietais (BEALES; CALAM, 1998). A inflamação persistente afeta o ciclo celular das células gástricas epiteliais, causando uma atrofia desse tecido, além de provocar uma perda progressiva das glândulas gástricas (PEEK et al., 2000). Esse quadro é associado a ulcerações e adenocarcinoma gástrico (KUIPERS et al., 1995). Entretanto, esse quadro de hipocloridria parece ter um efeito protetor contra a ulceração duodenal e a doença do refluxo gastroesofágico (KOIKE et al., 2001). A figura 8 mostra o efeito da topografia da inflamação na fisiologia gástrica.

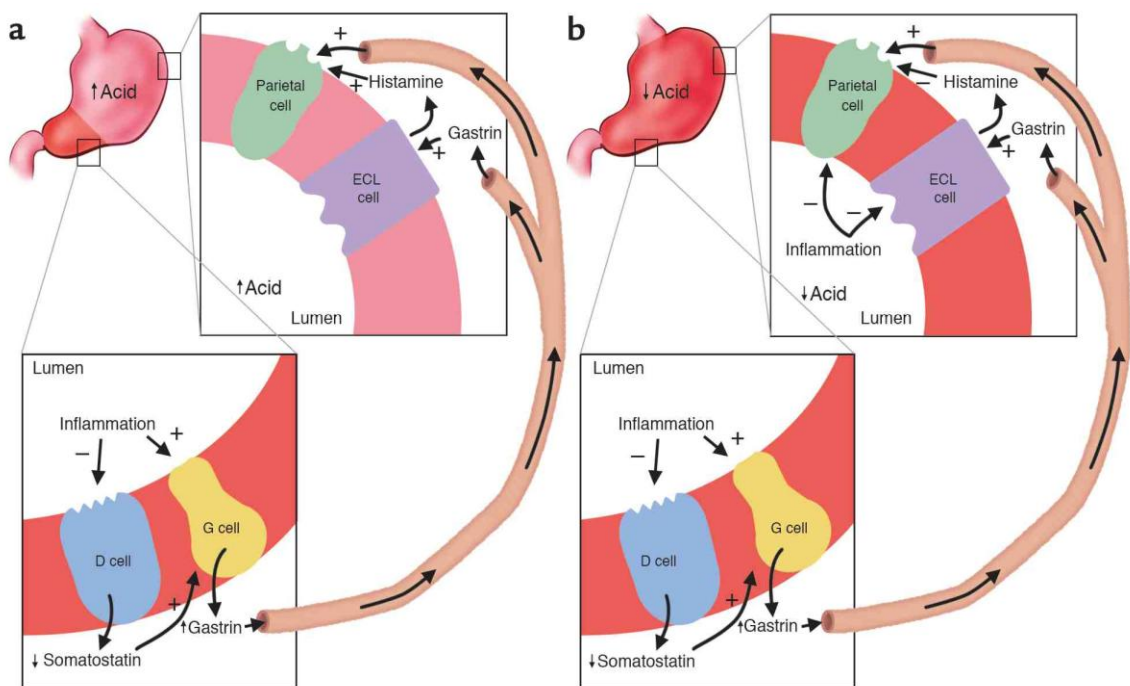


Figura 8 - Relação entre a topografia da inflamação, fisiologia gástrica e resultado clínico.

Fonte: BLASER et al. 2004.

A associação entre *H. pylori* e adenocarcinoma e linfomas MALT se deve basicamente ao distúrbio do balanço entre a proliferação celular e apoptose nas células epiteliais e nos órgãos linfóides associados ao estômago. Como reflexo de danos causados às células gástricas, tanto devido à ação nociva de toxinas bacterianas quanto aos efeitos tóxicos da inflamação persistente, a infecção por *H. pylori* tende a estimular a proliferação das células gástricas, o que pode levar ao desenvolvimento de um câncer específico (MAEDA et al., 2002).

Com o conhecimento adquirido quanto ao papel da infecção pela *H. pylori* em enfermidades humanas, surgiram várias orientações quanto à indicação de tratamento por medicamentos.

Os consensos médicos têm indicado a erradicação da infecção para o tratamento de doença ulcerosa péptica com ou sem hemorragia, linfoma gástrico de baixo grau de malignidade, gastrite severa e após ressecção de câncer gástrico precoce. O uso de antibióticos em todos pacientes com sintomas dispépticos e portadores do *H. pylori* em áreas com elevada prevalência da bactéria, entretanto, foi considerado como tendo melhor relação custo benefício que a investigação em todos os pacientes com esta sintomatologia para identificar os portadores de úlcera péptica (LEE; O'MORAIN, 1997).

10 Tratamento

O tratamento para a infecção por *H. pylori* tem sido um enigma para os clínicos, desde que a bactéria foi descoberta no início da década de 1980. Os desafios vão além de encontrar a combinação correta de antibióticos e manipulação do pH gástrico para assegurar a erradicação e evitar o desenvolvimento da resistência antimicrobiana e garantida a conformidade com o tratamento prescrito. O consenso de Maastricht III declarou que, para um regime de tratamento de erradicação ser considerado eficaz, teria que alcançar uma taxa de erradicação maior que 80% (MALFERTHEINER et al., 2007). Entretanto, nos últimos tempos, as taxas de erradicação na prática de muitos dos regimes mais comuns caíram bem abaixo desses níveis, geralmente devido a fatores como a pouca adesão do paciente aos medicamentos e a resistência aos antibióticos (VAKIL, 2009).

A utilização de monoterapias não é recomendada, pois o uso de um único antibiótico associado ou não com bismuto mostrou-se ineficaz. Os esquemas terapêuticos mais utilizados combinam dois antimicrobianos (usualmente metronidazol, claritromicina, amoxicilina, tetraciclina ou furazolidona) juntamente com um inibidor de bomba protônica (omeprazol, lansoprazol, ou pantoprazol), um antagonista de receptor de H₂ (ranitidina, cimetidina), ou componentes de bismuto (BUCKLEY et al., 1996; GRAHAM et al., 1996).

Preconiza-se a terapia combinada de duas, três até quatro drogas. Na maioria dos esquemas terapêuticos é utilizada a amoxicilina, pois esta apresenta excelente difusão no suco gástrico, atingindo nele altas concentrações (FERNANDEZ, 1999).

10.1 Esquema terapêutico

10.1.1 Primeira linha terapêutica

A combinação de um inibidor da bomba de prótons (IBP) com dois antibióticos tem sido aceita como primeira linha terapêutica para erradicação da *H. pylori* desde 1996 (LIND et al, 1996). O tratamento recomendado, publicado em *guidelines* na Europa e América do Norte refletem isso, um IBP combinado com amoxicilina e claritromicina como regime de predileção (MALFERTHEINER et al., 2007; LIND et al, 1996). No entanto, algumas advertências foram aplicadas a essas diretrizes associada com a queda das taxas de erradicação. Em 2000, estudos tinham sugerido taxas de erradicação para padronização da terapia tripla de mais de 90 % (KEARNEY; BROUSAL, 2000). No entanto, algumas publicações posteriores sugeriram que nível caiu para cerca de 70 % em muitas áreas e até mesmo menos de 60 % em outras (SAAD; CHEY, 2006; KADAYIFCI et al, 2006). Como exemplo, a orientação do Maastricht recomenda a substituição do metronidazol pela claritromicina quando a resistência do antibiótico exceder 15-20% (LIND et al, 1996). Taxas de erradicação com este regime são de 87,8% quando cepas são sensíveis a claritromicina e 18,3% quando cepas são resistentes a claritromicina (MÉGRAUD, 2004).

10.1.2 Segunda linha terapêutica

Uma vez que a primeira linha terapêutica pode falhar em 20 % dos pacientes, surgiu a necessidade de estabelecer uma segunda linha terapêutica (GISBERT, 2008). Muitas terapias de segunda linha estão em uso no momento, mas as mais comuns são as baseadas na utilização do bismuto e baseadas no levofloxacino (GISBERT; PAJARES, 2002). Uma terapia quádrupla baseada no bismuto associado com um IBP, tetraciclina e metronidazol apresentou uma eficiência de 76% em

pacientes que não apresentaram erradicação pela primeira linha terapêutica (HOJO et al, 2001). Terapias baseadas na levofloxacina se tornaram populares nos últimos anos. Recentemente, um estudo multicêntrico espanhol com 300 pacientes que apresentaram falha terapêutica na primeira linha de tratamento de erradicação, apresentou taxas por protocolo e por intenção de tratar de 77% e 81% respectivamente, quando o regime foi baseado na levofloxacina por 10, com boa tolerabilidade e baixa taxa de efeitos colaterais, em torno de 22% (GISBERT et al., 2008).

10.1.3 Terceira linha terapêutica

No caso daqueles pacientes que não apresentaram erradicação em terapias de primeira e segunda linhas, a recomendação é usar regimes empíricos ou empregar tratamentos sob medida, que dependem do isolamento de bactérias e testes de sensibilidade aos antibióticos. Dois dos mais comuns antibióticos utilizados nas terapias de resgate empíricos são rifabutina e furazolidona (SUZUKI et al., 2009; DE FRANCESCO et al., 2009). Um estudo com número limitado de pacientes revelou uma taxa de erradicação de 79%, quando utilizado um IBP, rifabutina e amoxicilina, duas vezes por dia por 14 dias (GISBERT et al, 2003). A rifabutina, entretanto, tem seu uso limitado devido ao baixo estoque deste medicamento na Europa, e a possibilidade de aumentar a prevalência de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, já que este antibiótico também é utilizado como tratamento para tuberculose, bem como a possibilidade de mielotoxicidade e eventos adversos oculares, reportados neste tratamento (APSELOFF et al., 2003; BHAGAT et al., 2001). A furazolidona também é utilizada em terapias de resgate, sendo publicado um estudo que apresentou taxa de erradicação de 60% quando utilizada junto com a amoxicilina e IBP (QASIM et al, 2005).

10.2 Eficácia terapêutica

No Brasil, estudos multicêntricos confirmam resultados obtidos em outros lugares do mundo, que demonstram a associação de pantoprazol com amoxicilina e claritomicina durante uma semana, promovendo a erradicação da *H. pylori* em 87%

dos pacientes avaliados por protocolo e 84,5% em intenção de tratamento (DAJANI et al, 1999).

No continente latino-americano, onde a alta resistência aos derivados imidazólicos restringe esta opção terapêutica, como a utilização do metronidazol, estudos brasileiros demonstraram que a utilização da furazolidona, juntamente com inibidores protônicos além dos macrolídeos claritromicina ou azitromicina, e em terapia quádrupla com tetraciclina e sais bismuto pode ser uma boa alternativa. Entretanto, embora o custo seja menor e o índice de erradicação seja semelhante aos observado com a amoxicilina e claritromicina, foram observados uma maior quantidade de efeitos adversos no uso da furazolidona (COELHO et al, 2005).

No tratamento da infecção pelo *H. pylori* os regimes apresentam uma boa eficácia, entretanto a falência terapêutica ainda é um grande problema na prática médica, considerando que um tratamento adequado deve ter uma taxa de erradicação superior a 80%, a falha desses esquemas ocorre em torno de 20% dos casos o que determina a necessidade de retratamento. Nesses cerca de 20% de pacientes que fazem a tentativa de erradicação, o sucesso chega a 80%. Apesar disto, cerca de 4% dos pacientes permanecerão infectados após dois cursos de tratamento (SANCHES et al., 2008).

O Segundo Consenso Brasileiro sobre *H. pylori* recomendou que, após a falência da primeira tentativa de tratamento, mais duas tentativas com duração de 10 a 14 dias continua sendo uma opção terapêutica, não sendo indicada qualquer quarta tentativa (SANCHES et al., 2008).

A resistência de *H. pylori* aos antimicrobianos é a principal dificuldade encontrada para o sucesso da erradicação podendo envolver diferentes mecanismos bioquímicos, entre eles impedimento da penetração do antimicrobiano, alteração molecular do alvo, efluxo ativo da droga, e inativação do composto (MEGRAUD, 1997).

Nos tratamentos que incluem o metronidazol, a eficácia dos mesmos não tem sido afetada pela resistência a esta droga *in-vitro*. Esta variabilidade parece estar relacionada à escolha do antimicrobiano associado ao tratamento e outros agentes. Os macrolídeos, particularmente a claritromicina quando usada em combinação ao metronidazol e outros agentes, diminui os efeitos da resistência ao metronidazol.

Entretanto a resistência *in-vitro* a claritromicina afeta adversamente o sucesso do tratamento (GRAHAM et al., 1996).

A prevalência da taxa de resistência ao metronidazol entre as linhagens de *H. pylori* é altamente variável. Nos países desenvolvidos a taxa de resistência varia entre 11-70%. Esta resistência é ainda mais prevalente nos países em desenvolvimento, onde mais de 95% dos isolamentos são resistentes. Em contraposição à resistência a claritromicina geralmente não é maior a 10%, sobretudo nos países onde os macrolídeos não são amplamente usados. Uma exceção foi relatada no Peru, onde um 50 % das linhagens de *H. pylori* isoladas foi resistente a claritromicina (DUNN et al., 1997).

Nos Estados Unidos a resistência aos antimicrobianos utilizados nas terapias convencionais alcança valores entre 20 e 50% para o metronidazol e entre 7% e 14 % para claritromicina (GRAHAM, 1996). Na Europa, a resistência varia entre 0% e 15% para claritromicina e entre 10% e 50 % para metronidazol (MEGRAUD, 1997).

No Brasil, estudos realizados por Mendonça e colaboradores (2000), onde foram analisadas linhagens de *H. pylori* obtidas de biopsias gástricas em relação à resistência primária a estes antimicrobianos, foram observados graus de resistência diferentes em comparação com dados obtidos em outras populações. Os autores relataram 42% de resistência ao metronidazol, 29% para amoxicilina, 7% para claritromicina, 7% para tetraciclina e 4% para furazolidona. Quando foram analisadas as porcentagens de resistência para dois e três agentes antimicrobianos, verificou-se 14,4% de resistência e 8,8%, respectivamente.

Um estudo posterior realizado pelo mesmo grupo relatou uma associação entre a resistência primária aos antimicrobianos e a falência terapêutica. As diferenças existentes entre as linhagens, nos diferentes países, reforçam a importância dos estudos específicos de *H. pylori* provenientes de diferentes populações (ECCLISSATO et al., 2002).

11 Modelo Animal

Os intentos iniciais para estabelecer modelos animais para a infecção por *H. pylori* em camundongos, ratos, e coelhos não foram bem sucedidos. Embora os camundongos imunodeficientes pudessem ser transitoriamente colonizados com *H.*

pylori, estes modelos tinham aplicações limitadas. Modelos alternativos foram desenvolvidos usando animais que foram infetados por espécies relacionadas ao *Helicobacter pylori*, como *Helicobacter felis*. Subsequentemente foi descoberto que os roedores eram susceptíveis a infecção facilitando um modelo animal mais acessível (CELLINI et al., 2004). Assim, em 1995, Marchetti e colaboradores, relataram o primeiro modelo experimental usando camundongos imunocompetentes. Os autores conseguiram estabelecer uma infecção transitória nos animais, usando linhagens de *H. pylori* de origem clínica que não tinham sido extensamente subcultivadas. Dois anos mais tarde, 1997, Lee e colaboradores, desenvolveram uma linhagem de *H. pylori*, chamada de SS1 ou Sidney Strain 1, que era capaz de infectar camundongos, permitindo uma colonização em uma alta densidade e por um período prolongado, como por exemplo os camundongos C57Bl/6 e BALB/c.

12 Estudos de tratamento antimicrobiano.

Dada a necessidade de novos regimes de antibióticos no tratamento da infecção humana por *H. pylori* e a falta de correlação da eficácia dos mesmos *in-vivo* e *in-vitro*, levou ao uso de modelos animais para a avaliação pré-clínica da eficiência dos antibióticos. Foi evidenciado que as infecções causadas por *Helicobacter* em camundongos e porcos, respondem favoravelmente aos tratamentos multidrogas utilizados para erradicar as infecções por *H. pylori* em humanos. Foi evidenciado também que as monoterapias apresentam baixa eficácia frente à infecção por *Helicobacter* nos hospedeiros animais, (o mesmo acontece nas pesquisas clínicas em humanos), mostrando a validade destes modelos para os estudos terapêuticos (FOX, 1995).

Van Doorn e colaboradores (1999) utilizando camundongos C57Bl/6 e BALB/c e as linhagens SS1 e SPM326, ambas sendo linhagens adaptadas ao modelo em camundongos, relataram que a inflamação induzida por *H. pylori* é dependente tanto da linhagem bacteriana como do hospedeiro.

