

Mónica Daniela Marques Ferreira

Probióticos e Extratos de Plantas Medicinais na infecção por
Helicobacter pylori

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Cristina Luxo
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Doutora Cristina Luxo, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela ajuda constante durante todo o percurso, pela disponibilidade, por todo o apoio e confiança.

À Doutora Olga, pelas sugestões para a realização deste trabalho, pela disponibilidade e pela ajuda em grande parte dos passos realizados durante todo o percurso.

A toda a gente do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, em especial à Sandra, ao Doutor Nuno, às minhas colegas de Mestrado Soraia e Marisa, pelo apoio em tudo o que precisei.

Aos meus amigos, em especial à Cláudia, à Tânia que sempre me incentivaram, ouviram e ajudaram quando precisei, e à Cátia, à Dânia, à Joana, à Letícia e à Laetitia que apesar da distância sempre me apoiaram.

Ao Pedro, pela paciência, pelos conselhos, pelo apoio incondicional durante todo o percurso, pelo carinho, pela força e principalmente por toda a compreensão.

À minha família, em especial aos meus pais e irmão, que sempre me apoiaram em tudo, sempre me incentivaram, estiveram sempre do meu lado tanto nos bons como nos maus momentos. Obrigado por todos os sacrifícios que fizeram por mim, pela compreensão, pela amizade, carinho, dedicação e por me terem proporcionado chegar até aqui. Sem vocês nada disto teria sido possível.

RESUMO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram negativa e microaerofílica, que coloniza o epitélio gástrico humano. Estima-se que cerca de metade da população mundial se encontre infectada. As principais vias de transmissão são oral-oral e fecal-oral, e a sua prevalência aumenta com a idade e é maior nos países em desenvolvimento. A infecção por *H. pylori* pode progredir para vários estados patológicos, incluindo gastrite, úlcera péptica, e cancro gástrico. De acordo com o Relatório de Consenso de Maastricht III, a terapia convencional de erradicação de *H. pylori*, consiste numa terapia tripla que inclui a combinação de dois antibióticos e um inibidor da bomba de prótons (PPI) ou sais de bismuto. Nos últimos anos tem-se assistido a um preocupante aumento da resistência deste microrganismo aos regimes terapêuticos, para além de que os antibióticos têm custos elevados e efeitos secundários indesejáveis. A tentativa de manter a eficácia dos regimes anti-*H. pylori*, e o objetivo de minimizar os seus efeitos secundários, conduziu à pesquisa de terapêuticas adjuvantes, nomeadamente o uso de probióticos e de plantas medicinais. Os probióticos são suplementos alimentares, constituídos por bactérias vivas, que podem produzir efeitos benéficos à saúde humana, podendo melhorar os sintomas da infecção por *H. pylori*, através de vários mecanismos. As plantas medicinais são utilizadas há muito tempo no tratamento de diversas doenças e uma grande variedade de extratos de plantas medicinais têm sido testados para avaliar o seu potencial efeito anti-*H. pylori*. O objetivo deste trabalho de investigação foi avaliar o efeito de probióticos e de extratos de plantas medicinais no crescimento de isolados clínicos de *H. pylori*. Foram utilizados neste estudo 21 isolados clínicos de *H. pylori*. As estirpes de probióticos testadas foram o *Lactobacillus rhamnosus* e o *Bifidobacterium breve*. Avaliou-se o efeito de culturas puras de probióticos e de extratos brutos preparados a partir dessas culturas, no crescimento de 18 isolados *H. pylori*. O efeito dos extratos de plantas medicinais, *Fragaria vesca* e *Agrimonia eupatoria* L., no crescimento de *Helicobacter pylori* foi estudado em 12 isolados de *H. pylori* diferentes. Verificou-se que ambos os extratos possuem atividade anti-*H. pylori*, avaliada através do método de difusão em disco e por ensaio de microdiluição, determinando as CMI_s. O extrato Fv possui maior efeito inibitório sobre o *H. pylori* que o extrato AgC. Não se detectou atividade anti-*H. pylori* para os probióticos estudados.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *Agrimonia eupatoria* L., *Fragaria vesca*.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram negative and microaerophilic bacteria which colonizes the human gastric epithelium. It is estimated that about half the world's population is infected. The main pathways of transmission are oral-oral and fecal-oral and its prevalence increases with age and is higher in developing countries. Infection by *H. pylori* can progress to various pathological conditions, including gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. According to the Report of the Maastricht III Consensus, conventional therapy for the eradication of *H. pylori* is a triple therapy which includes a combination of two antibiotics and proton pump inhibitor (PPI) or bismuth salts. In recent years there has been a worrying increase in the resistance of this microorganism to therapeutic regimens. Moreover, these antibiotics are costly and have undesirable side effects. The attempts to both maintain the effectiveness of anti-*H. pylori* schemes and minimize their side effects led to the search for adjuvant therapies including the use of probiotics and medicinal plants. On the one hand, probiotics are food supplements consisting of live bacteria which can produce beneficial effects on human health, improving the symptoms of infection by *H. pylori* through various mechanisms. On the other hand, medicinal plants have been widely used in the treatment of various diseases and a variety of extracts of medicinal plants have been tested for their potential anti-*H. pylori*'s effect. The objective of this research was to evaluate the effect of probiotics and medicinal plants extracts on the growth of clinical isolates of *H. pylori*. This study used 21 clinical isolates of *H. pylori*. The probiotic strains which were tested were *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium breve*. The effect of pure cultures of probiotic and crude extracts prepared from these cultures was evaluated in the growth of *H. pylori*. The effect of extracts of *Fragaria vesca* and *Agrimonia eupatoria* L., in the growth of *Helicobacter pylori* was studied in 12 different isolates of *H. pylori*. It was found that both extracts have anti-*H. pylori* activity, evaluated by the disk diffusion method and microdilution assay, determining the MICs. The extract Fv has a greater inhibitory effect on *H. pylori* than the extract AgC. No anti-*H. pylori* activity was detected to studied probiotics.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *Agrimonia eupatoria* L., *Fragaria vesca*.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
INTRODUÇÃO	
<i>Helicobacter pylori</i>	1
1. História da descoberta do <i>Helicobacter pylori</i>	1
2. Microbiologia	2
2.1. Características gerais	2
2.2. Morfologia	2
2.3. Metabolismo	3
3. Factores de patogenicidade	4
3.1. Genes associados à virulência	4
3.1.1. Gene <i>CagA</i>	4
3.1.2. Gene <i>VacA</i>	5
3.1.3. Gene <i>BabA</i>	7
3.2. Adaptação ao pH/Resistência à acidez	7
3.3. Motilidade	8
3.4. Aderência	8
3.5. Factores de persistência	9
3.6. Adaptação ao <i>stress</i> oxidativo	9
4. Epidemiologia	10
4.1. Prevalência	10
4.2. Transmissão	10
5. Aspectos clínicos da doença por <i>Helicobacter pylori</i>	11
5.1. Gastrite Aguda	11
5.2. Gastrite crónica	12
5.3. Úlcera	12
5.4. Cancro	13