13 Produtos naturais: alternativa terapêutica

Devido a ocorrência de situações clínicas em que o tratamento convencional não apresenta eficácia, métodos alternativos vem sendo amplamente estudados com a finalidade de aumentar a eficiência de erradicação da bactéria. Além deste fato, as terapias triplas em diversas ocasiões causam efeitos adversos como náusea, vômito, dor epigástrica, desconforto abdominal e diarreia, provocando o abandono do tratamento por parte dos pacientes. Por todo exposto, é importante procurar novas e efetivas terapias anti-*H. pylori*, e as plantas aparecem como uma fonte natural de novos compostos. (BERGONZELLI et al., 2003; NARIMAN et al., 2004; FUNATOGAWA et al., 2004).

A procura de poderes curativos nas plantas é uma idéia da antiguidade. Pessoas de todos os continentes têm aplicado cataplasma e ingerido milhares de infusões de plantas, desde a pré-história. Existe evidencia de que o homem de Neandhertal, há 60.000 anos atrás, usou plantas como o *hollyhock*. Estas plantas são amplamente usadas na etnomedicina ao redor do mundo. Atualmente entre um quarto a metade dos medicamentos dispensados nos Estados Unidos, tem sua origem em plantas, poucos são receitados como antimicrobianos, apesar de serem fonte confiável de antimicrobianos e antifúngicos (COWAN, 1999).

De uso quase exclusivo na terapêutica medicamentosa até a década de 1950, os remédios vegetais foram paulatinamente substituídos nas farmácias pelos remédios formulados (FUNATOGAWA et al., 2004).

Embora muitos compostos derivados de plantas medicinais possam ser sintetizados em laboratório, tal síntese é frequentemente complexa e de baixo rendimento, inviabilizando economicamente a produção. Por outro lado, alguns compostos também originados de plantas não podem ser ou nunca foram quimicamente sintetizados (FUNATOGAWA et al., 2004).

14 Plantas medicinais e Fitoterapia.

Historicamente as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na área da farmacognosia, uma vertente da farmacologia, onde são examinadas as características das drogas ou das bases medicamentosas de origem natural,

utilizadas como matéria prima para a preparação de medicamentos (DI STASI, 1996).

O termo Fitoterapia deriva de duas palavras gregas, a saber: *phyton*, que significa planta, e *therapeia*, que encerra a idéia de tratamento. Fitoterapia é o método de tratamento de enfermidades que emprega vegetais frescos, drogas vegetais ou, ainda, extratos vegetais preparados com esses dois tipos de matérias primas. Etimologicamente, fitoterapia significa tratamento por meio das plantas. (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

As mesmas árvores, arbustos e ervas empregados pelos povos antigos para tratar doenças e amenizar dores e incômodos continuam a ser valorizadas 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; OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestações artísticas, culturais e religiosas, e como meio restaurador da saúde. Sua importância, medida pela intensidade de seu uso, tem assumido, nos diversos estágios de desenvolvimento da sociedade, altos e baixos. (SIMOES, 2001).

Houve uma época em que a fitoterapia parecia estar morrendo com o desenvolvimento da indústria químico – farmacêutica. Mas em 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) deu início a um programa que enfatizou o uso de plantas medicinais. O estudo dessas plantas começou a ser incentivado, devido a vários fatores, como o baixo poder aquisitivo da maior parte da população, que procurava uma medicina alternativa a menores custos e medicamentos com efeitos colaterais menores (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

Nos dias de hoje representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo gênio humano (SIMOES, 2001).

A fitoterapia define diferentemente plantas medicinais, drogas vegetais e princípios ativos de origem vegetal. Considera-se planta medicinal todo vegetal que

contém em um ou vários de seus órgãos substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos ou que sejam precursores de substâncias utilizadas para tais fins (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

Drogas vegetais são todos os vegetais, parte de eles ou produtos derivados diretamente deles que, após sofrerem processos de coleta, preparo e conservação, possuam composição e propriedades que possibilitem o seu uso no estado bruto, componente de um medicamento, ou como necessidade farmacêutica (OLIVEIRA et al., 1991).

Uma das características da droga corresponde à presença de princípios ativos, que são substâncias quimicamente definidas presentes nas matérias - primas e nos fitoterápicos responsáveis pela atividade, ou seja, pelos efeitos terapêuticos desses materiais (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

A produção de drogas vegetais emprega tanto espécies silvestres como vegetais cultivados. A seleção e cultivo de plantas medicinais vem sofrendo impulso relativamente grande no Brasil e em outros países, apesar das dificuldades encontradas para ser obter uma droga confiável e de qualidade (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

Existem vários problemas relacionados à obtenção de drogas vegetais e entre eles podemos citar: a seleção de uma espécie vegetal, que pode apresentar, dentro de certos limites, diferenças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, permitindo assim a seleção de formas de valor superior; o cultivo de plantas medicinais, onde são considerados os fatores que influem ou interferem na vida do vegetal e, portanto na apresentação da composição química: temperatura, umidade, tipo de solo, idade da planta, clima, altitude, entre outros; colheita, onde o teor de princípio ativo de uma planta medicinal varia de órgão para órgão, com a idade, época da colheita, época da floração, manuseio e mesmo com o período do dia no qual é efetuado (DI STASI, 1996; OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

Para a obtenção de princípios ativos adequados, esses fatores podem influenciar significativamente no produto final (OLIVEIRA et al., 1991). O preparo ou tratamento, secagem, estabilização, conservação e tempo também são considerados fatores que influenciam na obtenção de drogas vegetais (OLIVEIRA et al., 1991; SIMOES et al., 2000).

Uma das principais características da droga corresponde à presença de princípios ativos que são naturalmente encontrados nas espécies vegetais, se apresentam como substâncias quimicamente definidas e obtidas de produtos de origem natural que se encontram presentes na matéria prima vegetal e nos fitoterápicos sendo responsáveis pela atividade farmacodinâmica, ou seja, pelos efeitos terapêuticos ou atividades biológicas apresentadas em determinado organismo vivo (DI STASI, 1996; OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

15 Química de produtos naturais.

A pesquisa que utiliza plantas medicinais faz uso de métodos químicos para obter, tanto o isolamento como a purificação de novos compostos e assim, determinar corretamente sua estrutura seguida de síntese total ou parcial da substância isolada. Os avanços obtidos na área químico-farmacêutica, nestes últimos anos, assim como a descoberta de novas drogas encontra-se claramente dependente dos avanços da pesquisa científica com base nas plantas medicinais (HOSTETTMANN et al., 2003).

A complexidade e abrangência da química, envolvendo produtos naturais, compreendem desde o isolamento e purificação dos metabolitos vegetais na fase preparativa, até a determinação estrutural dos novos compostos. A associação entre a fase preparativa, como a cromatografia gasosa, e a analítica, que inclui infravermelho e espectrometria de massas, são indispensáveis para a correta determinação e identificação de novas drogas provenientes de produtos naturais. (DI STASI, 1996).

A composição química das espécies vegetais, principalmente das plantas de origem tropical, ainda não foram descritas em sua totalidade. Diversos constituintes de origem natural ainda não foram isolados e estudados quimicamente, entretanto, outros compostos de origem natural que já foram quimicamente isolados e definidos ainda não foram estudados com relação a possível atividade biológica (DI STASI, 1996; HOSTETTMANN et al., 2003).

16 Compostos testados

16.1 Própolis vermelha

É uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores; além desses, na colméia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas (PEREIRA et al., 2002; FRANCO et al., 2000). As abelhas de fato usam a própolis para protegê-las contra insetos e micro-organismos, no reparo de frestas ou danos à colméia, no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (MARCUCCI, 1996).

A coloração da própolis depende de sua procedência. Varia de marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado. Possui odor característico que pode variar de uma amostra para outra (MARCUCCI, 1996).

A própolis vermelha é relatada como sendo típica de Cuba e da Venezuela, onde as origens botânicas foram identificadas como *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) e *Clusia scrobiculata*, respectivamente (TRUSHEVA et al., 2006). Esta própolis no Brasil é originária do norte e nordeste, da qual compostos foram isolados e identificados, sendo que alguns deles são novos para a própolis. Estes compostos pertencem a diferentes classes, tais como fenólicos, triterpenóides, isoflavonóides, benzofenonas preniladas e um epóxido da naftoquinona (isolado pela primeira vez em um produto natural) (TRUSHEVA et al, 2006).

A própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, etc. (BANKOVA, 2005; KOSALEC et al., 2005; ALENCAR et al., 2005; SIMÕES et al., 2008). Esse potencial biológico se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes (MARCUCCI, 1996).

16.2 *Solanum cernuum* e *Solanum variable*

O gênero *Solanum* L. é o maior e mais complexo gênero da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies e 5000 epítetos habitando sistemas ecológicos

estabelecidos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo e tendo a América do Sul como centro de diversidade e distribuição (CARVALHO, 2003).

Além de alcalóides, os flavonóides constituem um dos grupos de substâncias mais freqüentes em espécies do gênero *Solanum*. O número de trabalhos de sistemática química sobre o gênero *Solanum* é relativamente reduzido, aparentemente devido às dificuldades de se trabalhar com um gênero com grande plasticidade morfológica (CARVALHO, 2003).

Solanum cernuum Vellozo, também conhecida como *Solanum paleatum* Schott e *Solanum jubatum* Dun é uma solanácea tipicamente brasileira, que recebe diversos nomes vulgares, tais como: barba-de-bode, bolsa-de-pastor, braço-de-preguiça, braço-de-momo, capoeira-branca, folha-de-onça, mercúrio-de-pobre, panacéia, velame, velame-de-folha-grande, velame-do-campo (SIQUEIRA-JACCOUD, 1963).

É atribuída às raízes atividade diurética e depurativa (FERREIRA, 1975), além de ação hemostática (CORRÊA, 1984). As folhas e flores são indicadas no tratamento de distúrbios hepáticos atuando como desobstruente, sudorífico, diurético e depurativo, combatendo gonorréias rebeldes, sarna e várias moléstias da pele, sendo aplicadas externamente na cura de úlceras cutâneas (CORRÊA, 1984). E ainda, um estudo realizado por Araújo e colaboradores (2002) evidenciou sua atividade anti-ulcerogênica no modelo experimental de úlcera induzida pela indometacina. A *S. variabile* Mart (falsa jurubeba), em um estudo realizado por Antônio (2006) também apresentou atividade anti-ulcerogênica, além de curativa e preventiva.

16.3 *Cordia eucalyculata*

A *C. salicifolia* Cham, família *Boraginaceae*, ou *Cordia ecalyculata* Vell é popularmente conhecida pelos nomes de chá-de-bugre, porangaba, cafezinho, café-do-mato, chá-de-frade, louro-salgueiro e louro-mole, sendo bastante freqüente desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, tendo sido também encontrada na Argentina e no Paraguai (SAITO *et al.*, 1986). Sua utilização como medicinal é antiga, principalmente na forma de chá como diurético, estimulador da circulação, cardiotônico, diminuição de inchaço, diminuidor do apetite (no tratamento de obesidade), além de auxiliar na diminuição dos níveis de colesterol total e

triglicerídeos, prevenindo a deposição de gorduras nas artérias (SAITO *et al.*, 1986; MATSUNAGA *et al.*, 1997; SIQUEIRA *et al.*, 2006). Além das ações acima citadas, estudos demonstraram também sua atividade antiviral contra *Herpes simplex* tipo 1 (HAYASHI *et al.*, 1990) e antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (MENGHINI *et al.*, 2008). Estudos químicos sobre a sua composição evidenciaram a presença de cafeína, alantoína, ácido alantóico e cloreto de potássio (SAITO *et al.*, 1986; MENGHINI *et al.*, 2008).

16.4 *Piper carpunya*

A *P. carpunya* Ruiz & PAV. (*Piper lenticellosum* C. DC.), um membro da família *Piperaceae*, é usado na medicina popular do Equador devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antiulcerogênica, já na Colômbia devido às suas atividades anti-parasitárias, dermatológicas e anti-diarréicas (TRABADELA *et al.*, 2008; DIAZ *et al.*, 1986). Estes vegetais pertencentes à família *Piperaceae*, uma vez que apresentam fácil cultivo e propagação, ciclo reprodutivo curto e metabolismo secundário que conduz à produção de substâncias biologicamente ativas, boa distribuição em regiões tropicais, facilidade de cultivo e emprego como moluscicida em área endêmica, são alvos de diversos estudos. A família *Piperaceae* apresenta compostos bioativos de composição química bastante diversificada, sendo observada a produção de óleos essenciais, amidas insaturadas, pironas, flavonóides, monoterpenos, sesquiterpenos, arilpropanóides (apiol, dillapiol, myristicina, safrol e sarisan) e lignóides (lignanas e neolignanas) (MARTINS *et al.*, 2000; NAVICKIENE *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2003).

16.5 *Cissus sulcicaulis*

O gênero *Cissus*, mais vasto da família *Vitaceae*, é constituído de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical. Vários estudos vêm sendo realizados com esse gênero e algumas atividades farmacológicas vêm sendo encontradas: atividade antioxidante, antimicrobiana, inibidora da enzima acetilcolinesterase, e, especialmente, antiinflamatória (ARAÚJO *et al.*, 1996).

Cissus sulcicaulis apresentou atividade anti-ulcerosa em modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos (ARAÚJO *et al.*, 1996).

16.6 *Sweetia subelegans*

A *S. subelegans*, um membro da família Leguminaceae, também conhecida como *Acosmium subelegans* (Mohlenbr) Yakovl, popularmente conhecida como “perobinha-do-campo”, é utilizada na medicina popular brasileira como sedativo ou “tranqüilizador” no tratamento da epilepsia, na histeria, no esgotamento nervoso e na coréia (COIMBRA, 1958). Em seu extrato etanólico foi identificado, como principal constituinte ativo, o lupeol, um composto triterpenóide. O lupeol, em ratos, diminuiu sua movimentação e ainda potencializou a hipnose por barbitúricos sem afetar a coordenação motora do animal (VIEIRA *et al.*, 2002).

16.7 *Leonurus sibiricus*

O *L. sibiricus* pertence a família Lamiaceae e a ordem Lamiales, originária da Índia e ocorre em regiões tropicais da Ásia, África e América (LORENZI, 2002).

A utilização medicinal das folhas dessa espécie pode prevenir o reumatismo crônico, apresenta atividade antibacteriana e evita dermatites e outros problemas dermatológicos. Na medicina chinesa, as sementes são consideradas afrodisíacas e a planta seca é prescrita como tonificante e usada em disfunções menstruais (BOWN, 1995). Folhas e flores são capazes de combater vômitos e diarréias (HOEHNE, 1939), além de serem eficientes contra resfriado, bronquite e reumatismo (CASTELLUCCI *et al.*, 2000). O extrato metanólico de folhas, também, demonstrou atividade anti-inflamatória (ISLAM *et al.*, 2005) e combate células neoplásicas de glândulas mamárias (NAGASAWA *et al.*, 1990), o que justifica diversos estudos etnofarmacológicos realizados com esta espécie no Brasil (SOUZA *et al.*, 2004).

Em relação à composição química, a literatura relata que *L. sibiricus* apresenta alcalóides (MURAKAMI, 1943), mono, sesqui e diterpenos (SAVONA *et al.*, 1982; ALMEIDA *et al.*, 2005) e furano-lactonas (SATOH *et al.*, 2003). Os extratos polares apresentam majoritariamente rutina e seus derivados, além de flavonas metoxiladas

(ALMEIDA *et al.*, 2006), as quais são consideradas marcadores taxonômicos (GIANG *et al.*, 2005).

16.8 Aminocicloalcalonas

Os compostos determinados como aminocicloalcalonas foram divididos em 3 tipos: aminoácido lipídico (AC), aminoálcool lipídico (AO/OA) e diamina lipídica (AA). O aminoácido lipídico apresenta um grupo amina, um ácido carboxílico e diversas substituições em R (radical). O aminoálcool lipídico apresenta um grupo amina, um álcool que pode estar em diferentes posições na estrutura e diversas substituições em R. A diamina lipídica apresenta dois grupos aminas e diversas substituições em R. Como se pode ver na figura 9.

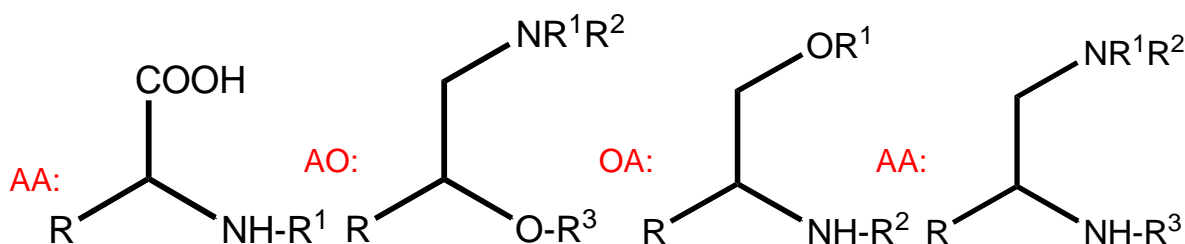


Figura 9 – Estruturas das aminocicloalcalonas.

16.9 Benzalftalida

A benzalftalida é uma estrutura formada por um anel heterocíclico associado a um anel aromático (lactona) e com diversas substituições em R e um fenil. Como se pode ver na figura 10.

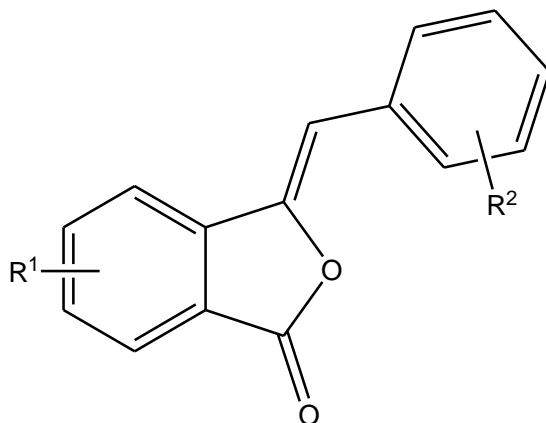


Figura 10 – Estrutura da benzalftalida.

16.10 Ftalazinona

A ftalazinona é uma estrutura formada por um anel heterocíclico associado a um anel aromático (lactama) e com diversas substituições em R e um fenil. Como se pode ver na figura 11.

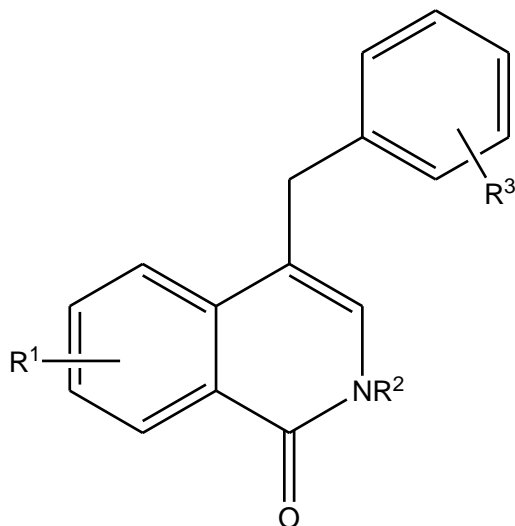


Figura 11 – Estrutura da ftalazinona.

16.11 Cumarina

A cumarina é uma estrutura formada por um anel heterocíclico associado a um anel aromático (lactona) e com diversas substituições em R e um fenil. Como se pode ver na figura 12.

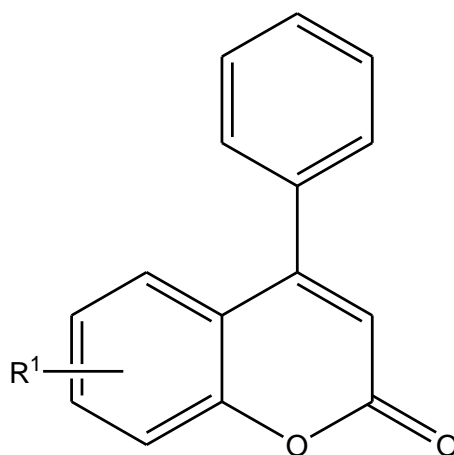


Figura 12 – Estrutura da cumarina.

16.12 Imidazoisindol

O imidazoisindol apresenta uma estrutura formada por um anel heterocíclico associado a um anel aromático (indol) e a uma imida e com diversas substituições em R, há ainda a presença de um álcool e um fenil. Como se pode ver na figura 13.

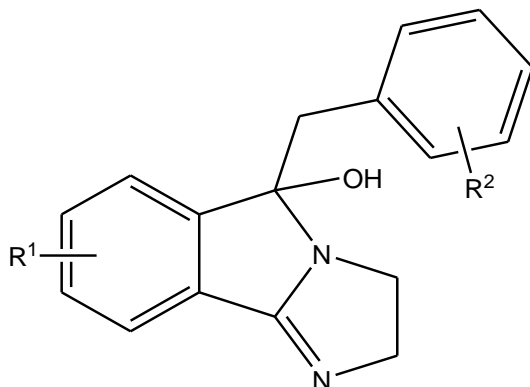


Figura 13 – Estrutura do imidazoisindol.

16.13 Chalconóide

Os chalconóide são estruturas formadas por anéis aromáticos, um grupo cetona e diversas substituições em R. Como se pode ver na figura 14.

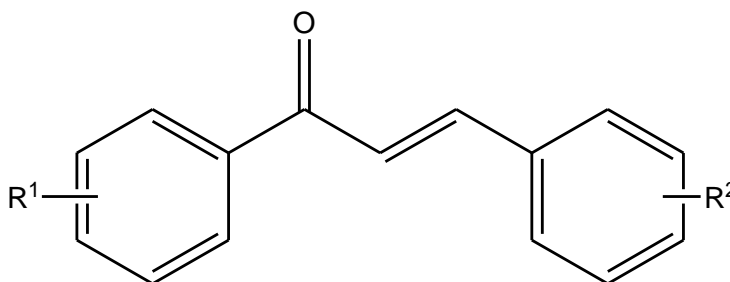


Figura 14 – Estrutura do chalconóide.

16.14 Pirimidoisindol

O pirimidoisindol tem uma estrutura formada por um anel heterocíclico associado a um anel aromático (indol) e a uma pirimidina, há ainda a presença de um álcool e um fenil. Como se pode ver na figura 15.

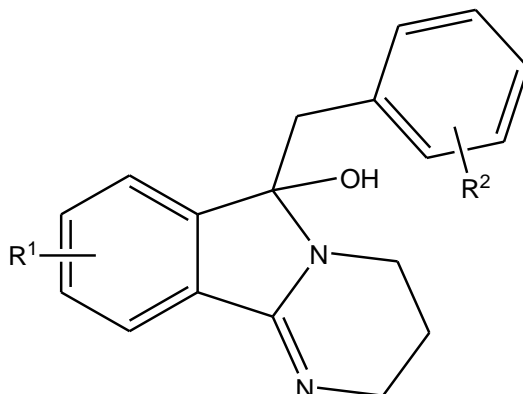


Figura 15 – Estrutura do pirimidoisindol.

16.15 Vanilina

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, figura 16) é o principal componente da baunilha natural, que é um dos componentes mais utilizados mundialmente como flavorizante, em produtos alimentares e pessoais, com um consumo mundial anual estimado em mais de 200 toneladas (RAO; RAVISHANKAR, 2000). A vanilina produzida biotecnologicamente é considerada um produto natural e pode ser produzida com baixos custos, a partir do uso de fontes renováveis. Ela pode ser produzida biotecnologicamente através de extratos enzimáticos ou enzimas purificadas, micro-organismos e cultura de células de planta (BERGER, 2000). Os principais precursores para a produção biotecnológica de vanilina são eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico e outros menos utilizados (RAMACHANDRA; RAVISHANKAR, 1999). Além de suas propriedades como flavorizante, a vanilina apresenta potencial antimicrobiano e tem sido utilizada como conservante natural de alimentos (CERRUTTI et al., 1997). Além disso, a vanilina apresenta atividade antioxidante através da proteção de membranas contra a fotossensibilização induzida por danos oxidativos em mitocôndrias de fígado de ratos (ARUOMA, 1999; KAMAT et al., 2000). A vanilina inibe quimicamente e fisicamente agentes mutagênicos produzidos por bactéria e células mamárias tumorais (KESHAVA et al., 1998;

SHAUGHNESSY et al., 2006). Também apresenta efeitos preventivos nos modelos de carcinogênese de múltiplos órgãos e hepatocarcinogênese em ratos (AKAGI et al., 1995).

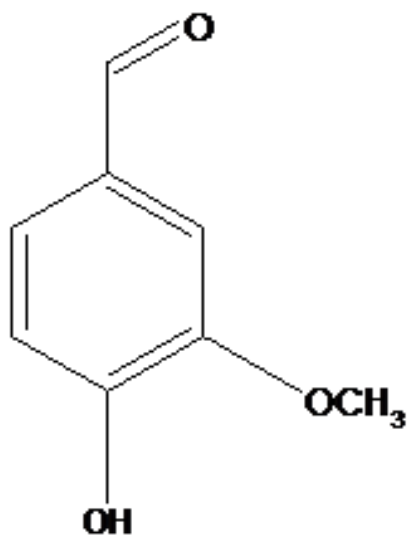


Figura 16 – Estrutura química da vanilina.

III – Objetivos

1 Objetivos gerais

Avaliar de forma prospectiva, diversas amostras de origem natural e sintética quanto a atividade inibitória e bactericida para o desenvolvimento de novas terapias para *Helicobacter pylori*.

2 Objetivos específicos

Avaliar qualitativamente produtos naturais e sintéticos com possível potencial inibitorio para *Helicobacter pylori* SS1.

Quantificar a atividade bactericida dos produtos naturais e sintéticos com atividade inibitória para *Helicobacter pylori* SS1.

IV - Materiais e Métodos

Netse trabalho foram testadas 147 amostras no total, sendo 37 de origem natural e 110 de origem sintética.

1 Preparação dos produtos naturais e sintéticos

O extrato etanólico da própolis vermelha (EEP), suas frações e sub-frações foram preparados pela Dr. Maria Cristina Marccuci Ribeiro da Universidade Bandeirante de São Paulo - São Paulo. A resina bruta moída foi colocada em etanol e deixada em mesa agitadora (shaker). Posteriormente o material foi filtrado e concentrado em rotaevaporador até a eliminação do etanol, obtendo-se o EEP. A separação dos compostos presentes no EEP foi realizada por cromatografia de filtração molecular em coluna Sephadex LH-20 (GE Pharmacia), sendo recolhidas frações, que foram concentradas. A partir das frações recolhidas foi utilizado um gradiente de eluição de metanol em água, sendo recolhidas suas sub-frações.

Os compostos extraídos da *Solanum cernnum*, foi realizado pela Dr. Luciane Cruz Lopes da Universidade de Sorocaba (UNISO), Brasil. Os extratos foram obtidos pela maceração dinâmica com diclometano e etanol obtendo se respectivamente o extrato bruto diclometano (EBD) e o bruto etanólico (EBE). Os extratos foram cromatografados em coluna de sílica gel 60, posteriormente, todos os compostos foram purificados e identificados por meios espectroscópicos.

As plantas *Solanum variable*, *Cordia eucalyculata*, *Piper carpunya*, *Cissus sulcicaulis*, *Sweetia subelegans* e *Leonurus sibiricus* secas e moídas foram colocadas em etanol (80% v/v), na razão de 10 volumes de etanol por unidade de massa de droga vegetal, mantidas em agitação, durante pelo menos 6 horas, a temperatura ambiente (20-30°C). A eliminação da maior parte do solvente foi feita mediante destilação azeotrópica do etanol a uma pressão reduzida assegurando a eliminação praticamente que completa do etanol, não ultrapassando os 60°C. As frações destes extratos foram obtidas através da passagem de solventes com diferentes polaridades. Os extratos destas plantas fizeram parte de um grupo de estudos chamado Pigastrin.

Os compostos sintéticos foram sintetizados pelo Dr. Arturo San Feliciano Martín da Universidade de Salamanca, Espanha. estes compostos são derivados dos grupos químicos: aminocicloalcalonas, benzalftalidas, ftalazinonas, cumarinas, imidazoisindois, chalconóides e pirimidoisindois. Outros compostos sintéticos foram cedidos pelo Dr. José Agustín Pablo Quincoces Suárez da Universidade Bandeirante de São Paulo - São Paulo. Estes compostos são derivados da vanilina.

2 Linhagem selecionada

O estudo da atividade anti-*Helicobacter* dos produtos naturais e sintéticos bioativos, com provável indicação para utilização terapêutica de erradicação, foi realizado utilizando a linhagem de referência da bactéria SS1 ou Sidney strain 1 (MONTEIRO, et al., 2000). Esta linhagem pertence ao Banco de Linhagens do Laboratório de Microbiologia da UNIBAN Brasil – SP.

Todas as linhagens de *H. pylori* tiveram a pureza e viabilidade verificadas periodicamente através da observação microscópica de sua forma típica após coloração de Gram e pela presença da enzima urease.

3 Reativação de *H. pylori* em meio sólido

Os estoques mantidos em nitrogênio líquido a uma temperatura de aproximadamente – 196°C em criotubos de 2 mL com meio Brucella Broth (Difco, USA) com 25% de glicerol foram reativadas através de inóculo em placas de Petri (90 x 150 mm) preparadas com meio seletivo BHI (Acumedia Manufacturing Inc, Michigan, USA), ágar-ágar (Merk, Darmstadt, Germany), 5% de sangue de carneiro defibrinado, 10 mg/L de vancomicina (Sigma Aldrich Chemie, St Louis, MO, USA), 20 mg/L de ácido nalidíxico (Sigma Aldrich Chemie), 2 mg/L anfotericina B (Sigma Aldrich Chemie)(QUEIROZ et al., 1987; MENDONÇA et al.,2000) . Estas placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (Revco, USA) em condições microaerofílicas (12% CO₂) com 95% de umidade relativa por até 3 dias.

4 Identificação das linhagens

A morfologia das bactérias, obtidas em cultura em meio sólido, foram observadas ao microscópio óptico após coloração de Gram. Simultaneamente, as amostras foram confirmadas através da realização do teste bioquímico que comprova a produção de urease.

Para o teste de urease, uma parte da amostra em cultura foi adicionada à 3 mL de meio de uréia (uréia 2%, vermelho fenol 0,05%, azida sódica 0,002%; Probac, SP), permanecendo incubado à 37°C por um período de duas horas. Na presença da enzima urease, a uréia do meio é degradada formando amônia, que conseqüentemente altera o pH do meio e a cor para rosa, devido ao indicador vermelho de fenol.

5 Método de difusão em disco

Placas de Petri contendo ágar sangue seletivo Muller-Hinton (Merk, Darmstadt, Germany), 5% de sangue de carneiro desfibrinado e 2 mg/L de anfotericina B foram inoculadas com 100 µL da suspensão bacteriana, com a densidade ajustada para 2.0 na escala de turbidez de McFarland [Nefelobac, Probac, SP (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL)], da linhagem de referência SS1.

Essa amostra foi previamente reativada, sendo espalhada por toda extensão das placas (duas por amostra) com auxílio da alça de Drigalsky estéril. Permaneceram cerca de 30 minutos em ambiente microaerofílico para completa absorção do excesso de líquido antes de receberem os discos impregnados com as amostras. Um disco adicional foi utilizado como controle para comprovação da não interferência de etanol, de DMSO e de Mygliol, utilizados na solubilização das amostras, ao crescimento bacteriano.

Os discos utilizados são semelhantes aos discos de antibióticos comercializados, porém sem princípio ativo (medindo 7 mm de diâmetro), no centro de cada disco foram pipetados 10 µL de amostra a ser testada (mesmo volume para o etanol e DMSO). Estas placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (Revco, USA) em condições microaerofílicas (12% CO₂), com 95% de umidade relativa por 48 horas.

Os ensaios, em duplicata, foram analisados quanto à presença de halos ou zonas de inibição do crescimento bacteriano, sendo expressos em milímetros.

6 Método de microdiluição

Neste método, diluições seriadas das amostras são preparadas em microplacas plásticas, possuindo 96 *wells* (poços), distribuídos em 12 colunas e 8 fileiras cada uma contendo um controle positivo (meio de cultura + suspensão bacteriana) , um controle negativo (meio de cultura + amostra a ser testada). As diluições seriadas foram 10 vezes menores que a concentração anterior, para uma escala logarítmica de base 10, ou a metade da concentração anterior, para uma escala de base 2, sendo analisadas até 6 diluições, como demonstrado na figura 17.

Nas microplacas estéreis foram colocados meio de cultura Brucella Broth (Difco, USA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativo (Cultilab, SP) e 2,5 g/L de extrato de levedura. A fileira A é o controle positivo que permite avaliar a viabilidade bacteriana, a fileira B, corresponde ao controle do meio de cultura e da amostra. Da fileira C até a fileira H foram realizadas as diluições seriadas. O volume final em todos os pocinhos deve ser o mesmo, no caso foi de 50 µL.

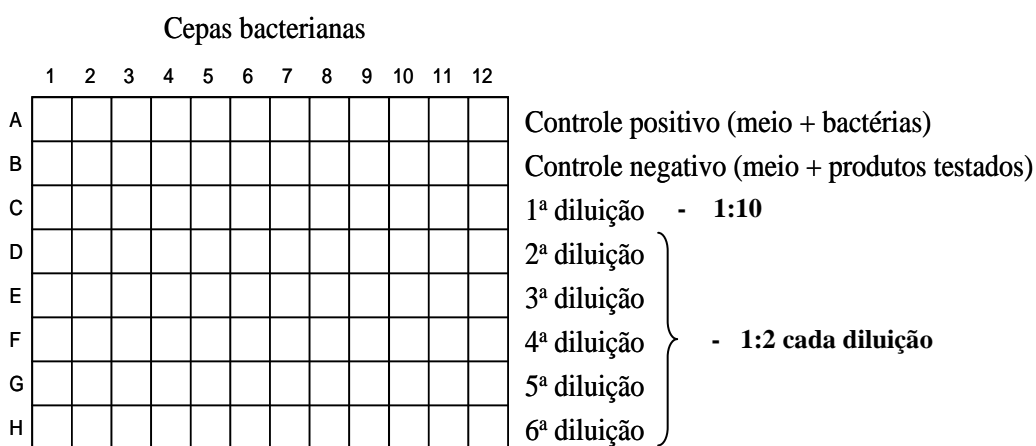


Figura 17 – Esquema para preparação da microplaca.