6. Resposta imune do hospedeiro	15
7. Terapia convencional	15
Probióticos	16
1. Conceito	16
2. História	17
3. Classificação e tipos	17
3.1. Género <i>Bifidobacterium</i>	18
3.2. Género <i>Lactobacillus</i>	18
4. Mecanismos de acção dos probióticos	19
4.1. Actividade antimicrobiana.....	20
4.2. Melhoria da função de barreira.....	20
4.3. Imunomodulação.....	21
5. Função/ Benefícios para a saúde	22
6. Critérios de escolha	23
7. Probióticos e <i>Helicobacter pylori</i>	23
7.1. Mecanismos de acção (não imunológicos e imunológicos).....	23
7.1.1. Mecanismos não imunológicos.....	24
7.1.1.1. Substâncias antimicrobianas.....	24
7.1.1.2. Competição pela adesão.....	24
7.1.1.3. Barreira mucosa.....	25
7.1.2. Mecanismos imunológicos.....	25
8. Eficácia dos probióticos na terapia de erradicação do <i>Helicobacter pylori</i> por antibióticos (terapia tripla)	25
Fitoterapia	26
1. Actividade anti-<i>Helicobacter pylori</i> de extratos de plantas medicinais	27
Objetivos	29
MATERIAIS E MÉTODOS	
Estirpes bacterianas	30
1. <i>Helicobacter pylori</i>	30
1.1. Crescimento dos isolados clínicos de <i>H. pylori</i>	30

2. Estirpes de probióticos	31
2.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC® 9595™	31
2.2. <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC® 15700™	31
Efeito de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Bifidobacterium breve</i> no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>.....	32
1. Teste de inibição do crescimento em meio sólido	32
1.1. Atividade de culturas puras de probióticos.....	32
1.2. Atividade de extratos brutos preparados a partir culturas puras de probióticos.....	33
Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	34
1. Detecção de Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Disco	35
2. Determinação da concentração mínima inibitória.....	Error! Bookmark not defined.
2.1. Crescimento em caldo cérebro-coração	36
2.2. Ensaio de microdiluição	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Efeito de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Bifidobacterium breve</i> no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>.....	39
1. Teste de inibição do crescimento em meio sólido	39
1.1. Atividade de culturas puras de probióticos.....	39
1.2. Atividade de extratos brutos preparados a partir culturas puras de probióticos.....	40
Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	41
1. Detecção de Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Disco	42
2. Determinação da concentração mínima inibitória.....	51
CONCLUSÃO	54
BIBLIOGRAFIA	55
ANEXOS	62

ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AgC - *Agrimonia eupatoria* L.

ATP - Adenosina Trifosfato

BabA - *Blood group antigen adhesion*

CagA - *Citotoxin Antigen Associated*

CD4 - *cluster of differentiation 4*

CD8 - *cluster of differentiation 4*

cm - centímetro

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CO₂ - Dióxido de carbono

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (*Dexocirribonucleic acid*)

Fv - *Fragaria vesca*

h - horas

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance liquid chromatography*)

IARC - *International Agency of Research on Cancer*

Ig A - Imunoglobulina A

Ig G - Imunoglobulina G

Ig M - Imunoglobulina M

IL- 1, 2, 6, 8 - interleucina 1, 2, 6, 8

INF - interferão

ISO - *International Organization for Standardization*

Kb - *kilobyte*

kDa - *kilodalton*

LPS - Lipopolissacarídeos

MALT - Tecido Linfóide Associado do Intestino (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*)

mg - miligrama

MH - *Mueller-Hinton*

MHz - *Mega hertz*

min. - minuto

ml - mililitro

mm - milímetros

MRS - *Man-Rogosa-Sharpe*

NAP - *Nucleosome assembly protein*

NK - *Natural Killer*

nm - nanómetros

O₂ - oxigénio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato salino

PDA - *Photo Diode Array*

pH - potencial hidrogeniônico

PPI - inibidor da bomba de prótons

RCM - *Reinforced Clostridium Medium*

REF - referência

SCFA - ácidos gordos de cadeia curta

Th - *T helper*

TNF α - *tumor necrosis factor* α

UFCs - unidade formadora de colónias

VacA - citocina vacuolar

μ l - microlitro

μ m - micrómetro

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Correlação entre genótipos de *H. pylori* e citotoxicidade (Adaptado de Ferreira, 2006).

Tabela 2: Mecanismos de ação dos probióticos (Adaptado de Ng et al., 2009).

Tabela 3: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 12.

Tabela 4: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 17.

Tabela 5: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 24.

Tabela 6: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 25.

Tabela 7: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 26.

Tabela 8: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 27.

Tabela 9: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 35.

Tabela 10: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 37.

Tabela 11: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 56.

Tabela 12: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 75.

Tabela 13: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 128.

Tabela 14: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 160.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do contacto íntimo da mucosa gástrica com o *H. pylori cagA+* (Adaptado de Ferreira, 2006).

Figura 2: Mosaico do gene *vacA* (Adaptado de Ferreira, 2006).

Figura 3: Prevalência mundial da infecção pelo *Helicobacter pylori* (Adaptado de Souza, 2008).

Figura 4: Representação esquemática dos fatores que contribuem para a patologia gástrica e o resultado da doença na infecção por *H. pylori* (Adaptado de Kusters et al., 2006).

Figura 5: Inibição de bactérias entéricas e melhoria da função da barreira por bactérias probióticas (Adaptado de Ng et al., 2009).

Figura 6A: *Fragaria vesca* (Fv).

Figura 6B: *Agrimonia eupatoria* L. (AgC).

Figura 7: Cultura de um isolado de *H. pylori* para deteção de atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais pelo método de difusão em disco.

Figura 8: Cultura de um isolado de *H. pylori* para deteção de atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais e do seu solvente pelo método de difusão em disco.

Figura 9: Esquema do ensaio de microdiluição para a determinação da CMI.

Figura 10: Efeito de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Bifidobacterium breve* no crescimento de um isolado clínico de *H. pylori*. As culturas puras de probióticos foram colocadas em discos de papel de filtro (A) e em poços (B).

Figura 11: Efeito de extratos brutos obtidos a partir de culturas puras de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve* no crescimento de isolados clínicos de *H. pylori*.

Figura 12: Efeito do extrato Fv no crescimento de um isolado de *H. pylori*.

Figura 13: Efeito do extracto AgC e do seu solvente no crescimento de um isolado de *H. pylori*.

Figura 14: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 12, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 15: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 17, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 16: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 24, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 17: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 25, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 18: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 26, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 19: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 27, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 20: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 35, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 21: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 37, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 22: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 56, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 23: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 75, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 24: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 128, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 25: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 160, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Figura 26: Determinação das CMI's dos extratos AgC e FV nos isolados, 17, 37, 128, 141, 160 de *H. pylori*.

Figura 27: Efeito de extrato de planta AgC no crescimento em meio líquido dos isolados 17, 37, 128, 141 e 160 de *H. pylori*.

Figura 28: Efeito de extrato de planta Fv no crescimento em meio líquido dos isolados 17, 37, 128, 141 e 160 de *H. pylori*.

Figura 29: Aspecto das colónias de *H. pylori* em gelose Columbia após incubação em microaerofilia, a 37°C e durante 72 horas.

INTRODUÇÃO

HELICOBACTER PYLORI

I. História da descoberta do *Helicobacter pylori*

No final do século 19 e início do século 20, vários investigadores observaram a presença de microrganismos em espiral no estômago de animais. Posteriormente, foram observados em humanos bactérias em espiral semelhantes. Alguns dos indivíduos que apresentavam esta bactéria tiveram úlcera péptica ou cancro gástrico. Esta associação foi depois descartada devido à elevada prevalência destas bactérias nos estômagos de pessoas sem quaisquer sinais clínicos (Kusters et al., 2006).

Até ao início dos anos 80, estas bactérias observadas no estômago de humanos, foram consideradas como sendo sobrecrescimento bacteriano ou contaminantes alimentares. Em 1983, Warren e Marshall descobriram o *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Al-Sulami et al., 2008; Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006; Piccolomini et al., 1997). O organismo foi inicialmente designado por "organismo-como *Campylobacter*", "organismo gástrico-como *Campylobacter*", "*Campylobacter pyloridis*," e mais tarde por "*Campylobacter pylori*", pois é uma bactéria gram negativa que cresce em condições de microaerofilia. Mais tarde verificou-se que este organismo é diferente dos membros do género *Campylobacter*, tendo sido denominado *Helicobacter pylori* (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006).