Após a preparação das placas, foram inoculados 5 µL da suspensão bacteriana em todos os pocinhos , exceto a fileira B. A suspensão bacteriana foi suspensa em meio Brucella Broth (Difco, USA). A densidade bacteriana foi corrigida para o padrão visual 2.0 da escala de McFarland [(Nefelobac, Probac, SP (aproximadamente 6 x

10⁸ UFC/mL)]. As microplacas permaneceram incubadas por 72 h em condições de microaerofilia à 37°C.

Através deste método, é possível também determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é a menor concentração de substância capaz de matar mais que 99,9% do inoculo original. Para efetuar esta determinação foram transferidos volumes de 2 µL de cada pocinho, com auxílio de uma micropipeta multicanal para placas (uma placa para cada microplaca), contendo meio sólido BHA, acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado e 2 mg/L de anfotericina B. Estas placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (Revco, USA) em condições microaerofílicas (12% CO₂), com 95% de umidade relativa por um período de 48-72 horas. O não crescimento bacteriano informam a CBM da substância em teste.

V - Resultados

1 Avaliação qualitativa da influência no crescimento bacteriano dos produtos naturais e sintéticos

Para detectar a possível presença de atividade anti- *Helicobacter pylori* dos produtos naturais e sintéticos, foi utilizada a técnica qualitativa conhecida como difusão em discos. Os resultados obtidos por esta técnica nos permitiram obter uma primeira avaliação da capacidade dos mesmos de inibir *in vitro* a bactéria.

Os resultados obtidos a partir dos produtos naturais (tabelas 6, 7, 8 e 9) e sintéticos (tabelas 10, 11, 12, 13, 14 e 15) estão apresentados nas tabelas a seguir, os halos de inibição, representados em milímetros, e os mesmos representam à média e o desvio padrão dos resultados obtidos em dois ensaios.

Tabela 6 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para a própolis vermelha, suas frações e suas sub-frações.

Própolis vermelha	Média (mm)/Desvio padrão
Própolis vermelha	18,5 +/- 0,7
Própolis vermelha Fração 2	-
Própolis vermelha Fração 3	17,5 +/- 2,1
Própolis vermelha Fração 4	18 +/- 2,8
Própolis vermelha Fração 5	-
Própolis vermelha Fração 6	19 +/- 1,4
Própolis vermelha Sub-fração 1-4	-
Própolis vermelha Sub-fração 2-4	11 +/- 1,4
Própolis vermelha Sub-fração 3-4	15,5 +/- 0,7
Própolis vermelha Sub-fração 4-4	16,5 +/- 0,7

Legenda: (-) não detectado

Das 10 amostra relacionadas a própolis vermelha, a própria própolis vermelha, as frações 3, 4 e 6, e sub-frações 2-4, 3-4 e 4-4 apresentaram halos de inibição.

Tabela 7 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para as compostos isolados do extrato de *Solanum cernuun*.

<i>Solanum cernuun</i>	Média (mm)/Desvio padrão
EE C4 (52-74) guanidina	-
49/94 F (39) (24 oxo)	-
17/22-26 cicloeucalona	-

Legenda: (-) não detectado

Os 3 compostos isolados da *Solanum cernuun* não apresentaram atividade inibitória contra *Helicobacter pylori*.

Tabela 8 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para as amostras do grupo Pigastrin.

Pigastrin	Média (mm)/Desvio padrão
PIG1-CAO-03/20/14i	30 +/- 2,1
PIG2-CAZ-10/14i	16 +/- 0,7
PIG3-CAA-03/04/14i	9 +/- 0,7
PIG4-CAO-03/00/14i	14 +/- 1,4
PIG5-COA-00/04/14i	17 +/- 0,7
PIG6-COA-00/04/10i	22 +/- 2,8
PIG7-COO-00/20/14i	9 +/- 0,7
PIG8-COA-00/12/14i	13 +/- 1,4

Legenda: (-) não detectado

Todas as amostras do grupo Pigastrin apresentaram atividade inibitória contra *Helicobacter pylori*.

Tabela 9 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para as amostras isolados do extrato de *Piper carpunya*.

Piper carpunya	Média (mm)/Desvio padrão
SEV1-STEG 18/6	-
SEV2 – STEG 19/6	12 +/- 0,7
SEV3 – STEG 20/6	-
SEV4 – STEG 21/6	13 +/- 1,4
SEV5 – STEG 22/6	11 +/- 0,7
SEV6 – STEG 23/6	14 +/- 1,4
SEV7 – STEG 24/06	12 +/- 0,7
SEV8 – STEG 25/6	11,5 +/- 0,7
SEV9 – STEG 26/6	14 +/- 1,4
SEV10 – STEG 27/6	-
SEV11 – STEG 28/6	-
SEV12 – STEG 29/6	11 +/- 0,7
SEV13 – STEG 30/6	12 +/- 2,8
SEV14 – STEG 31/6	-
SEV15 – STEG 32/6	-
SEV16 – STEG 33/6	-

Legenda: (-) não detectado

Das 16 amostras testadas referente as amostras fracionadas do extrato de *Piper carpunya*, 9 amostras apresentaram halos de inibição.

Tabela 10 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados das aminocicloalcalonas.

Aminocicloalcalonas	Média (mm)/Desvio padrão
AC-00/00	10 +/- 0,7
AC-00/29	-
AO-00/29	15 +/- 1,4
AA-00/29	-
AO-13/00	-
AA-40/29	-
OA-00/04	10 +/- 1,4
OA-10/28	10 +/- 0,7
OA-10/11b	25 +/- 3,5

Legenda: (-) não detectado

Das 9 amostras sintéticas, derivadas da aminocicloalcalonas, 5 apresentaram halos de inibição.

Tabela 11 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados da benzalftalida.

Benzalftalidas	Média (mm)/Desvio padrão
B-020	-
B-1020	-
B-1030	-
B-1040	-
B-1060	-
B-1120	-
B-1150	-
B-1160	-
B-1170	-
B-1180	-
B-1220	-
B-2100	-
B-6080	13 +/- 1,4
B-21010	-
B-21030	-
B-21060	-
B-21110	10 +/- 0,7
B-21120	-
B-21220	-

Legenda: (-) não detectado

Das 19 amostras sintéticas, derivadas da benzalftalida, apenas 2 apresentaram halos de inibição.

Tabela 12 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para os compostos sintéticos do grupo das benzalftalazinonas.

Benzalftalazinonas	Média (mm)/Desvio padrão
F-020	-
F-029	12 +/- 2,8
F-060	-
F-069	24 +/- 0,7
F-1031	20 +/- 2,8
F-1060	-
F-1061	17,5 +/- 4,9
F-1069	8,5 +/- 0,7
F-4061	10 +/- 0,7
F-20069	-
F-21070	-
FC-1	8,5 +/- 0,7
FC-3	9,5 +/- 0,7
FC-8	8,5 +/- 0,7
F-21060	-
FCS-12	-
FCS-13	-
FCS-15	11 +/- 1,4
FCS-16	17 +/- 5,65
FCS-17	-
FCS-38	-
FCS-39	-
FCS-55	-
FCS-66	-

Legenda: (-) não detectado

Das 24 amostras sintéticas, derivadas da Benzalftalazinona, 11 apresentaram halos de inibição.

Tabela 13 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para os compostos sintéticos do grupo dos Imidazosindóis.

Imidazoisindóis	Média (mm)/Desvio padrão
I-070	-
I-1010	-
I-1030	-
I-1050	-
I-1060	-
I-1070	-
I-1080	-
I-1090	-
I-1110	15 +/- 1,4
I-1120	-
I-1180	-
I-1220	-
I-21030	-
I-21050	-
I-21060	-
I-21100	-
I-21120	-

Legenda: (-) não detectado

De todas as amostras sintéticas, derivadas do imidazosindol, apenas 1 apresentou halo de inibição.

Tabela 14 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para os compostos sintéticos do grupo dos chalconóides.

Chalconóides	Média (mm)/Desvio padrão
JD-48M	-
JD-39M	-
JD-58M	8,5 +/- 0,7
JD-65M	20 +/- 2,8
JD-68M	-
JD-69M	10 +/- 1,4
JD-80M	-
JD-87M	10 +/- 1,4
JD-90M	8,5 +/- 0,7
JD-98M	15 +/- 1,4
JD-105M	10 +/- 1,4
JD-146M	-
JD-121M	-
JD-133M	8,5 +/- 0,7
JD-153M	10 +/- 1,4
P-120	-
P-6060	13 +/- 1,4

Legenda: (-) não detectado

Das 17 amostras sintéticas, derivadas do chalconóide, 11 apresentaram halos de inibição.

Tabela 15 – Halos de inibição ao crescimento da *H. pylori* SS1 obtidos para os compostos sintéticos derivados da vanilina.

Vanilina	Média (mm)/Desvio padrão
CH1	-
CH2	-
COV	-
COV1	-
CPK-1	-
HB2	-
LP-1 (acetofenona prenilada)	-
O-HB1	-
OR1	-
OR2	-
OR3	-
O-VBr	-
Q-39 (para) (clorovinilaldeído)	11,5 +/- 0,7
QBr-39 (clorovinilaldeído bromado)	-
V1	-
V6	-
VN-01	23,5 +/- 0,7
VN-01 (Benzoilado)	14 +/- 1,4
VN-02	-
VN-04	16,5 +/- 3,5
VN-05	13 +/- 1,4
VN-07	14 +/- 2,8
ZC	-
ZC1	-

Legenda: (-) não detectado

Dos 24 compostos sintéticos derivados da vanilina, 6 apresentaram atividade contra *Helicobacter pylori*.

A partir destes resultados, as amostras que apresentaram halos de inibição, independente do tamanho do halo formado, foram selecionadas para a realização do

teste quantitativo, ou seja, determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

2 Determinação da CBM

Com o objetivo de determinar a concentração bactericida mínima, para os compostos anteriormente descritos como possuindo atividade anti- *Helicobacter pylori* foi realizado o teste de microdiluição, cujo seus resultados encontram-se expressos em duplicata nas tabelas a seguir 16 e 17.

Tabela 16 – Determinação da atividade anti-*Helicobacter pylori* dos produtos naturais através da CBM obtida pelo método de microdiluição.

Produtos naturais	CBM (µg/mL)	
	1º teste	2º teste
Própolis vermelha		
Própolis vermelha	< 62,5	< 62,5
Própolis vermelha Fração 3	< 62,5	< 62,5
Própolis vermelha Fração 4	< 62,5	< 62,5
Própolis vermelha Fração 6	< 62,5	< 62,5
Própolis vermelha Sub-fração 2-4	62,5	125
Própolis vermelha Sub-fração 3-4	< 62,5	< 62,5
Própolis vermelha Sub-fração 4-4	< 62,5	< 62,5
Pigastriin		
PIG1-CAO-03/20/14i	100	100
PIG2-CAZ-10/14i	100	100
PIG3-CAA-03/04/14i	440	440
PIG4-CAO-03/00/14i	1	1
PIG5-COA-00/04/14i	200	200
PIG6-COA-00/04/10i	100	100
PIG7-COO-00/20/14i	370	370
PIG8-COA-00/12/14i	290	290
Piper carpunya		
SEV2 – STEG 19/6	200	200

Continuação da tabela 16

SEV4 – STEG 21/6	100	100
SEV5 – STEG 22/6	10	10
SEV6 – STEG 23/6	100	100
SEV7 – STEG 24/06	100	100
SEV8 – STEG 25/6	100	100
SEV9 – STEG 26/6	200	200
SEV12 – STEG 29/6	100	100
SEV13 – STEG 30/6	200	200

Tabela 17 – Determinação da atividade anti-*Helicobacter pylori* dos produtos sintéticos através da CBM obtida pelo método de microdiluição.

Produtos sintéticos	CBM (µg/mL)	
	1º teste	2º teste
Aminocicloalcalonas		
AC-00/00	100	100
AO-00/29	100	100
OA-00/04	500	500
OA-10/28	200	200
OA-10/11b	220	220
Benzalftalidas		
B-6080	25	25
B-21110	100	100
Benzalftalazinonas		
F-029	25	25
F-069	< 3,125	< 3,125
F-1031	540	540
F-1061	25	50
F-1069	25	25
F-4061	200	200
FC-1	100	100
FC-3	10	10

Continuação da tabela 17

FC-8	100	100
FCS-15	12,5	12,5
FCS-16	6,25	12,5
Imidazosoindóis		
I-1110	500	500
Chalconóides		
JD-58M	120	120
JD-65M	125	125
JD-69M	160	160
JD-87M	350	350
JD-90M	270	270
JD-98M	270	270
JD-105M	75	75
JD-133M	400	400
JD-153M	270	270
P-6060	50	50
Vanilina		
VN-01	100	100
VN-01 (Benzoilado)	> 100	> 100
VN-04	100	50
VN-05	> 100	> 100
VN-07	100	50
Q-39 (Para) (clorovinilaldeído)	100	100

As amostras foram avaliadas, segundo o critério, descrito por Holetz (2002) e Pretto (2004), entre 10 e 100 µg/mL, considerado boa a atividade; entre 100 e 500 µg/mL como atividade moderada; entre 500 e 1000 µg/mL como fraca atividade e maior que 1000 µg/mL, foi considerado inativo, e discutidos adiante.

Somente os compostos PV 2-4, F-1061, FCS-16, VN-04 e VN-07 apresentaram uma variação quanto à concentração bactericida mínima, esta diferença pode ser causada pela suspensão bacteriana, já que é realizada visualmente, calibragem das

pipetas ou estabilidade das amostras testadas, devido ao tempo, já que os testes foram realizados em dias diferentes.

VI - Discussão

Em 1984, Warren e Marshall descobriram uma bactéria capaz de colonizar estômagos humanos, e evidenciaram a associação entre o desenvolvimento de patologias gástricas e a presença desta bactéria, hoje conhecida como *Helicobacter pylori*.

A infecção causada pela bactéria *H. pylori* na mucosa gástrica é considerada como a mais freqüente infecção crônica que ocorre em humanos (GRAHAM, 2000). Estima-se que metade da população mundial esteja infectada por esta bactéria, tornando-a um dos principais patógenos da espécie humana e destacando-a como um importante problema de saúde pública (IARC, 1994; BROTMAN; TOSKES, 1996).

Em países em desenvolvimento a ocorrência é superior em relação à prevalência nos países desenvolvidos, confirmando que a situação sócio-econômica é um fator determinante e importante na prevalência da infecção, sugerindo a necessidade de se realizar outros estudos epidemiológicos (HEATLEY, 1995).

O tratamento da infecção causada por *H. pylori* tem sido objeto de um extenso número de pesquisas. Preconiza-se a terapia combinada de duas, três e até quatro drogas, dois ou três antimicrobianos mais um inibidor da bomba de prótons (FUCCIO et al, 2007).

A resistência da *H. pylori* aos antimicrobianos é a principal dificuldade encontrada para o sucesso da erradicação podendo envolver diferentes mecanismos. Existem quatro mecanismos principais de resistência: impedimento da penetração do antimicrobiano, alteração molecular do alvo, efluxo ativo da droga ou inativação do composto (MÉGRAUD, 1997).

A resistência bacteriana é considerada um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é necessário cada vez mais a busca para o desenvolvimento de novos fármacos os quais sejam mais eficientes, desenvolvidos a partir de origem natural ou por via sintética (SILVA et al, 2007). Infelizmente, o ritmo de desenvolvimento de novos antimicrobianos reduziu drasticamente, sendo anualmente introduzidos na prática clínica apenas um pequeno número de novos fármacos (CHAMBERS, 2006).

Com certeza, a principal contribuição para o desenvolvimento da terapêutica moderna foi a utilização das plantas medicinais, inicialmente pelos Egípcios e que depois foi se alastrando para outras regiões do mundo. Há registros do uso de muitas plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*), dentre outras, há milhares de anos antes de Cristo. Contudo, foi somente no século XIX que se iniciou a procura pelos princípios ativos presentes nas plantas medicinais, criando assim, os primeiros medicamentos com as características que conhecemos atualmente (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008).

Mais tarde graças ao enorme progresso da Química Orgânica, o setor de fármacos de origem sintética, que se verificou nos últimos anos, tende a fazer olvidar o extraordinário papel que as drogas de origem natural desempenharam, desempenham e desempenharão na terapêutica, predominando atualmente os fármacos de origem sintética (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

Como a história já demonstrou que o desenvolvimento de medicamentos pode ser feito a partir de origem natural como vegetal, animal e mineral, e também por via sintética, graças aos progressos da química orgânica, neste trabalho foram investigadas as atividades antimicrobianas, para *H. pylori*, dos produtos naturais e sintéticos.

Para a execução dos testes de determinação da sensibilidade das amostras de *H. pylori* para os produtos naturais e sintéticos avaliados, quatro métodos de análise microbiológica são utilizados na literatura: o método da diluição em agar, o método de microdiluição, a macrodiluição e o método de difusão com discos de papel impregnados. Na análise de suscetibilidade da *H. pylori* para os antimicrobianos utilizados na terapêutica convencional, o método considerado padrão-ouro é a diluição em agar, principalmente relacionado com a facilidade de crescimento bacteriano em meio de cultura sólido. A dificuldade em se obter crescimento desta bactéria em meios líquidos é também a principal razão da não utilização de métodos como a macrodiluição e a microdiluição para a avaliação de drogas antimicrobianas convencionais. O método de difusão em disco, sendo realizado em meio sólido, também facilita a análise dos resultados, entretanto, apresenta como duas grande desvantagens: a baixa reprodutibilidade e o aspecto apenas qualitativo dos resultados.

No início dos estudos com produtos naturais e sintéticos com potencial anti-*Helicobacter*, entretanto, verificou-se uma grande dificuldade relacionada com a solubilização e homogeneização de alguns compostos em meio sólido, necessários para a utilização do método de diluição em agar. Devido a este aspecto, os métodos líquidos de análise foram padronizados, especialmente aqueles que envolvem pequeno volume de meio de cultura, de forma a permitir tanto um melhor crescimento bacteriano quanto a uma economia de produtos analisados, muitas vezes de difícil obtenção.

Inicialmente, foi realizado um *screening* qualitativo pelo método de difusão em discos impregnados. Este ensaio visa, primeiramente, avaliar a capacidade de determinada substância em inibir o crescimento bacteriano, apresentando halos de inibição. As amostras que produziram halos de inibição foram selecionadas para serem quantificadas através do método de microdiluição, fornecendo a concentração bactericida mínima (CBM). Porém as amostras que não apresentaram halos de inibição, não devem ser descartadas ainda, o não aparecimento do halo pode ser devido a baixa capacidade de difusão destas amostras através do meio de cultura, devendo ser melhor investigadas.

A maioria dos antibióticos utilizados na prática clínica é ativo contra cepas de testes a um nível de pelo menos 10 µg/mL. Um agente puro que não é ativo a pelo menos 100 µg/mL torna-se improvável que se torne um antibiótico de uso clínico, a menos que seja ativo contra organismos recalcitrantes ou relativamente atóxicos (MITSCHER *et al.* 1972).

Para classificação da atividade antimicrobiana utilizou-se os seguintes critérios: atividade entre 10 e 100 µg/mL, foi considerado como boa; entre 100 e 500 µg/mL como atividade moderada; entre 500 e 1000 µg/mL como fraca atividade e maior que 1000 µg/mL, foi considerado sem atividade. Estes critérios tem sido empregados por outros autores (HOLETZ *et al.*, 2002; PRETTO *et al.*, 2004).

As amostras de própolis vermelha apresentaram, até presente momento, bons resultados com relação a atividade anti-*H. pylori*, possuindo ação bactericida em concentrações menores que 62,5 µg/mL para a maioria das amostras relacionadas, exceto para a sub-fração 2-4 que apresentou CBM de 62,5 µg/mL no 1º teste e 125 µg/mL no 2º teste. Existe ainda a necessidade de realizar mais diluições para se obter um resultado ainda mais preciso, já que o alcance mínimo nesta metodologia

foi de 62,5 µg/mL. A análise química dos constituintes da própolis vermelha identificou compostos fenólicos, triterpenóides, isoflavonóides, benzofenonas preniladas e epóxido de naftoquinona (TRUSHEVA et al., 2006). Esses compostos podem ser responsáveis pela maior atividade anti-*Helicobacter* encontrada, já que foi relatado atividade antibiótica, antifúngica, e atividade antioxidante de triterpenóides naturais (KIM; JUNG; MIN, 2001). O composto 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona (epóxido de naftoquinona) demonstrou ser antibacteriano, antifúngico e apresentou propriedades citotóxicas (PERRY; BLUNT; MUNRO, 1991). Isoflavonóides também são bem conhecidos por sua atividade antimicrobiana e antifúngica (DIXON; PAIVA, 1995).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário, também são reconhecidas empiricamente há séculos e tiveram comprovação científica apenas recentemente (JANSEN; SCHEFFER; BAERHEIM, 1987). Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas tem sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, México, entre outros, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (MARTÍNEZ et al., 1996; NAVARRO et al., 1996; AHMAD; BEG, 2001; MAHASNEH et al., 1999; DUARTE et al., 2005).

As amostras do grupo Pigastrin foram discutidas genericamente, pois informações referentes às estas amostras estão protegidas.

A amostra PIG4-CAO-03/00/14i do projeto Pigastrin apresentou uma concentração inibitória muito boa, de 1 µg/mL, merecendo ser melhor estudada, as amostras PIG1-CAO-03/20/14i, PIG2-CAZ-10/14i e PIG6-COA-00/04/10i apresentaram concentrações de 100 µg/mL, consideradas boas; e as amostras PIG3-CAA-03/04/14i, PIG5-COA-00/04/14i, PIG7-COO-00/20/14i e PIG8-COA-00/12/14i tiveram concentrações na faixa de atividade moderada.

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos (AHMAD; BEG, 2001). Entretanto, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos

científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas. Espera-se que compostos que atinjam, nas células, alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sejam ativos contra patógenos resistentes (SARTORATTO et al., 2004).

A *Piper carpunya* é uma planta conhecida no Equador e Colômbia por ser amplamente utilizada pela medicina popular como medicamento anti-inflamatório e anti-úlceras e também tem demonstrado propriedades dermatológicas, anti-diarréica e anti-parasitária (DIAZ et al. 1986). Recentemente, esta planta tem demonstrado ser protetora contra lesões gástricas induzidas pelos AINES (anti-inflamatórios não esteroidais) em ratos (BERENQUER et al., 2007). Entretanto, não há muitos estudos a respeito dos mecanismos envolvidos na proteção gástrica e nos efeitos anti-inflamatórios desta planta. Com relação aos resultados obtidos, a fração SEV5 – STEG 22/6 merece destaque já que apresentou uma boa concentração inibitória, 10 µg/mL, enquanto que as amostras SEV4 – STEG 21/6, SEV6 – STEG 23/6, SEV7 – STEG 24/06, SEV8 – STEG 25/6 e SEV12 – STEG 29/6 apresentaram concentrações de 100 µg/mL, considerada uma boa concentração também. As amostras SEV9 – STEG 26/6 e SEV13 – STEG 30/6 tiveram uma atividade moderada, de 200 µg/mL.

As aminocicloalcalonas derivadas dos alcalóides são compostos nitrogenados heterocíclicos, apresentando uma grande diversidade estrutural, o que pode explicar as diferenças nas concentrações bactericidas mínimas dos produtos aqui testados. Neste trabalho, as aminocicloalcalonas apresentaram concentrações bactericida mínima, de 100 µg/mL para AC-00/00 e AO-00/29 (boa), e de 200, 220 e 500 µg/mL (moderada) para OA-10/28, OA-10/11b e OA-00/04, respectivamente, como demonstra os resultados.

As benzalftalidas são derivados estilbênicos que contêm um heterociclo oxigenado. Podem ser encontradas na natureza ou obtidas de forma sintética por diferentes métodos. Apresentam atividades biológicas diversas, como anti-histmínica, antibacteriana e ansiolítica (MATSUDA et al, 1999; ZAMILPA et al, 2005). Neste estudo, os derivados da benzalftalida, B-6080 e B-21110 apresentaram uma boa atividade, apresentando concentração bactericida mínima de 25 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

As benzalftalazinonas e os chalconóides são derivados das chalconas. A literatura descreve a atividade antibacteriana das chalconas para bactérias tanto Gram positivas como para Gram negativas, e que seu efeito inibitório está relacionado com os padrões de substituição dos anéis aromáticos (SIVAKUMAR; PRIYA; DOBLE, 2009; AVILA et al., 2008). Apesar das benzalftalazinonas e dos chalconóides pertencerem ao mesmo grupo químico, as benzalftalazinonas apresentaram melhores resultados, a amostra F-069 mostrou atividade bactericida mínima em concentrações inferiores a 3,125 µg/mL, seguido das amostras FC-3 e FCS-15 que apresentaram valores de 10 µg/mL e 12,5 µg/mL, respectivamente, FCS-16 apresentou bons resultados, porém valores discordantes de 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL, essa diferença de resultados pode ter ocorrido durante a realização da metodologia, enquanto que o melhor resultado dos chalconóides foi de 75 µg/mL, como demonstra os resultados.

Os imidazosindóis são compostos derivados de alcalóides indólicos, que são alcalóides que possui um anel de indol como parte de sua estrutura. Os alcalóides indólicos estão descritos na literatura apresentando diversas atividades biológicas, atuando nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, atividades antimicrobianas e parasitárias, e também citotóxica (PEREIRA et al., 2007). Quanto à atividade anti-*H. pylori*, neste trabalho o produto imidazosindol I-1110 apresentou uma concentração bactericida moderada de 500 µg/mL.

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um dos compostos aromáticos mais apreciados no mundo e um importante flavorizante para alimentos, bebidas e é usada também em produtos farmacêuticos. Possui vários efeitos como prevenção de doenças, antimutagênico, antioxidante, conservante e antimicrobiano (CERRUTTI; ALZAMORA, 1996; FARTHING et al., 1999; SHAUGHNESSY et al., 2001). Os derivados da vanilina apresentaram concentrações inibitórias de 100 µg/mL (boa) em sua maioria, com discordância de resultados em VN-04 e VN-07, apenas as amostras VN-01 (Benzoilado) e VN-05 que mostraram resultados superiores a 100 µg/mL (moderado), limite máximo de detecção do método para estas amostras.

No presente momento, alguns dos produtos testados mostraram-se excelentes compostos anti-*H. pylori*, merecendo um aprofundamento nos estudos em relação a

esses compostos, para que talvez no futuro esses compostos sejam uma alternativa na terapia de erradicação da *Helicobacter pylori*.

VII – Conclusão

- Das 147 amostras testadas, 59 apresentaram atividade anti-*Helicobacter in vitro*, sendo 24 de origem natural e 35 de origem sintética.
- Os compostos isolados da *Solanum cernuum* não apresentaram atividade anti-*Helicobacter*.
- O composto PIG4-CAO-03/00/14i do grupo Pigastrin foi o que apresentou a menor concentração bactericida mínima.
- O grupo que apresentou o maior número de compostos com a menor concentração bactericida mínima foi os derivados da benzalftlazinona, sendo considerado um grupo promissor para futuras pesquisas.
- O grupo da própolis vermelha, *Piper carpunya* e vanilina não apresentaram uma variação significativa em suas concentrações bactericidas mínimas.
- Alterações na estrutura química das moléculas levam a um aumento ou diminuição da atividade antimicrobiana, ou até mesmo a perda completa de atividade.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; GOVIL, Y.; FRANK, B. B. Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. **Am J Gastroenterol**, v.98, p. 975-86, 2003.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **J Ethnopharmacol**, v. 74, p. 113-123, 2001.

AKAGI, K.; HIROSE, M.; HOSHIYA, T. *et al.* Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multiorgan carcinogenesis model. **Cancer Lett**, v. 94, p. 113–121, 1995.

AKOPYANTS, N.S.; CLIFTON, S.W.; KERSULYTE, D.; CRABTREE, J.E; YOUREE, B.E; REECE, C.A. *et al.* Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Mol Microbiol**, v. 28, p. 37-53, 1998.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; GUZMÁN, J. P.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 909-915, 2005.

ALLEN, L. A.; SCHLESINGER, L.S.; KANG, B. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. **J.Exp.Med**, p. 115-28, 2000.

ALMEIDA, L.F.R. *et al.* Constituintes químicos de *Leonurus sibiricus* (LAMIACEAE). In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**. Anais da 29^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2006. p. 94.

ALMEIDA, L.F.R.; DELACHIAVE, M.E.A.; MARQUES, M.O.M. Composição química do óleo essencial de *Leonurus sibiricus*. **Brasilian Journal of Medicinal Plants**, v. 8, p. 31-35, 2005.

AL-MOAGEL, M. A.; EVANS, D. G.; ABDULGHANI, M. E.; ADAM, E.; EVANS, D. J. J.; MALATY, H. M.; GRAHAM, D. Y. Prevalence of *Helicobacter* (formerly *Campylobacter*) *pylori* infection in Saudi Arabia, and comparison of those with and without upper gastrointestinal symptoms. **Am. J. Gastroenterol**, v.85, p. 944-48, 1990.

AMERICAN DIGESTIVE HEALTH FOUNDATION: Advancing digestive health through support of research and education in the cause, prevention, treatment, and cure of digestive diseases. **Gastroenterology**, v. 110, n. 6, p. 1997-1999.

ANSORG, R.; VONHEINEGG, E. H.; VONRECKLINGHAUSEN, G. Cat owner's risk of acquiring a *Helicobacter pylori* infection. **J. Med. Microbiol**, v. 283, p. 122-26, 1995.

ANTONIO, J. M.; GRACIOSO, J. S.; TOMA, W. *et al.* Antiulcerogenic activity of ethanol extract of *Solanum variabile* (false "jurubeba"). **J Ethnopharmacol**, v. 93, p. 83-88, 2004.

APSELOFF, G.; FLUIDS, G.; LABOY-GORAL, L.; KRAUT, E.; VINCENT, J. Severe neutropenia caused by recommended prophylactic doses of rifabutin. **Lancet**, v. 348, p. 685, 1996.

ARAUJO, C. E. P.; RODRIGUES, R. F. O.; OLIVEIRA, F.; SCHREINER, L. Análise preliminar da atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico de *Solanum cernuum* Vell. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 283-286, 2002.

ARAÚJO, L. C. L.; MARIN, E. C.; MORIGUSHI, P. **Estudos preliminares das atividades farmacológicas e toxicológicas do extrato hidroalcoólico de *Cissus succicaulis* Baker. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, Brazil, 1996.**

ARENTS, N.L.; VAN ZWET, A.A.; THIJS, J.C.; KOOISTRA-SMID, A.M.; VAN SLOCHTEREN, K.R.; DEGENER, J.E. *et al.* The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. **Am J Gastroenterol**, v. 96, p. 2603-08, 2001.

ARMSTRONG, D. *Helicobacter pylori* infection and dyspepsia. **Scand.J.Gastroenterol**, p. 38-47, 1996.

ARUOMA, O. I. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. **Free Radic Res**, v.30, p. 419–427, 1999.

ASHOUR, A.A.; COLLARES, G.B.; MENDES, E.N.; DE GUSMAO, V.R.; QUEIROZ, D.M.; MAGALHAES, P.P. *et al.* *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. **J Clin Microbiol**, v.39, p. 1746-50, 2001.

ATHERTON, J.C.; CAO, P.; COVER, T.L.; *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, p. 17771-77,1995.

ATHERTON, J.C.; PEEK, R.M.; THAM, K.T.; COVER, T.L.; BLASER, M.J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterology**, v. 112, p. 92-9, 1997.

AVILA, H. P.; SMÂNIA EDE, F.; MANACHE, F. D.; SMÂNIA A JR. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorg Med Chem**, v. 16, p. 9790-9794, 2008.

AXON A. review article: gastric cancer and *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 16, p. 83-8, 2002.

AXON, A.T. Review article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? **Aliment Pharmacol Ther**, v. 9, p. 585-88,1995.

BAMFORD, K. B.; FAN, X.; CROWE, S. E.; LEARY, J. F.; GOURLEY, W. K.; LUTHRA, G. K.; BROOKS, E. G.; GRAHAM, D.Y.; REYES, V. E.; ERNST, P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Am J Gastroenterology**, p. 482-92, 1998.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 114-117, 2005.

BASSO, L.; BEATTIE, S.; LAWLOR, S.; CLUNE, J.; O'MORAIN, C. A descriptive follow-up study on *Helicobacter pylori* infection before and after exposition to a war area. **Eur. J. Epidemiol**, v. 10, p. 109-11, 1994.

BEACHEY, E.H. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacterial to mucosal surface. **Infect Dis**, v. 143, p. 325-45, 1981.

BEALES, I. L.; CALAM, J. The histamine H3 receptor agonist N alpha-methylhistamine produced by *Helicobacter pylori* does not alter somatostatin release from cultured rabbit fundic D-cells. **Gut**, p. 176-81, 1998.