A relação de causa-efeito entre a presença de *Helicobacter pylori* e gastrite ou úlcera gastroduodenal foi demonstrada em 1985, quando Barry Marshall ingere um inóculo bacteriano de *Helicobacter pylori* e contrai infecção experimental (Ferreira, 2006). Desta forma foi demonstrado que esta bactéria provoca gastrite crónica activa, que pode evoluir para outras patologias, em particular, a doença da úlcera péptica, adenocarcinomas gástricos distais, e linfomas gástricos (Kusters et al., 2006).

Em 1994, a IARC (*International Agency of Research on Cancer*), dependente da OMS (Organização de Saúde), inclui *Helicobacter pylori* como agente carcinogénico do grupo I.

A 3 de Outubro de 2005, Marshall e Warren, receberam o prémio nobel da Fisiologia e Medicina, pela descoberta da *Helicobacter pylori* e sua relação com a gastrite e úlcera péptica (Ferreira, 2006).

2. Microbiologia

2.1. Características gerais

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que pertence à subdivisão ϵ do *Proteobacteria*, ordem *Campylobacterales*, família *Helicobacteraceae* e pertence à linhagem dos *Helicobacters* gástricos (Kusters et al., 2006). É uma bactéria Gram-negativa (Ferreira et al., 2006; Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Mishra, 2012; Siqueira et al., 2006; Thompson e Blaser, 1995; Wnuk et al., 2010) que coloniza exclusivamente o epitélio gástrico humano, localizando-se normalmente no fundo e no corpo, mas é especialmente no antro onde as bactérias são encontradas com maior densidade. O *H. pylori* pode distribuir-se de maneira focal, segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica, localizando-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio da superfície, em contato com a membrana luminal das células epiteliais que revestem a mucosa gástrica (Ferreira, 2006; Ladeira et al., 2003).

Apresenta crescimento em condições de microaerofilia (Ferreira et al., 2006; Kusters et al., 2006; Siqueira et al., 2006; Thompson e Blaser, 1995) formando colônias não pigmentadas, translúcidas e com 1-2 nm de diâmetro. A sua temperatura ótima de crescimento *in-vitro* é de 37°C. É uma bactéria urease, catalase e oxidase positiva (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006; Thompson e Blaser, 1995).

2.2. Morfologia

H. pylori é uma bactéria gram-negativa, que apresenta uma forma helicoidal, curva ou recta com os extremos arredondados. O seu tamanho varia entre 0,5-1,0 μm de largura por 2-4 μm de comprimento, possuindo 2-6 flagelos unipolares que atravessam a parede celular, e estão ligados à membrana basal. Têm aproximadamente 3 μm de comprimento e conferem mobilidade, permitindo o movimento rápido em soluções viscosas, como o muco que recobre as células epiteliais gástricas. Na extremidade, os flagelos apresentam uma forma de bulbo e são constituídos por uma unidade central envolvida por uma bicamada fosfolipídica que os protege da acidez gástrica. (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003). Em condições de *stress* químico ou físico, como uma cultura *in vitro* prolongada ou tratamento com antibióticos, a *Helicobacter pylori* pode apresentar uma forma cocóide com tamanho variável entre 0,8-1,0 μm . Estas formas também possuem flagelos unipolares, e apesar de não serem cultiváveis, mantêm aparentemente a capacidade de sintetizar DNA (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006).

2.3. Metabolismo

O *Helicobacter pylori* apresenta um hospedeiro restrito e uma série de órgãos alvo. A infecção ocorre geralmente ao longo da vida. Isto sugere uma forte adaptação ao seu habitat natural, a camada de muco que cobre as células epiteliais gástricas. Como consequência, o *H. pylori* não tem várias vias de biossíntese que são frequentemente encontradas em bactérias menos especializadas, como muitas bactérias entéricas (Kusters et al., 2006).

O azoto, tal como o carbono é um dos compostos essenciais para o crescimento de microrganismos. O *H. pylori* consegue utilizar vários compostos como fontes de azoto, como a ureia, amoníaco ou alguns aminoácidos. Os aminoácidos são então potenciais fontes de carbono, azoto e energia. O desenvolvimento de um meio definido para a cultura de *H. pylori* e a subsequente determinação do aminoácido que a bactéria necessita para o seu crescimento, foram passos importantes na compreensão do seu metabolismo (Marais et al., 1999).

A produção de aminoácidos por *H. pylori* é limitada, sendo necessário fornecer alguns aminoácidos ao meio para o seu crescimento. Através da utilização de vias anabólicas e catabólicas, os aminoácidos podem ser utilizados para a produção de enzimas e outras proteínas, ou como fontes de carbono e azoto. (Ferreira, 2006).

A ureia é, como referido acima, uma importante fonte de azoto no ambiente gástrico. O amoníaco é um componente chave no metabolismo do azoto, assim como na resistência a ácidos, assim o *H. pylori* pode utilizar diversas fontes alternativas de amoníaco. A principal via de produção de amónia envolve a ativação da enzima urease, que funciona no metabolismo do azoto, ou seja, o amoníaco é produzido pela bactéria através da enzima urease que permite a libertação do azoto presente na ureia na forma de iões amónio. O *H. pylori* utiliza também a urease na resistência aos ácidos e como fator de virulência, produzindo grandes quantidades de urease, estimando-se que 10% do teor total de proteína desta bactéria, consiste em urease (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006).

H. pylori é uma bactéria microaerofilia que não tolera concentrações elevadas de oxigénio, mas exige pelo menos 2% de O₂, uma vez que o *H. pylori* usa o oxigénio como um aceitador final de electrões (Kusters et al., 2006).

H. pylori pode metabolizar a glicose seguindo as vias oxidativa e fermentativa, apesar de ser uma bactéria microaerofílica obrigatória. A glicose é, aparentemente, o único hidrato de carbono utilizado por *H. pylori*. A glicose entra na célula através de uma permease

específica para a glicose e galactose, que é dependente de sódio e não é afetada por inibidores (Ferreira, 2006; Marais et al., 1999).

Os lípidos podem ser utilizados como uma fonte de carbono e energia, e os fosfolípidos são uma potencial fonte de fosfato. Em termos de composição em ácidos gordos, uma das características únicas desta bactéria é a síntese, de novo, de 3 colesteril glucosídeos, que representam cerca de 25% dos lípidos totais. Estas moléculas são raras em bactérias e animais superiores, são sintetizadas por fungos e plantas. Os colesteril glucosídeos sintetizados por *H. pylori* possuem uma ligação glicosídica que não foi ainda descrita noutros procariotas nem eucariotas (Ferreira, 2006; Marais et al., 1999).

3. Factores de patogenicidade

3.1. Genes associados à virulência

Os isolados de *H. pylori*, apresentam níveis de variação consideravelmente elevados, devendo-se esta diversidade genómica principalmente a eventos de recombinação entre estirpes que se encontram no mesmo hospedeiro, e devido à competência natural desta bactéria, aumentando a probabilidade de recombinações homólogas. As variações genómicas também podem resultar da ocorrência de mutações pontuais num gene, o que é bastante frequente em *H. pylori*, e da organização de genes em mosaico. As variações genómicas das estirpes podem resultar na expressão de diferentes fatores de virulência, capazes de reduzir diversos tipos de lesão no hospedeiro.