BEALES, I.; CALAM, J.; POST, L.; et al. Effect of transforming growth factor alpha and interleukin 8 on somatostatin release from canine fundic D cells. **Am J Gastroenterology**, v. 112, p. 136-43, 1997.

BERENQUER, B. *et al.* The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. Protect against NSAID-induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 153-160, nov. 2007.

BERGER, R. G. **Aroma Biotechnology**, Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2000.

BERGONZELLI, G. E.; DONNICOLA, D.; PORTA, N. *et al.* Essential oils as componentes of a diet-based approach to management of *Helicobacter pylori*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 3240-3246, 2003.

BHAGAT, R.; SPORN, T. A.; LONG, G. D.; FOLZ, R. J. Amiodarone and cyclophosphamide: potential for enhanced lung toxicity. **Bone Marrow Transplant**, v. 27, p. 1109-1111, 2001.

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. **BMJ**, p. 1507-10, 1998.

BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **J.Clin.Invest**, p. 321-33, 2004.

BLASER, M.J. Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. **J Clin Invest**, v. 100, p. 759-62, 1997.

BLASER, M.J.; PEREZ-PEREZ, G.I.; KLEANTHOUS, H.; COVER, T.L.; PEEK, R.M., CHYOU, P.H.; STEMMERMANN, G.N.; NOMURA, A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res**, v. 55, p. 2111-15, 1995.

BODE, G.; MAUCH, F.; Malferttheiner, P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*—criteria for their viability. **Epidemiol Infect**, v. 111, p. 483-90, 1993.

BODE, G.; ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H.; ADLER, G.; Pets are not a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in young children—results of a population-based study in southern Germany. **Pediatr Infect Dis J**, v. 17, p. 909-12, 1998.

BOWN, D. **The herb society of America**: encyclopedia of herbs and their uses. New York: Darling Kindersley Publ., 1995, 314p.

BROTMAN, M.; TOSKES, P. P. The American Digestive Health Foundation: advancing digestive health support of research and education in the cause, prevention, treatment, and cure of digestive diseases. **Gastroenterology**, v. 110, n. 6, p. 1997-1999, 1996.

BUCKLEY, M.; CULHANE, A.; DRUMM, B. *et al.* Guidelines for the management of *Helicobacter pylori*-related upper gastrointestinal diseases. Irish *Helicobacter pylori* Study Group. **Ir J Med Sci**, v. 165, p. 1-11, 1996.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CARVALHO, M.G.; SILVA, T. M. S. S. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (SOLANACEAE). **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003.

CASSARO, M.; RUGGE, M.; GUTIERREZ, O.; LEANDRO, G.; GRAHAM, D.Y.; GENTA, R.M. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. **Am J Gastroenterol**, v. 95, p. 1431-38, 2000.

CASTELLUCCI, S. *et al.* Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na estação ecológica de Jataí, município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 3, p. 51-60, 2000.

CELLINI, L.; ALLOCATI, N.; ANGELUCCI, D.; IEZZI, T.; DI CAMPLI, E.; MARZIO, L.; DAINELLI, B. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice. **Microbiol Immunol**, v. 38, p. 843-50, 1994.

CELLINI, L.; ALLOCATI, N.; PIATTELLI, A.; PETRELLI, I.; FANCI, P.; DAINELLI, B. Microbiological evidence of *Helicobacter pylori* from dental plaque in dyspeptic patients. **New Microbiol**, v.18, p. 187-92, 1995.

CELLINI, L.; MARZIO, L.; FERRERO, G. *et al.* Transmission of *Helicobacter pylori* in an Animal Model. **Dig Dis Sci**, v. 46, p. 62-68, 2004.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J.E.; GHIARA, P.; BORODOVSKY, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v. 93, p. 14648-53, 1996.

CERRUTTI, P.; ALZAMORA S. M. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. **Int J Food Microbiol**, v. 29, p. 379-386, 1996.

CERRUTTI, P.; ALZAMORA, S. M.; VIDALES, S. L. Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry puree. **J Food Sci**, v.62, p. 608–610, 1997.

CHAMBERS, H. F. Princípios gerais de terapia antimicrobiana. In: BRUNTON, L. L. *et al.* (Ed). **Goodman & Guilman: A bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 983.

CLEMENS, J.; ALBERT, M. J.; RAO, M.; HUDA, S.; QADRI, F.; VANLOON, F. P. L.; PRADHAN, B.; NAFICY, A.; BANIK, A. Sociodemographic, hygienic and nutritional correlates of *Helicobacter pylori* infection of young Bangladeshi children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 15, p. 1113-18, 1996.

COELHO, L. G.; ZATERKA, S.; FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA E NÚCLEO BRASILEIRO PARA O ESTUDO DO *HELICOBACTER*. Second Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter* infection. **Arq Gastroenterol**, v. 42, p. 128-132, 2005.

COHEN, H.: Peptic ulcer and *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 29, p. 775-89, 2000.

COINMRA, R. **Notas de Fitoterapia**. Laboratório Clínico S. A. 1958. p. 245.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984. p. 325.

COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; DEL GIUDICE, G., PARSONNET, J.;RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**, v. 284, p. 1328-33, 1999.

COVER, T.L.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* : A bacterial of gastrite, peptic ulcer disease, and gastric cancer. **Am Soc Microbiol News**, v.61, p. 21-6,1995.

COVER, T.L.; BLASER, M.J. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem**, v. 267, p. 10570-75,1992.

COVER, T.L.; HANSON, P.I.O.; HEUSER, J.E. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. **J Cell Biol**, v. 138, p. 759-69,1997.

COVER, T.L.; TUMMURU, M.K.; CAO, P.; THOMPSON, S.A.; BLASER, M.J. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. **J Biol Chem**, v. 269, p. 10566-73,1994.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRABTREE, J. Immunopathological aspects of *Helicobacter pylori* associated injury of the gastric mucosa. **Mol Med**, v. 31, p. 1340-48, 1994.

DAJANI, A. I.; AWAD, S.; UKABAM, S. *et al.* One-week triple regime therapy consisting of pantoprazole, amoxicillin and clarithromycin for cure of *Helicobacter pylori*-associated upper gastrointestinal diseases. **Digestion**, v. 60, p. 298-304, 1999.

DE FRANCESCO, V.; IERARDI, E.; HASSAN, C.; ZULLO, A. Is furazolidone therapy for *Helicobacter pylori* effective and safe? **Dig Dis Sci**, v. 54, p. 2298-2299, 2009.

DELTENRE, M.; DE KOSTER, E. How come I've got it? (A review of *Helicobacter pylori* transmission). **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 12, p. 479-82, 2000.

DESAI, H.G.; GILL, H.H.; SHANKARAN, K.; MEHTA, P.R.; PRABHU, S.R. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? **Scand J Gastroenterol**, v. 26, p. 1205-08, 1991.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1996.

DIAZ, P. P.; RAMOS, B. C.; MATTA, G. E. New C₆-C₃ and C₆-C₁ compounds from *Piper lenticillosum*. **J Nat Prod**, v. 49, n. 4, p. 690-691, 1986.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085–1097, 1995.

DORE M. P., BILOTTA M., VAIRA D., MANCA A., MASSARELLI G., LEANDRO G., ATZEI A., PISANU G., GRAHAM D. Y., REALDI G. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. **Dig Dis Sci**, v. 44, p. 1161-64, 1999.

DORE M. P., SEPULVEDA A. R., OSATO M. S., REALDI G., GRAHAM D. Y. *Helicobacter pylori* in sheep milk. **Lancet**, v. 354, p. 132, 1999.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **J Ethnopharmacol**, n. 97, p. 305-311, 2005.

DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, p. 720-741, 1997.

EATON, K. A.; CATRENICH, C. E.; MAKIN, K. M.; KRAKOWKA, S. Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **J. Infect. Dis**, v. 171, p. 459-62, 1995.

EATON, K.A.; KRAKOWKA, S. Avirulent urease-deficient *Helicobacter pylori* colonises gastric epithelial explants ex vivo. **Scand J Gastroenterol**, v. 30, p. 434-437, 1995.

ECCLISSATO, C.; MARCHIORETTO, M.A.M.; MENDONÇA, S.; GODOY, A.P.O.; GUERSONI, R.A.; DEGUER, M.; PIOVESAN, H.; FERRAZ, J.G.P.; PEDRAZZOLI, J. Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. **Helicobacter**, v. 7, p. 53-9, 2002.

EL-OMAR, E. M.; PENMAN, I. D.; ARDILL, J. E.; CHITAJALLU, R. S.; HOWIE, C.; MCCOLL, K. E. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. **Gastroenterology**, p. 681-91, 1995.

EL-SERAG, H. B.; SONNENBERG, A. Opposing time trends of peptic ulcer and reflux disease. **Gut**, v. 43, p. 327-333, 1998.

ENROTH, H.; WREIBER, K.; RIGO, R.; RISBERG, D.; URIBE, A.; ENGSTRAND, L. **In vitro** aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. **Helicobacter**, v. 4, p. 7-16, 1999.

FALLONE, C. A.; BARKUN, A.N.; FRIEDMAN, G.; MAYRAND, S.; LOO, V.; BEECH, R.; BEST, L.; JOSEPH, L. Is *Helicobacter pylori* eradication associated with gastroesophageal reflux disease? **Am.J.Gastroenterol**, p. 914-20, 2000.

FALLONE, C.A.; BARKUN, A.N.; GOTTKKE, M.U.; BEST, L.M. et al. Association of *Helicobacter pylori* genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal disease. **Am J Gastroenterol**, v.95, p. 659-69, 2000.

FAN X, G.; CHUA, A.; LI, T. G.; ZENG, Q. S. Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water. **J. Gastroenterol. Hepatol**, v. 13, p. 1096-98, 1998.

FARTHING, D.; SICA, D.; ABERNATHY, C. *et al.* High-performance liquid chromatographic method for determination of vanillin and vanillin acid in human plasma, red blood cells and urine. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 726, p. 303-307, 1999.

FELDMAN, M.; CRYER, B.; SAMMER, D.; LEE, E.; SPECHLER, S. J. Influence of *H. pylori* infection on meal-stimulated gastric acid secretion and gastroesophageal acid reflux. **Am.J.Physiol**, p. 1159-64, 1999.

FELDMAN, R.A.; ECCERSLEY, A.J.; HARDIE, J.M. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. **Br Med Bull**, v. 54, p. 39-53, 1998.

FERNANDEZ, H. Genero *Helicobacter*. In: TRABULSI, L. R et al., **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo, Atheneu, p. 263-67, 1999.

FERREIRA, A.B.H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1975. p. 1032.

FIGUEIREDO, C.; VAN DOORN, L.J.; NOGUEIRA, C.; SOARES, J.M.; PINHO, C.; FIGUEIRA, P.; QUINT, W.G.; CARNEIRO, F. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. **Scand J Gastroenterol**, v. 36, p. 128-35, 2001.

FLORA-FILHO, R.; CAMARA-LOPES, L. H.; ZILBERSTEIN, B. Histological criteria of esophagitis in the gastroesophageal reflux disease. Reevaluation of the sensitivity of the esophageal 24-hours pHmetry. **Arq Gastroenterol**, p. 197-202, 2000.

FORSYTH, M.H.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. **Infect Immun**, v. 66, p. 3088-94, 1998.

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

FRANCO, S. L.; BRUSCHI, M. L.; MOURA, L. P. P.; BUENO, J. H. F. Avaliação farmacognóstica de própolis da região de Maringá. **Ver Bras Farmacogn**, v. 9, p. 1-10, 2000.

FUCCIO, L. *et al.* Meta-analysis: duration of first-line proton-pump inhibitor based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. **Annals of Internal Medicine**, v. 147, n. 8, p. 553-562, oct. 2007.

FUNATOGAWA, K.; HAYASHI, S.; SHIMOMURA, H. *et al.* Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiol Immunol**, v. 48, p. 251-261, 2004.

GEBERT, B.; FISCHER, W.; WEISS, E.; HOFFMANN, R.; HAAS, R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science**, p. 1099-102, 2003.

GENTA, R. M.; HAMMER, R. W.; GRAHAM, D. Y *et al.* Gastritic lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution and response to therapy. **Hum Pathol**, v. 24, p. 577-83, 1993.

GERHARD, M.; LEHN, N.; NEUMAYER, N.; BOREN, T.; RAD, R.; SCHEPP, W. *et al.* Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v. 96, p. 12778-83, 1999.

GIANG, P. M. *et al.* New Labdane-Type Diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* SW. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 938-941, 2005.

GILLEN, D.; EL OMAR, E. M.; WIRZ, A. A.; ARDILL, J.E.; MCCOLL, K.E. The acid response to gastrin distinguishes duodenal ulcer patients from *Helicobacter pylori*-infected healthy subjects. **Gastroenterology**, p. 50-7, 1998.

GISBERT, J. P. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. **World J Gastroenterol**, v. 14, p. 5385-5402, 2008.

GISBERT, J. P.; KHORRAMI, S.; CALVET, X. *et al.* Meta-analysis: proton pump inhibitors vs. H2-receptor antagonists-their efficacy with antibiotics in *Helicobacter pylori* eradication. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, p. 757-766, 2003.

GISBERT, J. P.; PAJARES, J. M. Review article: *Helicobacter pylori* "rescue" regimen when proton pump inhibitor-based triple therapies fail. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 16, p. 1047-1057, 2002.

GODOY, A.P.; RIBEIRO, M.L.; BENVENGO, Y.H.; VITIELLO, L.; MIRANDA, M.M.; MENDONCA, S.; PEDRAZZOLI, J.JR. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. **BMC Gastroenterol**, v. 3, p. 20, 2003.

GRAHAM, D. Y.; DE BOER, W. A.; TYTGAT, G. N. Choosing the Best anti-*Helicobacter pylori* therapy: effect of antimicrobial resistance. **Am J Gastroenterol**, v. 91, p. 1072-1076, 1996.

GRAHAM, D. Y.; OSATO, M. S.; HOFFMAN, J. et al. Furazolidone combination therapies for *Helicobacter pylori* infection in the United States. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14, p. 211-215, 2000.

GRAHAM, D. Y.; GENTA, R.; EVANS, D.G.; REDDY, R.; CLARRIDGE, J.E.; OLSON, C.A.; EDMONDS, A.L.; SIEPMAN, N. *Helicobacter pylori* does not migrate from the antrum to the corpus in response to omeprazole. **Am J Gastroenterol**, v. 91, p. 2120-24, 1996.

HACKELSBERGER, A.; GUNTHER, T.; SCHULTZE, V.; LABENZ, J.; ROESSNER, A.; MALFERTHEINER, P. Prevalence and pattern of *Helicobacter pylori* gastritis in the gastric cardia. **Am J Gastroenterol**, p. 2220-24, 1997.

HAMLET, A.; OLBE, L. The influence of *Helicobacter pylori* infection on postprandial duodenal acid load and duodenal bulb pH in humans. **Gastroenterology**, p. 391-400, 1996.

HARRIS, P. R.; SMYTHIES, L. E.; SMITH, P. D.; DUBOIS, A. Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. **J Infect Dis**, p. 783-86, 2000.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N.; NIWAYAMA, S. Antiviral activity of an extracton *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type 1. **Planta Med**, v. 56, p. 439-443, 1990.

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

HEIMBEGNER, J. L.; BECK, C. E.; BECK, J. J. Antibacterial Activity of Several, Several Benzylidenephthalide Derivatives. Benzylidenephthalide. **J Undergrad Chem Res**, v. 33, p. 141-143, 2004.

HOEHNE, F.C. **Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais**. São Paulo: Graphinars, 1939, 355p.

HOGAN, D. L.; RAPIER, R. C.; DREILINGER, A et al. Duodenal bicarbonate secretion: eradication of *Helicobacter pylori* and duodenal structure and function in humans. **Gastroenterology**, v. 110, p. 705-16, 1996.

HOJO, M.; MIWA, H.; NAGAHARA, A.; SATO, N. Pooled analysis on the efficacy of the second-line treatment regimens for *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol**, v. 36, p. 690-700, 2001.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOPKINS, R.J.; VIAL, P.A.; FERRECCIO, C.; OVALLE, J.; PRADO, P.; SOTOMAYOR, V. et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. **J Infect Dis**, v. 168, p. 222-26, 1993.

HOSTETTMANN, K.; EMERSON, F. Q.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. 1 ed. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

HOUGHTON, J.; WANG, T. C. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: A new Paradigm for Inflammation-Associated Epithelial Cancers. **Gastroenterology**, v. 128, p. 1567-78, 2005.

HUANG, J. Q. & HUNT, R. H. Review article: *Helicobacter pylori* and gastric cancer – the clinician's point of view. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14, p. 48-54, 2000.

HUANG, J. Q.; ZHENG, G. F.; SUMANAC, K.; IRNINE, E. J.; HUNT, R. H. Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 125, p. 1636-44, 2003.