3.1.1. Gene *CagA*

O primeiro gene específico identificado em *H. pylori* foi o *cagA* (*Citotoxin Antigen Associated*), que está fortemente associado ao desenvolvimento de cancro gástrico. As estirpes *cagA*⁺ tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais elevados de expressão de citocinas, tais como IL-1b e IL-8, induzindo a ativação de atividade inflamatória (Ferreira, 2006; Godoy et al., 2007; Ladeira et al., 2003; Marais et al., 1999). Estudos realizados mostraram que estirpes de *H. pylori* que expressam o gene *cagA* são, geralmente, isolados de doentes com doenças gastrointestinais. Os doentes infectados com este tipo de estirpes, têm uma probabilidade três vezes maior de desenvolver cancro gástrico do que os doentes infectados por estirpes *cagA*⁻ (Álvares et al., 2006; Baryshnikova, 2012; Ferreira, 2006; Godoy et al., 2007; Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Mishra, 2012; Thomazini et al., 2006).

O gene *cagA* é considerado marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), que possui de 35 a 40Kb, comporta 31 genes e é encontrada em cerca de 60% das estirpes ocidentais. A ilha *cag*-PAI é um componente do genoma do *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV. Este sistema atua como agulha e serve para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Marais et al., 1999).

O stress oxidativo desempenha um papel importante nas alterações gástricas mediadas pela patogénese do *H. pylori*. A infecção com estirpes de *H. pylori cagA*⁺ induz uma maior lesão oxidativa do ADN das células do hospedeiro relativamente à infecção com estirpes de *H. pylori cagA*⁻ (Wnuk et al., 2010).

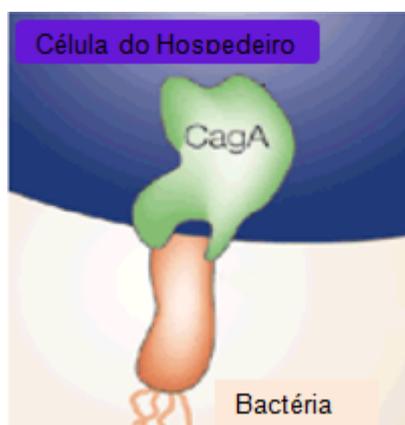


Figura 1: Esquema do contacto íntimo da mucosa gástrica com o *H. pylori cagA*⁺ (Adaptado de Ferreira, 2006).

3.1.2. Gene *VacA*

A colonização da mucosa gástrica por *H. pylori* requer um complexo processo adaptativo. O fator-chave, que permite à bactéria sobreviver à acidez gástrica e atravessar o lúmen do estômago, é a enzima urease, que converte a ureia em amônia e bicarbonato. Para isso é necessária a produção da citotoxina *vacA*, que induz a formação de canais seletivos de aniões nas células epiteliais, levando à exsudação de ureia para o lúmen da mucosa gástrica. O *vacA* é considerado um importante fator de virulência, visto que contribui para a produção de alcalóides pela urease, que podem induzir danos no ADN.

Aproximadamente 50% das estirpes de *H. pylori* secretam *vacA*, uma proteína altamente imunogénica com 95 kDa, que induz a vacuolização massiva em células epiteliais, in-vitro (Kusters et al., 2006).

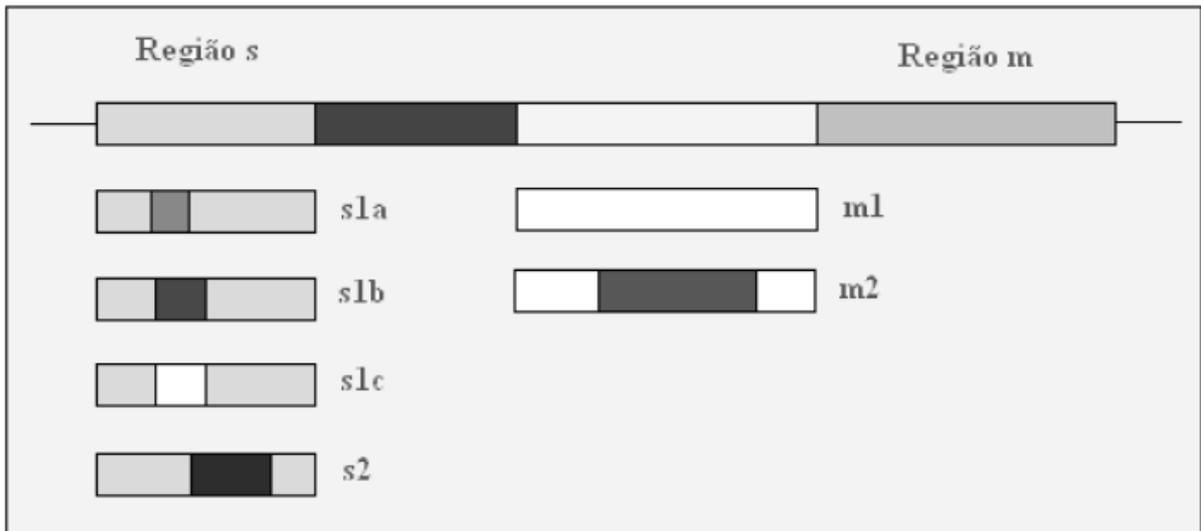


Figura 2: Mosaico do gene *vacA* (Adaptado de Ferreira, 2006).

O gene *vacA* compreende duas partes variáveis, s e m. A região s (codifica o sinal peptídico) está localizada no final da cadeia 5' e possui dois alelos, s1 ou s2, sendo que para o alelo s1 existem 3 subtipos: s1a, s1b e s1c; a região média (m) possui os alelos m1 ou m2. A combinação em mosaico dos alelos da região s com os alelos da região m determina a produção de citotoxinas, responsáveis pelo grau de virulência da bactéria. As estirpes portadoras do genótipo *vacA* s1/m1 produzem grande quantidade de toxina, enquanto as estirpes s1/m2 produzem quantidade moderada, e as estirpes s2/m2, pouca ou nenhuma toxina. As estirpes *vacA* do tipo s1a parecem ser mais patogênicas que as s1b e s1c ou s2, sendo mais relacionadas à úlcera péptica. As estirpes do tipo m1 estão associadas a maior risco de lesão das células epiteliais do que as do tipo m2 (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003).

Alelos	Genótipos	Citotoxicidade
s1a		
s1b	s1/m1	Elevada
s1c	s1/m2	Baixa / Moderada
s2	s2/m1	-
m1	s2/m2	Ausente
m2		

Tabela 1: Correlação entre genótipos de *H. pylori* e citotoxicidade (Adaptado de Ferreira, 2006).

De acordo com Thomazini et al., 2006, as estirpes *vacA* sI/mI são as mais tóxicas, encontrando-se na maioria dos doentes com cancro gástrico, pois a combinação alélica sI e mI foi identificada em 24 doentes (57,1%) com cancro gástrico. Assim, este estudo comprova que a presença de estirpes *cagA* + sI/mI pode estar relacionada com uma maior agressão e inflamação da mucosa, contribuindo para a gênese do cancro do estômago.

Para além da formação de vacúolos nas células epiteliais, a citoxina vacuolizante *vacA*, produz efeitos prejudiciais diretos nas células como, a alteração do citoesqueleto, a eliminação da proliferação celular, a ativação e proliferação dos linfócitos T, e a modulação da citocina responsável pela modulação das células T, sendo assim uma potente toxina imunodepressora e tendo como alvo o sistema imune adaptativo (Godoy et al., 2007).

3.1.3. Gene *BabA*

A proteína *babA* de 78 kDa representa, provavelmente, a proteína de adesão mais bem caracterizada de *H. pylori*, e é codificada pelo gene *babA* (*blood group antigen adhesin*), descoberto recentemente. Fatores de adesão da bactéria ao epitélio gástrico favorecem a colonização e contribuem para sua patogenicidade. *BabA* medeia a ligação dos antigénios fucosilados do grupo sanguíneo Lewis b nas células do hospedeiro, permite o contacto entre a bactéria e o epitélio e facilita a libertação de fatores de virulência como *cagA* e o *vacA*. O gene *babA* possui dois alelos distintos: *babA1* e *babA2*. *BabA* tem um papel importante na virulência de *H. pylori*, uma vez que o alelo *babA2* está fortemente associado com a úlcera péptica e com o adenocarcinoma gástrico. A presença do alelo *babA* está claramente relacionada com os alelos *vacA* sI e *cagA*, não podendo representar um marcador da doença independente (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003).

3.2. Adaptação ao pH/Resistência à acidez

Uma das características marcantes do *H. pylori* é a sua capacidade para colonizar o ambiente ácido gástrico, embora não seja uma bactéria acidúrica pois o seu metabolismo diminui em ambientes com pH baixo, mas sim uma bactéria neutrófila. O pH da mucosa gástrica varia entre 4 e 6.5, mas, ocasionalmente podem ocorrer choques ácidos. O *H. pylori* requer assim mecanismos para se proteger de choques ácidos agudos e crescer a valores de pH de cerca de 5.5 (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006).

A urease, uma proteína de elevado peso molecular (500 a 600 KDa) (Ladeira et al., 2003), é produzida em níveis muito elevados, sendo a base da sobrevivência desta bactéria

em pH ácido (Ferreira, 2006). A urease decompõe a ureia, dando origem a amoníaco e CO₂, permitindo ao *H. pylori* criar um microambiente neutro à sua volta no habitat ácido do estômago. A urease encontra-se não só no citoplasma, mas também à superfície da bactéria (Ferreira, 2006; Ladeira et al., 2003; Kusters et al., 2006; Mégraud e Lehours, 2007; Siqueira et al., 2007). A entrada da ureia na bactéria, é controlada por uma proteína de membrana sensível ao pH que é codificada por um gene conhecido como ureI (Ladeira et al., 2003). Para além da urease, existem outros mecanismos desenvolvidos pelo *H. pylori* para a adaptação ao pH baixo. Pode utilizar as ATPases de membrana para ajustar as diferenças de potencial entre o interior e o exterior da célula, ou pode também criar um potencial de membrana positivo no interior da célula através de transportadores aniônicos de membrana. As aminas, que são um produto de descarboxilação dos aminoácidos, podem ter um papel importante na regulação do pH (Ferreira, 2006).

3.3. Motilidade

A bactéria, na fase precoce de colonização, necessita de atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico. Esta camada é formada por um gel viscoelástico que confere proteção química e mecânica ao revestimento epitelial, inclusive contra bactérias. No entanto lipases e proteases sintetizadas por *H. pylori* degradam a camada de muco, facilitando a progressão da bactéria. Além disso, o *H. pylori* move-se facilmente devido à morfologia em espiral e aos flagelos e, assim, atravessa a camada de muco, estabelecendo um contato íntimo com as células epiteliais de revestimento (Ladeira et al., 2003). Os flagelos possuem uma bainha característica que envolve o centro do flagelo e o protege da acidez gástrica. A regulação da síntese dos flagelos é um processo complexo que envolve a ação de 40 genes. Para além destes, existem outros meios para se movimentar através da mucosa gástrica, como o movimento de quimiotaxia mediado pela concentração no meio de alguns aminoácidos e de ureia (Ferreira, 2006).

3.4. Aderência

A aderência de *H. pylori* às células epiteliais gástricas, é um fator considerado necessário à colonização da mucosa gástrica. Diversos tipos de adesinas de *H. pylori* permitem a sua interação com as células epiteliais gástricas, nomeadamente através da ligação ao ácido siálico existente nas cadeias açucaradas dos glicolípidos de membrana, a receptores sulfatados, a antigénios fucosilados dos grupos sanguíneos e à fosfatidiletanolamina. A adesão é fundamental para a patogénese da bactéria, através da lesão

direta da célula, facilitando a libertação dos produtos tóxicos produzidos pela bactéria nas proximidades da célula epitelial e atuando na estimulação da produção de citocinas pela célula epitelial (Ferreira, 2006; Siqueira et al., 2007).

3.5. Factores de persistência

A infecção por *Helicobacter pylori*, uma vez estabelecida no estômago persiste, normalmente, durante toda a vida do hospedeiro. A resposta imunitária dirigida contra a bactéria é ineficaz na sua eliminação da mucosa gástrica, sendo a persistência da infecção e a cronicidade da reação inflamatória e imunitária, a explicação da virulência deste microrganismo.

A enzima urease do *H. pylori*, contribui para a persistência na mucosa gástrica, pois uma vez que alcaliniza o meio, tem um efeito inibidor sobre as células fagocitárias. Para além da urease, outras enzimas conferem proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, como a catalase, superóxido dismutase e arginase. Por outro lado, o *H. pylori* também escapa à resposta imunitária do hospedeiro pela camuflagem dos antígenos. (Ferreira, 2006; Ladeira et al., 2003).

3.6. Adaptação ao stress oxidativo

A alteração histológica mais evidente na mucosa gástrica, induzida pela presença do *H. pylori*, é a resposta inflamatória, cuja atividade depende da capacidade de resposta do hospedeiro e da atividade bacteriana. Nos processos inflamatórios, diferentes fagócitos, tais como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, geram moléculas à base de oxigénio em resposta a mediadores pró-inflamatórios e produtos da parede celular bacteriana (Ladeira et al., 2003). O *H. pylori* tem capacidade de resistir às agressões oxidativas destes compostos, através das enzimas catalase, superóxido dismutase e a alquilhidroperóxido redutase. O anião superóxido, através da superóxido dismutase, é convertido em peróxido de hidrogénio, que é transformado em oxigénio e água pela catalase. A enzima alquilhidroperóxido redutase, catalisa a conversão do alquilhidroperóxido (Ferreira et al., 2006).

4. Epidemiologia

4.1. Prevalência

A gastrite induzida por *H. pylori* é uma das infecções mais comuns na espécie humana, afetando cerca de metade da população mundial (Gotteland et al., 2006; Kwon et al., 2000; Ladeira et al., 2003; Malfertheiner et al., 2012; Siqueira et al., 2007). No entanto, a colonização do estômago humano por *H. pylori* é assintomático em 70% da população (Vitor e Vale, 2011).

A infecção por *H. pylori* apresenta uma distribuição mundial, no entanto apresenta grandes variações geográficas. A prevalência da infecção pelo *H. pylori* é semelhante em homens e mulheres, mas varia com a idade, o nível socioeconômico e a raça. Estudos serológicos demonstraram que a prevalência de infecção por *H. pylori* aumenta com a idade e é maior nos países em desenvolvimento devido às más condições de higiene (Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Moraes e Silva, 2003; Siqueira et al., 2007). Em vários países em desenvolvimento, mais de 80% da população é *H. pylori* positivo, mesmo em idades mais jovens, aparecendo a infecção nos primeiros 5 anos de vida, o que indica que esta é adquirida na infância. A prevalência de *H. pylori* nos países industrializados em geral permanece abaixo dos 40%, e é consideravelmente mais baixa em crianças e adolescentes do que em adultos e idosos (Kusters et al., 2006; Gotteland et al., 2006; Moraes e Silva, 2003).

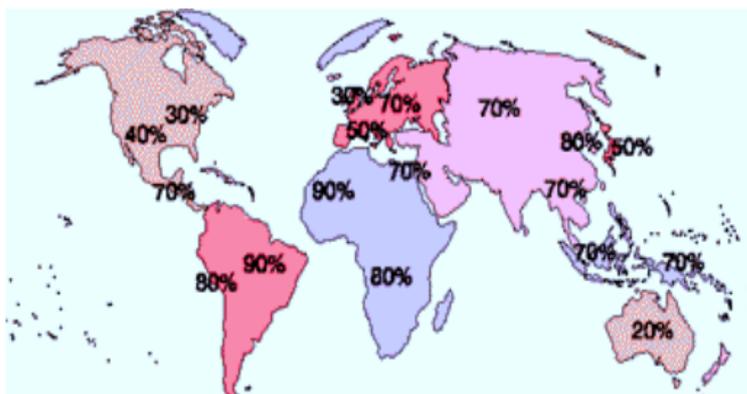


Figura 3: Prevalência mundial da infecção por *Helicobacter pylori* (Adaptado de Souza, 2008).