HULTEN, K.; HAN, S. W.; ENROTH, H.; KLEIN, P. D.; OPEKUN, A. R.; GILMAN, R. H.; EVANS, D. G.; ENGSTRAND, L.; GRAHAM, D. Y.; ELZAATARI, F. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. **Gastroenterology**, v. 110, p. 1031-35, 1996.

HUSSEL, T.; ISAACSON, P. G.; CRABTREE, J. E et al. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v.342, p. 575-77, 1993.

IARC. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Lyon: World Health Organization. vol 61, p. 177-240, 1994.

IKENOUE, T.; MAEDA, S.; OGURA, K.; AKANUMA, M.; MITSUNO, Y.; IMAI, Y. et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, p. 181-86, 2001.

ISLAM, M.A. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of *Leonurus sibiricus*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 359-362, 2005.

ITO, Y.; AZUMA, T.; ITO, S.; SUTO, H.; MIYAJI, H.; YAMAZAKI, Y. et al. Sequence analysis and clinical significance of the *iceA* gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 483-88, 2000.

JANSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. **Pharmazie**, v. 45, p. 70, 1987.

KADAYIFCI, A.; BUYUKHATIPOGLU, H.; CEMIL SAVAS, M.; SIMSEK, I. Eradication of *Helicobacter pylori* with triple therapy: an epidemiologic analysis of trends in Turkey over 10 years. **Clin Ther**, v. 28, p. 1960-1966, 2006.

KAMAT, J. P.; GHOSH, A.; DEVASAGAYAM, T. P. Vanillin as an antioxidant in rat liver mitochondria: Inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation induced by photosensitization. **Mol Cell Biochem**, v. 209, p. 47-53, 2000.

KEARNEY, D. J.; BROUSAL, A. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in clinical practice in the United States: results from 224 patients. **Dig Dis Sci**, v. 45, p. 265-271, 2000.

KEATES, S.; KEATES, A. C.; WARNY, M.; PEEK, R. M. J. R.; MURRAY, P. G.; KELLY, C. P. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag+* and *cag-* *Helicobacter pylori*. **J Immunol**, p. 5552-59, 1999.

KELLY, S.M.; PITCHER, M.C.; FARMERY, S.M.; GIBSON, G.R. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterology**, v.107, p. 1671-74,1994.

KESHAVA, C.; KESHAVA, N.; ONG, T. M.; NATH, J. Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cells. **Mutat Res**, v. 397, p. 149-159, 1998.

KIDD, M.; PEEK, R.M.; LASTOVICA, A.J.; ISRAEL, D.A.; KUMMER, A.F.; LOUW, J.A. Analysis of *iceA* genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. **Gut**, v. 49, p. 629-35, 2000.

KIM, E. M.; JUNG, H. R.; MIN, T. J. Purification, structure determination and biological activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. **Bull Korean Chem Soc**, v. 22, p. 59-62, 2001.

KIM, S.Y.; WOO, C.W.; LEE, Y.M.; SON, B.R.; KIM, J.W.; CHAE, H.B. et al. Genotyping *CagA*, *VacA* subtype, *IceA1*, and *BabA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. **J Korean Med Sci**, v. 16, p. 579-84, 2001.

KLEIN, P.D.; GRAHAM, D.Y.; GAILLOUR, A.; OPEKUN, A.R.; SMITH, E.O. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. **Lancet**, v. 337, p. 1503-06, 1991.

KOIKE, T.; OHARA, S.; SEKINE, H.; IIJIMA, K.; KATO, K.; TOYOTA, T.; SHIMOSEGAWA, T. Increased gastric acid secretion after *Helicobacter pylori* eradication may be a factor for developing reflux oesophagitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 8, p. 813-20, 2001.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Desenvolvimento de fármacos. In: KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. (Ed). **Química farmacêutica**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 39.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm**, v. 55, p. 423-430, 2005.

KRAJDEN, S.; FUKSA, M.; ANDERSON, J.; KEMPSTON, J.; BOCCIA, A.; PETREA, C. et al. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, v. 27, p. 1397-1408, 1989.

KUIPERS, E. J.; LEE, A.; KLINKENBERG-KNOL, E. C.; MEUWISSEN, S. G. Review article: the development of atrophic gastritis--*Helicobacter pylori* and the effects of acid suppressive therapy. **Aliment Pharmacol Ther**, p. 331-40, 1995.

KUSTERS, J.G.; GERRITS, M.M.; VAN STRIJP, J.A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infect Immun**, v. 65, p. 3672-79, 1997.

LABENZ, J.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* in gastro-oesophageal reflux disease: causal agent, independent or protective factor? **Gut**, p. 277-80, 1997.

LAMARQUE, D.; PEEK, M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, p. 21-30, 2003.

LAUREN, R. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: An attempt a histoclinical classification. **Acta Pathologica Microbiol Scand**, v. 64, p. 31, 1965.

LEE, A.; O'ROURKE, J.; DE UNGRIA, M. C. et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. **Gastroenterology**, v. 113, p. 732, 1997.

LEE, J.; O'MORAIN, C. Who should be treated for *Helicobacter pylori* infection? A review of consensus conferences and guidelines. **Gastroenterology**, p. 99-106, 1997.

LEUNK, R.D.; JOHNSON, P.T.; DAVID, B.C.; KRAFT, W.G.; MORGAN, D.R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J Med Microbiol**, v. 26, p. 93-9, 1988.

LEVI, S.; BEARDSHALL, K.; SWIFT, I.; FOULKES, W.; PLAYFORD, R.; GHOSH, P.; CALAM, J. Antral *Helicobacter pylori*, hypergastrinaemia, and duodenal ulcers: effect of eradicating the organism. **BMJ**, v. 1504-05, 1989.

LIND, T.; VELDHUYZEN VAN ZANTEN, S.; UNGE, P. *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study. **Helicobacter**, v. 1, p. 138-144, 1996.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais.** São Paulo: Nova Odessa, 2002, 278p.

LUNDELL, L.; MIETTINEN, P.; MYRVOLD, H. E.; PEDERSEN, S. A.; THOR, K.; ANDERSSON, A.; HATTLEBAKK, J.; HAVU, N.; JANATUINEN, E.; LEVANDER, K.; LIEDMAN, B.; NYSTROM, P. Lack of effect of acid suppression therapy on gastric atrophy. Nordic Gerd Study Group. **Gastroenterology**, p. 319-26, 1999.

LUNDELL, L. R.; DENT, J.; BENNETT, J. R.; BLUM, A. L.; ARMSTRONG, D.; GALMICHE, J. P.; JOHNSON, F.; HONGO, M.; RICHTER, J. E.; SPECHLER, S. J.; TYTGAT, G. N.; WALLIN, L. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. **Gut**, p. 172-80, 1999.

LUPETTI, P.O.; HEUSER, J.E.O.; MANETTI, R.O.; MASSARI, P.O.; LANZAVECCHIA, S.O.; BELLON, P.L. *et al.* Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. **J Cell Biol**, v. 133, p. 801-07, 1996.

MAEDA, S.; YOSHIDA, H.; MITSUNO, Y.; HIRATA, Y.; OGURA, K.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. **Gut**, p. 771-78, 2002.

MAEDA, S.; OGURA, K.; YOSHIDA, H.; KANAI, F.; IKENOUE, T.; KATO, N.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Major virulence factors, *vacA* and *cagA*, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. **Gut**, v. 42, p. 338-43, 1998.

MAHASNEH, A. M. A.; ADEL, M. A.; EL-OQLAH, A. A. B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **J Ethnopharmacol**, v. 64, p. 271-276, 1999.

MALATY, H. M.; ENGSTRAND, L.; PEDERSEN, N. L.; GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. **Ann Intern Med**, v. 120, p. 982-86, 1994.

MALATY, H. M.; GRAHAM, D. Y. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 35, p. 742-45, 1994.

MALATY, H. M.; GRAHAM, D. Y.; ISAKSSON, I.; ENGSTRAND, L.; PEDERSEN, N. L. Co-twin study of the effect of environment and dietary elements on acquisition of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Epidemiol**, v. 148, p. 793-97, 1998.

MALATY, H. M.; KIM, J. G.; KIM, S. D.; GRAHAM, D. Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korean children—inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high prevalence in adults. **Am J Epidemiol**, v. 143, p. 257-62, 1996.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C. *et al.* Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut**, v. 56, p. 772-781, 2007.

MANES, G.; MOSCA, S.; LACCETTI, M.; LIONIELLO, M.; BALZANO, A. *Helicobacter pylori* infection, pattern of gastritis, and symptoms in erosive and nonerosive gastroesophageal reflux disease. **Scand J Gastroenterol**, p. 658-62, 1999.

MAPSTONE, N.P.; LYNCH, D.A.; LEWIS, F.A.; AXON, A.T.; TOMPKINS, D.S.; DIXON, M.F.; QUIRKE, P. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. **Lancet**, v. 341, p. 447, 1993.

MARAIS, A.; MONTEIRO, L.; MEGRAUD, F. Microbiology of *Helicobacter pylori*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 241, p. 103-22, 1999.

MARCHETTI, M.; ARICÓ, B.; BURRONI, D. *et al.* Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. **Science**, v. 267, p. 1655-1658, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996

MARSHALL, B. J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311-1315, jun. 1984.

MARTINEZ, A.; GONZALEZ, C.; KAWAGUCHI, F.; MONTOYA, R.; CORVALAN, A.; MADARIAGA, J. *et al.* *Helicobacter pylori*: *cagA* analysis and *vacA* genotyping in Chile. Detection of a s2/m1 strain. **Rev Med Chil**, v. 129, p. 1147-53, 2001.

MARTÍNEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, N.; JAUREGUI A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 52, n. 3, p. 171-174, 1996.

MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanosidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum* **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.

MARTINS, R. C.; SARTORELLI, P.; LATORRE, L. R.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 7, p. 843-846, 2000.

MATSUDA, H.; SHIMODA, H.; YOSHIKAWA, M. Structure-requirements of isocoumarins, and stilbenes from *Hrydrangeae Dulcis Folium* for inhibition activity on histamine release from rat peritoneal cells. **Bioorg med Chem**, v. 7, p. 1445-1450, 1999.

MATSUNAGA, K.; SASAKI, S.; OHIZUME, Y. Excitatory and inhibitory effects of paraguayian medicinal plants *Equisetum giganteum*, *Acanthospermum australe*, *Allophylus edlis* and *Cordia salicifolia* on contraction of rabbit aorta and giuneapig left atrium. **Natural Medicines**, v. 51, p. 478-481, 1997.

MCCLAIN, M.S.; SCHRAW, W.; RICCI, V.; BOQUET, P.; COVER, T.L. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. **Mol Microbiol**, v. 37, p. 433-42, 2000.

MCGOWAN, C.C.; COVER, T.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic implications. **Gastroenterology**, v.110, p. 926-38, 1996.

MÉGRAUD, F. Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. **Drugs**, v. 64, p. 1893-1904, 2004.

MÉGRAUD, F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, n. 11, suppl. 1, p. 43-53, apr. 1997.

MENDALL, M. A.; GOGGIN, P. M.; MOLINEAUX, N.; LEVY, J.; TOOSY, T.; STRACHAN, D.; NORTHFIELD, T. C. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. **Lancet**, v. 339, p. 896-97, 1992.

MENDONÇA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M.S.; GODOY, A.P.O.; GUERZONI, R.A.; DEGGER, M.; PEDRAZZOLI, J.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, v. 5, p. 79-83, 2000.

MENGHINI, L.; EPIFANO, F.; LEPORINI, L.; PAGIOTTI, R.; TITILINI, B. Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia salicifolia* Cham. **J Med Food**, v. 11, p. 193-194, 2008.

MIEHLKE, S.; YU, J.; SCHUPPLER, M.; FRINGS, C.; KIRSCH, C.; NEGRASZUS, N. et al. *Helicobacter pylori* *vacA*, *iceA*, and *cagA* status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. **Am J Gastroenterol**, v. 96, p. 1008-13, 2001.

MITCHELL, H. M. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and its relation to gastric cancer. In: Goodwin, C. S.; Wormsley, B. W. **Helicobacter pylori: Biology and Clinical Practice**. CRC Press, Boca Raton, Fla; p. 95–114, 1993.

MITCHELL, H.M. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 241, p. 11-30, 1999.

MITCHELL, H.M.; LI, Y.Y.; HU, P.J.; LIU, Q.; CHEN, M.; DU, G.G.; WANG, Z.J.; LEE, A.; HAZELL, S.L. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **J Infect Dis**, v. 166, p. 149-53, 1992.

MITSCHER, L. A.; LEU, R. P.; BARTHALA, M. S.; WU-NAN, W.; BEAL, J. L. Antimicrobial agents from higher plants. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.

MOBLEY, H. L. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. **Gastroenterology**, v. 113, p. 21-28, 1997.

MOHAMMADI, M.; CZINN, S.; REDLINE, R.; NEDRUD, J. Helicobacter-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. **J Immunol**, p. 4729-38, 1996.

MOLINARI, M.; SALIO, M.; GALLI, C.; NORAIS, N.; RAPPUOLI, R.; LANZAVECCHIA, A.; MONTECUCCO, C.; Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. **J Exp Med**, p. 135-40, 1998.

MONTECUCCO, C.; PAPINI, E.; DE BERNARD, M.; ZORATTI, M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. **FEBS Lett**, v. 452, p. 16-21, 1999.

MORALES-ESPINOSA, R.; CASTILLO-ROJAS, G.; GONZALEZ-VALENCIA, G.; PONCE DE LEON, S.; CRAVIOTO, A.; ATHERTON, J.C.; LOPEZ-VIDAL, Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. **J Clin Microbiol**, v. 37, 3001-04, 1999.

MOREIRA, D. L.; SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C. *et al.* Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. **An. Acad. Bras. Ci**, v. 73, p. 33-37, 2001.

MORRIS, A.; NICHOLSON, G.; LLOYD, G.; HAINES, D.; ROGERS, A.; TAYLOR, D. Seroepidemiology of *Campylobacter pyloridis*. **N Z Med J**, v. 99, p. 657-59, 1986.

MOSS, S. F.; LEGON, S.; BISHOP, A. E.; POLAK, J. M.; CALAM, J. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease. **Lancet**, p. 930-2, 1992.

MURAKAMI, S. Stachydrim in *Leonurus sibiricus* L. **Acta Phytochemichal**, v.13, p.161-184, 1943.

MURRAY L. J., MCCRUM E. E., EVANS A. E., BAMFORD K. B. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among 4742 randomly selected subjects from northern Ireland. **Int J Epidemiol**, v. 26, p. 880-87, 1997.

NAGASAWA, W. *et al.* Effects of Motherwort (*Leonurus sibiricus* L) on Preneoplastic and Neoplastic Mammary-Gland Growth in Multiparous Gr/A Mice **Anticancer Research**, v. 10, p. 203-211, 1990.

NAMAVAR, F.; ROOSENDAAL, R.; KUIPERS, E.J.; DE GROOT, P.; VAN DER BIJL, M.W.; PENA, A.S.; DE GRAAFF, J. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 14, p. 234-37, 1995.

NARDONE, G.; MALFERTHEINER, P.; ROCCO, A. Review article: *Helicobacter pylori* and molecular events in precancerous gastric lesion. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 20, p. 261-70, 2004.

NARIMAN, F.; EFTEKHAR, F.; HABIBI, Z.; FALSAFI, T. Anti- *Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. **Helicobacter**, v. 9, p. 146-151, 2004.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M. L.; ROJAS, G.; XAVIERB, L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J Ethnopharmacol**, v. 53, p. 143-147, 1996.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J. *et al.* Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 6, p. 621- 626, 2000.

NEGRINI, R.; SAVIO, A.; APPELMELK, B. J. Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, p. 13-6, 1997.

NEWTON, M.; BRYAN, R.; BURNHAM, W. R.; KAMM, M. A. Evaluation of *Helicobacter pylori* in reflux oesophagitis and Barrett's oesophagus. **Gut**, p. 9-13, 1997.

NGUYEN, V.Q.; CAPRIOLI, R.M.; COVER, T.L. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **Infect Immun**, v. 69, p. 543-46, 2001.

NILIUS, M.; STROHLE, A.; BODE, G.; MALFERTHEINER, P. Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. **Zentralbl Bakteriol**, v. 280, p. 259-272, 1993.

NISHIYA, D.; SHIMOYAMA, T.; FUKUDA, S. YOSHIMURA, T.; TANAKA, M.; MUNAKATA, A. Evaluation of the clinical relevance of the *iceA1* gene in patients with *Helicobacter pylori* infection in Japan. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, p. 36-39, 2000.

NURNBERG, M.; SCHULZ, H. J.; RUDEN, H.; VOGT, K. Do conventional cleaning and disinfection techniques avoid the risk of endoscopic *Helicobacter pylori* transmission? **Endoscopy**, v. 35, p. 295-299, 2003.

OGURA, K.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, S.; IKENOUE, T.; KANAI, F.; YOSHIDA, H. *et al.* Interleukin-8 production in primary cultures of human gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori*. **Dig Dis Sci**, v. 43, p. 2738-43, 1998.