4.2. Transmissão

As principais formas de transmissão são as vias oral-oral e fecal-oral (Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Moraes e Silva, 2003; Siqueira et al., 2007).

O ser humano é o principal reservatório de *H. pylori*. A aquisição ocorre principalmente na infância, a partir da proximidade com membros da família, sendo a

aglomeração intrafamiliar um fator importante. Existe uma maior incidência de *H. pylori* em crianças filhas de pais infectados, do que em crianças cujos pais não eram portadores deste microrganismo (Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Lionetti et al., 2010; Moraes e Silva, 2003; Siqueira et al., 2007).

Vários estudos relataram a presença de DNA de *H. pylori* em fontes de água ambientais, mas isso provavelmente reflete contaminação com qualquer DNA nu ou de organismos de *H. pylori* mortos ou então contaminação com matéria fecal (Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003). A infecção pode também ser transmitida por endoscópios, se não for executada a desinfecção apropriada (Siqueira et al., 2007).

Outras possíveis fontes incluem alimentos contaminados, pois *H. pylori* pode sobreviver por pouco tempo sobre alimentos refrigerados. Isto, associado ao facto da extrema sensibilidade do *H. pylori* à pressão do oxigénio na atmosfera, à falta de nutrientes e a temperaturas fora da faixa de 34-40 °C, a transmissão direta pessoa-a-pessoa, continua a ser a via de transmissão mais provável (Kusters et al., 2006).

5. Aspectos clínicos da doença por *Helicobacter pylori*

H. pylori é um agente patogénico humano que coloniza a mucosa gástrica, resultando numa resposta inflamatória aguda, com dano das células epiteliais e progressão para vários estados patológicos, incluindo gastrite, úlcera péptica, e cancro gástrico (Kwon et al., 2000; Nilsson et al., 2000; Parsonnet et al., 1994; Schilling et al., 2002).

Embora a colonização gástrica por *H. pylori* induza uma gastrite histológica em todos os indivíduos infectados, apenas uma minoria irá desenvolver quaisquer sinais aparentes clínicos desta colonização. Estima-se que dos *H. pylori* positivos, 10 a 20% terão o risco de contrair a doença ulcerosa e 1 a 2% um risco de desenvolvimento de cancro gástrico distal. O risco de desenvolvimento destas patologias na presença da infecção por *H. pylori* depende de uma variedade de fatores tais como: características do hospedeiro, a presença da bactéria e fatores ambientais que se relacionam principalmente com o padrão e gravidade da gastrite (Kusters et al., 2006).

5.1. Gastrite Aguda

A colonização do tecido gástrico por *H. pylori* é quase sempre acompanhada por uma resposta inflamatória na mucosa subjacente. A fase aguda da infecção não é comumente detectada na prática clínica. Nessa fase, após a contaminação pela bactéria, há um período de

poucos dias, associados a um quadro histopatológico de denso infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares e um exsudato aderente à superfície epitelial gástrica, de curta duração. Esta fase está associada com sintomas dispépticos não específicos transitórios, tais como plenitude, náuseas, vômitos, e com inflamação considerável da mucosa do estômago proximal distal, ou pangastrite. Concomitantemente, ocorre uma hipocloridria com retorno da secreção ácida gástrica após alguns meses.

É pouco claro se a colonização inicial é resolvida espontaneamente e se a gastrite é resolvida, mas existem estudos com crianças que demonstram que a infecção desaparece espontaneamente em doentes nesta faixa etária, o que não tem sido observado em adultos (Kusters et al., 2006; Siqueira et al., 2007).

5.2. Gastrite crónica

O *H. pylori* é o principal causador da gastrite crónica, e a infecção desempenha um papel na patogénese da úlcera péptica e do cancro gástrico (Álvares et al., 2006; Parsonnet et al., 1991; Parsonnet et al., 1994).

O infiltrado inflamatório agudo dá lugar à gastrite crónica superficial activa, de leve a grave intensidade, com maior densidade de células inflamatórias no antro do que no corpo gástrico, e acompanhada de alterações epiteliais. Como a infecção habitualmente não é erradicada naturalmente pelo hospedeiro, a manutenção da inflamação durante anos pode levar à progressão da gastrite crónica superficial do antro às porções mais proximais do estômago (corpo e fundo), com consequentes gastrite atrófica e metaplasia intestinal, em alguns indivíduos. Quando a colonização se torna persistente, existe uma forte correlação entre o teor de ácido secretado e a distribuição de gastrite. As alterações histopatológicas da criança infectada são um pouco diversas das que ocorrem no adulto. O infiltrado inflamatório é geralmente mais leve e consiste, principalmente, em linfócitos, plasmócitos, e neutrófilos, podendo estar ausente nas crianças de países desenvolvidos. Nas crianças de países em desenvolvimento, o infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares é maior, mas de menor intensidade do que o dos adultos. A presença de atrofia glandular e metaplasia intestinal é rara em pediatria (Kusters et al., 2006; Siqueira et al., 2007).

5.3. Úlcera

Úlceras gástricas ou duodenais (normalmente referidas como úlceras pépticas) são definidas como alterações da mucosa, com um diâmetro de pelo menos 0,5 cm penetrando através da mucosa muscularis. As úlceras gástricas ocorrem principalmente ao longo da

curvatura menor do estômago, em particular na transição do corpus para a mucosa antral. As úlceras duodenais ocorrem geralmente no bulbo duodenal, que é a área mais exposta ao ácido gástrico. Ambas as úlceras, gástrica e duodenal, estão fortemente relacionadas com o *H. pylori*. Em relatos iniciais em todo o mundo, na primeira década após a descoberta do *H. pylori*, aproximadamente 95% das úlceras duodenais e 85% das úlceras gástricas ocorreram na presença de infecção por *H. pylori*. Vários estudos demonstraram que em *H. pylori* positivos, a presença de úlceras é 3 a 10 vezes maior que em *H. pylori* negativos (Kusters et al., 2006; Malfertheiner et al., 2012). A erradicação do *H. pylori*, muda completamente o curso natural da doença de úlcera e impede a sua recidiva.

O desenvolvimento de uma úlcera na presença de *H. pylori*, é influenciada por uma variedade de factores do hospedeiro e bacterianos. As úlceras ocorrem principalmente em locais onde a inflamação da mucosa é mais severa. Em indivíduos em que a produção de ácido é baixa, geralmente é na zona de transição gástrica entre o corpus e o antro, levando à doença da úlcera gástrica. Se a produção de ácido é normal a elevada, a inflamação mais severa encontra-se geralmente na zona distal do estômago e proximal do duodeno, dando origem à doença da úlcera duodenal (Kusters et al., 2006).

5.4. Cancro

O cancro do estômago é considerado o tipo de cancro mais frequente e a segunda causada de morte por cancro do mundo (Parsonnet et al., 1991; Siqueira et al., 2007; Thomazini et al., 2006).

O cancro gástrico resultada de um complexo processo, que evolui da mucosa normal, via gastrite crónica até gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia (Ladeira et al., 2003).

A inflamação crónica induzida por *H. pylori*, pode levar à perda da arquitetura da mucosa gástrica normal, com a destruição de glândulas gástricas e substituição por fibrose e epitélio do tipo intestinal. Este processo de gastrite atrófica e metaplasia intestinal ocorre em aproximadamente metade da população colonizada por *H. pylori*. O risco de desenvolvimento de gastrite atrófica depende da distribuição e do padrão de inflamação crónica ativa. Como tal, os indivíduos com diminuição da produção de ácido mostram uma progressão mais rápida para a atrofia. Áreas de perda de glândula e metaplasia intestinal estendem-se ao longo do tempo em vários focos, e embora os sintomas específicos não aumentem, aumenta o risco para o cancro gástrico de 5 a 90 vezes, dependendo da extensão e gravidade da atrofia. Vários estudos confirmaram que o *H. pylori* aumenta o risco de

desenvolvimento do cancro gástrico através da sequência que a atrofia e metaplasia originam. Nesses mesmos estudos foi demonstrado que em indivíduos *H. pylori* positivos, há maior probabilidade de desenvolver essas condições com mais frequência do que em indivíduos não infectados. Este facto é apoiado pela relação entre a prevalência do *H. pylori* e a incidência de cancro gástrico, comprovada por associações geográficas. Com base nestes resultados, estimou-se que a colonização do *H. pylori* aumenta o risco de cancro gástrico aproximadamente 10 vezes, sendo o *H. pylori* classificado como um carcinogéneo de classe I pela OMS (Kusters et al., 2006; Thomazini et al., 2006; Wnuk et al., 2010; Wong et al., 2004).

O risco de desenvolvimento de atrofia e cancro na presença de *H. pylori* é pequeno (<1%) e depende de alguns fatores bacterianos, verificando-se um aumento do risco em estirpes *cagA* positivas e em estirpes com uma maior predisposição genética para uma maior produção de IL-1 (interleucina 1) em resposta à colonização. O risco de vida por cancro gástrico em indivíduos positivos para *H. pylori* é estimado em aproximadamente 1 a 2% em países ocidentais (Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Thomazini et al., 2006).

Vários estudos conduzidos em parentes de primeiro grau de doentes com cancro gástrico têm destacado uma associação positiva entre a história familiar e risco para cancro gástrico. Indivíduos infectados por *H. pylori* e com história de cancro gástrico familiar podem apresentar um risco até 16 vezes maior de desenvolvimento de cancro gástrico do que indivíduos não-infectados e sem história familiar (Ladeira et al., 2003).

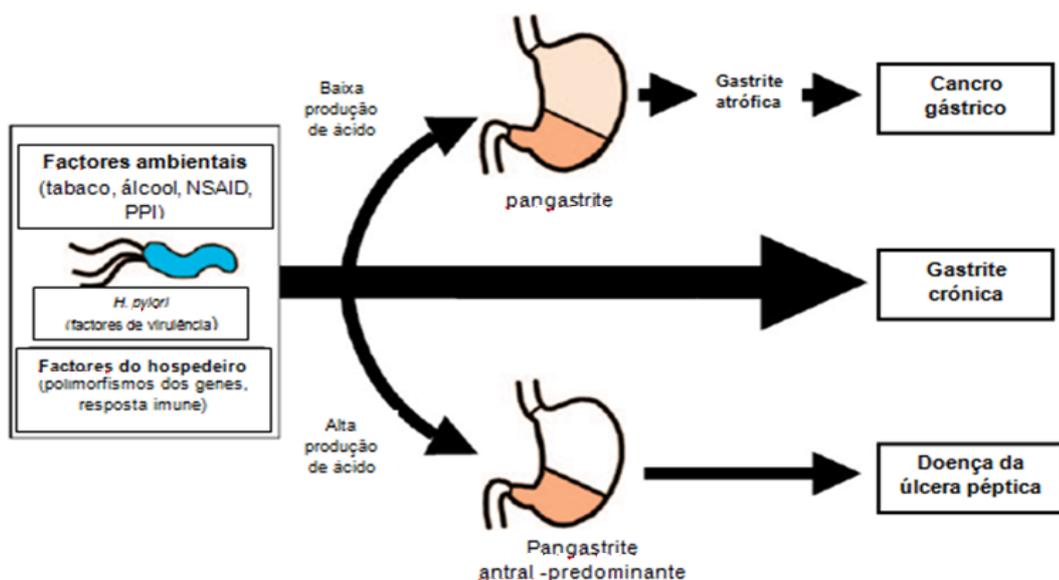


Figura 4: Representação esquemática dos fatores que contribuem para a patologia gástrica e o resultado da doença na infecção por *H. pylori* (Adaptado de Kusters et al., 2006).

6. Resposta imune do hospedeiro

Uma resposta imune adequada consiste em eliminar o agente agressor sem comprometer a integridade e a função do órgão envolvido.

A colonização da mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* é acompanhada por uma reação imunológica local e sistêmica, simultaneamente humoral e celular. A fase inicial, não específica, é caracterizada pelo recrutamento de fagócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, induzidos por fatores bacterianos libertados no meio, nomeadamente as proteínas NAP, urease e LPS (lipopolissacarídeos), e indirectamente através de produtos de activação do complemento, lípidos bioreactivos e citocinas, como a IL-8 (interleucina 8), IL-1 e IL-6 (interleucina 6). Os fagócitos recrutados migram para a superfície da mucosa gástrica, fagocitando as células bacterianas, libertando enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigénio, com efeitos citotóxicos. Além disso, ao atravessarem o epitélio gástrico, fragilizam as junções entre as células diminuindo a integridade da barreira gástrica. Após a resposta não específica, desenvolve-se a resposta imunitária específica. A resposta humoral compreende a produção de anticorpos anti-*H. pylori* do tipo IgG (imunoglobulina G), IgA (imunoglobulina A) e IgM (imunoglobulina M), que podem ser detectadas ao nível do estômago (resposta local), ao nível do sangue, saliva e urina (resposta sistêmica).

A resposta celular envolve os linfócitos Th (T *helper*) CD4 e os linfócitos Tc (T citotóxicos) CD8. A produção de IL-12 (interleucina 12) induzida pelos antígenos de *H. pylori*, estimula a diferenciação das células Th em células Th1, os linfócitos do tipo Th1 a produzir INF (interferão) gama, que induz a apoptose das células epiteliais, TNF α (*tumor necrosis factor* α), IL-2 (interleucina 2) e a ativar macrófagos, favorecendo a persistência e o aumento da inflamação. A estimulação de linfócitos do tipo Th2 desencadeia a produção de interleucinas 1, 6, 2 e 8 e de anticorpos, nomeadamente IgA, e tende a favorecer a regressão da reacção inflamatória. Apesar disto, a produção de células Th2 está praticamente ausente, havendo o predomínio de células Th1. Assim, vai haver uma resposta imune inadequada, que não consegue eliminar o microrganismo, e um comprometimento das células do hospedeiro (Ferreira, 2006; Kusters et al., 2006; Ladeira et al., 2003; Siqueira et al., 2007; Wilson e Crabtree, 2007).

7. Terapia convencional

De acordo com o Relatório de Consenso de *Maastricht III*, a terapia convencional de erradicação de *H. pylori*, consiste numa terapia tripla que inclui a combinação de 2

antibióticos e um inibidor da bomba de prótons (PPI) ou sais de bismuto (Baryshnikova, 2012; Gotteland et al., 2006; Malfertheiner et al., 2006; Matsushima e Takagi, 2012; Myllyluoma et al., 2005; O'Connor et al., 2011; Sheu et al., 2002; Souza, 2008; Tolone et al., 2012; Vítor e Vale, 2011; Wilhelm et al., 2011; Ya Ar et al., 2010; Yoon et al., 2010).

Os antibióticos mais utilizados na terapia convencional de acordo com a literatura, são a claritromicina, a amoxicilina, o metronidazol e a levofloxacina. O inibidor da bomba de prótons (PPI), aumenta o pH do estômago e cria condições para a ação dos antibióticos (Chen et al., 2012; O'Connor et al., 2011; Souza, 2008; Vítor e Vale, 2011, Yoon et al., 2010;).