OHKUSA, T.; MIWA, H.; HOJO, M.; KUMAGAI, J.; TANIZAWA, T.; ASAOKA, D.; TERAJ, T.; OHKURA, R.; SATO, N. Endoscopic, histological and serologic findings of gastric hyperplastic polyps after eradication of *Helicobacter pylori*: comparison between responder and non-responder cases. **Digestion**, p. 57-62, 2003.

OLCZAK, A. A.; SEYLER, R. W. JR.; OLSON, J. W.; MAIER, R. J. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. **Infect Immun**, p. 580-83, 2003.

OLIVEIRA, A. M.; ROCHA, G. A.; QUEIROZ, D. M.; DE MOURA, S. B.; RABELLO, A. L. Seroconversion for *Helicobacter pylori* in adults from Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93 p. 261-3, 1999.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

OLMOS, J. A.; RIOS, H.; HIGA, R. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Argentina—results of a nationwide epidemiologic study. **J Clin Microbiol**, v. 31, p. 33-7, 2000.

PAJARES, J.M. *H. pylori* infection: its role in chronic gastritis, carcinoma and peptic ulcer. **Hepato-Gastroenterology**, v. 42, p. 827-41, 1995.

PAPINI, E.; ZORATTI, M.; COVER, T.L. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. **Toxicon**, v. 39, p. 1757-67, 2001.

PARSONNET, J.; HANSEN, S.; RODRIGUES, L. et al. Helicobacter pylori infection and Gastric Lymphoma. **The New England Journal of Medicina**, v. 330, p. 1267-71, 1994.

PARSONNET, J.; SHMUELY, H.; HAGGERTY, T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. **JAMA**, v. 282, p. 2240-2245, 1999.

PEEK, R. M. JR.; MILLER, G. G.; THAM, K. T.; PEREZ-PEREZ, G. I.; ZHAO, X.; ATHERTON, J. C.; BLASER, M. J. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. **Lab Invest**, p. 760-70, 1995.

PEEK, R.M.; THOMPSON, S.A.; DONAHUE, J.P.; THAM, K.T.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; MILLER, G.G. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. **Proc Assoc Am Phys**, v. 110, p. 531-44, 1998.

PEEK, R.M.; VAN DOORN, L.J.; DONAHUE, J.P.; THAM, K.T.; FIGUEIREDO, C.; BLASER, M.J.; MILLER, G.G. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression *in vivo* and relationship to gastric pathology. **Infect Immun**, v. 68, p. 5488-95, 2000.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C. et al. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, p. 970-983, 2007.

PEREZ-PEREZ, G. I.; TAYLOR, D. N.; BODHIDATTA, L.; WONGSRI-CHANALAI, J.; BAZE, W. B.; DUNN, B. E.; ECHEVERRIA, P. D.; BLASER, M. J. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand. **J Infect Dis**, v. 161, p. 1237-41, 1990.

PEREZ-PEREZ, G. I.; CUTLER, A. F.; BLASER, M. J. Value of serology as a noninvasive method for evaluating the efficacy of treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Infect Dis**, p. 1038-43, 1997.

PERRY, N. B.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G. A cytotoxic and antifungal 1,4-naphthoquinone and related compounds from a New Zealand brown alga, *Landsburgia quercifolia*. **J Nat Prod**, v. 54, p. 978–985, 1991.

PETERSON, W. L. Review article: *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 16, p. 40-6, 2002.

PETERSON, W.L.; GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori*. In: SAUNDERS, W. B C. **Gastrointestinal and liver disease**. 6 ed. Philadelphia: Pennsylvania: USA, 1998. p. 604-19.

PIOTROWSKI, J.; MAJKA, J.; SLOMIANY, A.; SLOMIANY, B. L. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide inhibition of gastric mucosal somatostatin receptor. **Biochem Mol Biol Int**, p. 491-98, 1995.

PRETTO, B. *et al.* Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59c, p. 657-662, 2004.

QASIM, A.; SEBASTIAN, S. THORNTON, O. *et al.* Rifabutin- and furazolidone-based *Helicobacter pylori* eradication therapies after failure of standart first- and second-line eradication attempts in dyspepsia patients. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 21, p. 91-96, 2005.

QUEIROZ, D. M.; MENDES, E. N.; ROCHA, G. A.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, C.A.; MAGALHAES, P. P.; MOURA, S. B.; NOGUEIRA, A. M. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int J Cancer**, p. 135-39, 1998.

RAMACHANDRA, R. S.; RAVISHANKAR, G. A. Biotransformation of isocugenol to *Vanilla* flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of β -cyclodextrin and fungal elicitor. **Process biochem**, v. 35, p. 341-348, 1999.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. **J Sci Food Agric**, v.80, p. 289–304, 2000.

RIBEIRO, M.L.; GODOY, A.P.; BENVENGO, Y.H.; MENDONCA, S.; PEDRAZZOLI, J.Jr Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 36, p. 181-85, 2003.

RODRIGUES, M.N.; QUEIROZ, D.M.; BEZERRA FILHO, J.G.; PONTES, L.K.; RODRIGUES, R.T.; BRAGA, L.L. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 16, p. 201-05, 2004.

ROLLISON, S.; LEVENE, A.; MORGAN, G. J. et al. Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. **Blood**, v. 102, p. 1007-11, 2003.

ROTHENBACHER, D.; BLASER, M. J.; BODE, G.; BRENNER, H. Inverse relationship between gastric colonization of *Helicobacter pylori* and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study. **J Infect Dis**, p. 1446-49, 2000.

ROTHENBACHER, D.; BODE, G.; WINZ, T.; BERG, G.; ADLER, G.; BRENNER, H. *Helicobacter pylori* in out-patients of a general practitioner—prevalence and determinants of current infection. **Epidemiol Infect**, v. 119, p. 151-57, 1997.

ROWLAND, M.; DRUMM, B. Clinical significance of *Helicobacter* infection in children. **Br Med Bull**, v. 54, p. 95-103, 1998.

RUSSO, F.; NOTARNICOLA, M.; DI MATTEO, G.; LEOCI, C.; CARUSO, M.L.; PIRRELLI, M. et al. Detection of *Helicobacter pylori cagA* gene by polymerase chain reaction in faecal samples. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 11, p. 251-56, 1999.

SAAD, R. J.; CHEY, W. D. Review article: current and emerging therapies for functional dyspepsia. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 24, p. 475-492, 2006.

SAITO, M. L.; OLIVEIRA, F. Morfodiagnose e Identificação Cromatográfica em Camada Delgada de Chá de Bugre – *Cordia ecalyculata* Vell. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 67, p. 1-16, 1986.

SANCHES, B.; COELHO, L.; MORETZOHN, L. et al. Failure of *Helicobacter pylori* treatment after regimes containing clarithromycin: new practical therapeutic options. **Helicobacter**, v. 13, p. 572-576, 2008.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 35, p. 273-280, 2004.

SASAKI, K.; TAJIRI, Y.; SATA, M.; FUJII, Y.; MATSUBARA, F.; ZHAO, M. G.; SHIMIZU, S.; TOYONAGA, A.; TANIKAWA, K. *Helicobacter pylori* in the natural environment. **Scand J Infect Dis**, v. 31, p. 275-80, 1999.

SATHAR, M. A.; GOUWS, E.; SIMJEE, A. E.; MAYAT, A. M. Seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in South African children. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, p. 393-95, 1997.

SATOH, M. et al. Studies of the constituents of *Leonurus sibiricus*. **Chemical SAVONA**, G. et al. Diterpenoids from *Leonurus sibiricus*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2699-2701, 1982.

SEGAL, E. D.; CHA, J.; FALKOW, S, TOMPKINS LS. CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 14559-69, 1999.

SHARMA, S.A.; TUMMURU, M.K.; MILLER, G.G.; BLASER, M.J. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. **Infect Immun**, v. 63, p. 1681-87, 1995.

SHAUGHNESSY, D. T.; SCHAAPER, R. M.; UMBACH, D. M.; DEMARINI, D. M. Inhibition of spontaneous mutagenesis by vanillin and cinnamaldehyde in *Escherichia coli*: dependence on recombinational repair. **Mutat Res**, v. 602, p. 54–64, 2006.

SHAUGHNESSY, D. T.; SETZER, R. W.; DEMARINI, D. M. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. **Mutat Res**, v. 480, p. 55-69, 2001.

SILVA, J. G. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. Em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, v. 4, p. 572-577, out/dez. 2007.

SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *in vivo*. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

SIPPONEN, P.; HYVARINEN, H.; SEPPALA, K.; et al. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, p. 67-71, 1998.

SIQUEIRA, V. L. D.; CORTEZ, D. A. G.; OLIVEIRA, C.E.; NAKAMURA, C. V.; BAZOTTE, R. B. Pharmacological studies of *Cordia salicifolia* Cham in normal and diabetic rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 215-218, 2006.

SIQUEIRA-JACCOUD, R.J. **Contribuição ao Estudo Farmacognóstico do *Solanum cernuum* Velozzo**. Faculdade Nacional de Farmácia, Universidade do Brasil, São Paulo, 56 p.

SIVAKUMAR, P. M.; PRIYA, S.; DOBLE, M. Synthesis, biological evaluation, mechanism of action and quantitative structure-activity relationship studies of chalcones as antibacterial agents. **Chem Biol Drug Des**, v. 73, p. 403-405, 2009.

SOBALA, G. M.; CRABTREE, J.; DIXON, M. F.; SCHORAH, C. J.; TAYLOR, J. D.; RATHBONE, B. J.; HEATLEY, R. V.; AXON, A. T. R. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology and gastric juice ascorbic acid concentrations. **Gut**, v. 32, p. 1415-18, 1991.

SOUTO, F.J.; FONTES, C.J.; ROCHA, G.A.; DE OLIVEIRA, A.M.; MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 171-74, 1998.

SOUZA, G.C. *et al.* Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-43, 2004.

STEER, H.W. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. **Journal of Clinical Pathology**, v. 28, n. 8, p. 639-646, aug. 1975.

STOLTE, M. *Helicobacter pylori* and MALT lymphoma. **Lancet**, v. 339, p. 745-47, 1992.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**, p. 1175-86, 2002.

SUNDRUD, M. S.; TORRES, V. J.; UNUTMAZ, D.; COVER, T. L. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. **Proc Natl Acad Sci U.S.A**, p. 7727-32, 2004.

SUZUKI, S.; SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T. *et al.* Past rifampicin dosing determines rifabutin resistance of *Helicobacter pylori*. **Digestion**, v. 79, p. 1-4, 2009.

TEFERA, S.; HATLEBAKK, J. G.; BERSTAD, A. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastro-oesophageal reflux. **Aliment Pharmacol Ther**, p. 915-20, 1999.

THOMAS, J.E.; PRETOLANI, S. Epidemiology of infection *in the year in Helicobacter pylori* 1994. **The European Helicobacter pylori Study Group**, p. 6-11, 1994.

TORRES, J.; LEALHERRERA, Y.; PEREZ PEREZ, G.; GOMEZ, A.; CAMORLINGAPONCE, M.; CEDILLORIVERA, R.; TAPIACONYER, R.; MUNOZ, O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. **J Infect Dis**, v. 178, p. 1089-94, 1998.

TORRES, J.; PEREZ-PEREZ, G.; GOODMAN, K.J.; ATHERTON, J.C.; GOLD, B.D.; HARRIS, P.R. *et al.* A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Arch Med Res**, v. 31, p. 431-469, 2000.

TRABADELA, C.; SÁNCHEZ-FIDALGO, P.; MIÑO, P. *et al.* Gastroprotective effects of *Piper carpunya* against Diclofenac-induced gastric lesions in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 829-837, 2008.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P.L.; DA ROCHA PASIN, F. D.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 3, p. 249-254, 2006.

TUMMURU, M.K.; COVER, T.L.; BLASER, M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. **Infect Immun**, v. 61, p. 1799-809, 1993.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; et al. *Helicobacter pylori* and the envelopment of gastric cancer. **N Engl J Med**, v. 345, p. 784-89, 2001.

VAIRA, D.; D'ANASTASIO, C.; HOLTON, J.; DOWSETT, J.; LONDEI, M.; SALMON, P.; GANDOLFI, L. Is *Campylobacter pylori* a zoonosis? **AM J Gastroenterology**. v. 83, n. 12, p. 1328-1336, dec. 1988.

VAKIL, N. Antimicrobial resistance and eradication strategies for *Helicobacter pylori*. **Rev Gastroenterol Disord**, v. 9, p. 78-83, 2009.

VAKIL, N.; HAHN, B.; MCSORLEY, D. Recurrent symptoms and gastro-oesophageal reflux disease in patients with duodenal ulcer treated for *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther**, p. 45-51, 2000.

VAN DER ENDE, A.; VAN DER HULST, R.W.M.; DANKERT, J.; TYTGAT, G.N.J. Reinfection versus recrudescence in *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 11, p. 55-61, 1997.

VAN DOORN, L.J.; FIGUEIREDO, C.; MEGRAUD, F.; PENA, S.; MIDOLO, P.; QUEIROZ, D.M. et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 116, p. 823-30, 1999.

VAN DOORN, L.J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PLAISIER, A.; SCHNEEBERGER, P.M.; BOER, W.; QUINT, W. Clinical Relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 115, p. 58-66, 1998.

VAN DOORN, L.J.; QUINT, W.; SCHNEEBERGER, P.; TYTGAT, G.M.; DE BOER, W.A. The only good *Helicobacter pylori* is a dead *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v. 350, p. 71-2, 1997.

VAN DOORN, L.J.; SCHNEEBERGER, P.M.; NOUHAN, N.; PLAISIER, A.; QUINT, W.; BOER, W. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. **GUT**, v. 46, p. 321-26, 2000.

VAN ZANTEN, S. Do socio-economic status, marital status and occupation influence the prevalence of *Helicobacter pylori* infection? **Aliment Pharmacol Ther**, v. 9, p. 41-4, 1995.

VAROLI, O.; LANDINI, M.P.; LAPLACA, M.; TUCCI, A.; CORINALDESI, R.; PAPARO, G.F.; STANGHELLINI, V.; BARBARA, L. Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. **Am J Gastroenterol**, v. 86, p. 249, 1991.

VELAZQUEZ, M.; FEIRTAG, J. M. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. **Int J Food Microbiol**, v. 53, p. 95-104, 1999.

VICARI, J. J.; PEEK, R. M.; FALK, G. W.; GOLDBLUM, J. R.; EASLEY, K. A.; SCHNELL, J.; PEREZ-PEREZ, G. I.; HALTER, S. A.; RICE, T. W.; BLASER, M. J.; RICHTER, J. E. The seroprevalence of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. **Gastroenterology**, p. 50-7, 1998.

VIEIRA, R. A.; LAPA, A. J.; LIMA, T. C. M. Evaluation of the central activity of the ethanolic extract of *Acosmium subelegans* (Mohlenbr) in mice. **Rev Bras Farmacogn**, v. 12, p. 50-51, 2002.

WANG, H.J.; KUO, C.H.; YEH, A.A.; CHANG, P.C.; WANG, W.C. Vacuolating toxin production in clinical isolates of *Helicobacter pylori* with different *vacA* genotypes. **J Infect Dis**, v. 178, p. 207-12, 1998.

WEBB, P. M.; KNIGHT, T.; GREAVES, S.; WILSON, A.; NEWELL, D. G.; ELDER, J.; FORMAN, D. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood—evidence for person to person transmission in early life. **Br Med J**, v. 308, 750-53, 1994.

WIRTH, H. P.; YANG, M.; PEEK, R. M. JR.; THAM, K. T.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. **Gastroenterology**, p. 1091-98, 1997.

WOTTERPOON, A. C.; DOGLIONI, C.; DISS, T. C. et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v. 342, p. 575-77, 1993.

YAHIRO, K.; NIIDOME, T.; KIMURA, M.; HATAKEYAMA, T.; AOYAGI, H.; KURAZONO, H. et al. Activation of *Helicobacter pylori* *VacA* toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. **J Biol Chem**, v. 274 p. 3693-99, 1999.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GUTIERREZ, O.; KIM, J.G.; KASHIMA, .; GRAHAM, D.Y. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 2274-79, 1999.

ZAIMILPA, A.; HERRERA-RUIZ, M.; DEL OLMO, E. et al. Anxiolytic effects of benzalphantholides. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, p. 3483-3486, 2005.

ZHANG, Q. B.; NAKASHABENDI, I. M.; MOKHASHI, M. S.; DAWODU, J. B.; GEMMELL, C. G.; RUSSELL, R. I. Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis. **Gut**, p. 841-45, 1996.

ZHENG, P. Y.; JONES, N. L. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. **Cell Microbiol**, p. 25-40, 2003.

ZHENG, P.Y.; HUA, J.; YEOH, K.G.;HO, B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not cagA, iceA, and vacA in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. **Gut**, v. 47, p. 18-22, 2000.