A utilização da terapia tripla assegura boas taxas de erradicação de *H. pylori*, reduzindo o risco de desenvolvimento de cancro gástrico, mas ao longo dos anos, estas taxas têm vindo a diminuir devido à crescente resistência do *H. pylori* aos agentes antimicrobianos usados na terapia. Outros fatores contribuem para a diminuição da erradicação de *H. pylori* como os elevados custos e inacessibilidade a este tratamento por populações mais carentes como as dos países em desenvolvimento, assim como possíveis efeitos colaterais que ocorrem devido ao uso de vários medicamentos. A resistência aos antibióticos conduz a uma cura incompleta que juntamente com os efeitos colaterais causados levou à procura de terapêuticas adjuvantes. O tratamento com probióticos e com extratos de plantas (fitoterapia), são exemplos de possíveis adjuvantes terapêuticos, que poderão ser capazes de inibir o crescimento do *H. pylori*, não o erradicando por si só. Poderão também ser usados juntamente com os antibióticos para uma melhoria dos efeitos colaterais e diminuição da resistência (Baryshnikova, 2012; Castillo-Juárez et al., 2009; Funatogawa et al., 2004; Gotteland et al., 2006; Lebrós-Pantoflickova, et al., 2007; Martini et al., 2009; Medeiros et al., 2011; Myllyluoma et al., 2005; Nostro et al., 2005; Souza, 2008; Vítor e Vale, 2011; Wang e Huang, 2005; Wolvers et al., 2010; Ya Ar et al., 2010; Yoon et al., 2010; Zaidi et al., 2009).

PROBIÓTICOS

I. Conceito

A palavra probiótico, deriva do grego/latim “pro” e do grego “bios”, ou seja, para a vida (Badaró et al., 2008; Denipote et al., 2010; Granato et al., 2010; Iannitti e Palmieri, 2010; Raizel et al., 2011).

Os probióticos são suplementos alimentares, constituídos por bactérias vivas, que quando adicionados a alimentos em quantidades suficientes, produzem efeitos benéficos à saúde do consumidor, uma vez que aumentam as propriedades da microbiota nativa (Badaró et al., 2008; Britton e Versalovic, 2008; Costa e Varavallo, 2011; Denipote et al., 2010; Holanda et al., 2008; Iannitti e Palmieri, 2010; Raizel et al., 2011; Ritchie e Romanuk, 2012; Rosenstiel e Stange, 2010; Sanders et al., 2010; Santos, 2010; Varavallo et al., 2008; Walsh et al., 2008; Yoon e Sun, 2011). Estas bactérias têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do homem saudável e constituem apenas 1-13% da nossa microbiota (Denipote et al., 2010; Santos, 2010).

As células probióticas depois de ingeridas devem ser capazes de sobreviverem às condições do trato gastrointestinal, como suco gástrico, presença de sais biliares e enzimas digestivas e manter a sua viabilidade e a atividade metabólica no intestino para exercerem os efeitos benéficos nos hospedeiros (Badaró et al., 2008).

2. História

O termo probiótico foi primeiramente utilizado por *Lilly e Stillwell*, em 1965, para descrever uma substância microbiana que estimulava o crescimento de outros microrganismos (Granato et al., 2010; Iannitti e Palmieri, 2010; Raizel et al., 2011). *Parker*, em 1974, foi o primeiro autor a utilizar a palavra probiótico no contexto da suplementação animal, definindo-a como organismos e substâncias que contribuem para o balanço da flora intestinal (Granato et al., 2010). Em 1989, *Roy Fuller* enfatizou o requisito de viabilidade para os probióticos e introduziu a ideia de que têm um efeito benéfico para o hospedeiro, apresentando a primeira definição da palavra como sendo: “suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro pelo balanço do equilíbrio da microbiota intestinal” (Costa e Varavallo, 2011; Granato et al., 2010). Posteriormente, outras inúmeras definições foram propostas, mas hoje a definição recomendada, conjuntamente pela Organização Mundial de Saúde e a Organização de Agricultura e Alimentos é: “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro” (Iannitti e Palmieri, 2010; Vieira et al., 2007).

3. Classificação e tipos

Os probióticos mais utilizados e conhecidos são estirpes de bactérias *Lactobacillus* e

Bifidobacterium, *Lactobacillus*, são bactérias produtoras de ácido láctico, anaeróbias facultativas e gram positivas e normalmente são predominantes no intestino delgado. *Bifidobacterium*, são bactérias aeróbias estritas ou anaeróbias, gram positivas e presentes no cólon (Badaró et al., 2008; Costa e Varavallo, 2011; Denipote et al., 2010; Oliveira e Silva, 2011; Raizel et al., 2011; Sanders et al., 2010; Santos, 2010; Vieira et al., 2007). Mas também podemos incluir nas espécies de bactérias probióticas o *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces* e *Enterococcus faecium* (Badaró et al., 2008; Costa e Varavallo, 2011; Denipote et al., 2010; Sanders et al., 2010; Vieira et al., 2007).

3.1. Género *Bifidobacterium*

As bifidobactérias são caracterizadas por serem microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e anaeróbios. No que diz respeito à sua morfologia, podem ter várias formas que incluem bacilos curtos, curvados ou bifurcados. Este género inclui 30 espécies, 10 das quais são de origem humana (cáries dentárias, fezes e vagina), 17 de origem animal, 2 de águas residuais e 1 de leite fermentado; esta última tem a particularidade de apresentar uma boa tolerância ao oxigênio, ao contrário da maior parte das outras do mesmo género.

Das bactérias pertencentes ao género *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*.

As bifidobactérias são organismos que produzem ácido acético e láctico na proporção de 3:2, a partir de dois moles de hexose, sem produção de CO₂. A enzima essencial desta via metabólica fermentativa é a frutose-6-fosfato fosfocetolase. Além da glicose, todas as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono. A temperatura para a qual se regista crescimento ótimo varia entre os 37 e 41 °C, ocorrendo crescimento máximo para uma temperatura que varia entre 43 e 45 °C e um crescimento mínimo para uma temperatura entre 25 e 28 °C. Em relação ao pH, apresenta um pH ótimo entre 6 e 7 e não cresce para valores de pH entre 4.5-5.0 e valores de pH entre 8.0-8.5 (Badaró et al., 2008; Granato et al., 2010; Raizel et al., 2011; Santos, 2010; Wallace et al., 2011).

3.2. Género *Lactobacillus*

O género *Lactobacillus* conta hoje com 56 espécies reconhecidas. Dezoito delas, presentes na microbiota intestinal de humanos, são consideradas de interesse como probióticos. De entre as bactérias lácticas deste género, destacam-se *L. acidophilus*, *L.*

helveticus, *L. casei* - *subsp. paracasei* e *subsp. tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. Salivarius*.

O género *Lactobacillus* é composto por bacilos Gram-positivos, não esporulados. Possuem morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, algumas vezes, como bacilos curvados e pequenos.

Os *Lactobacillus* são microaerofílicos e, quando cultivados em meios sólidos, o desenvolvimento é normalmente melhor em anaerobiose ou na presença de uma pressão de oxigénio reduzida e de 5% a 10% de CO₂. Crescem a temperaturas entre 2°C a 53°C, com valores ótimos, entre 30°C a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5.5 e 6.2. A taxa de crescimento é frequentemente reduzida em meios neutros ou alcalinos (Badaró et al., 2008; Fuller, 1989; Granato et al., 2010; Raizel, et al., 2011; Santos, 2010; Verna e Lucak, 2010; Wallace et al., 2011).

4. Mecanismos de acção dos probióticos

Mecanismos de acção dos Probióticos	
Actividade Antimicrobiana	Imunomodulação
Diminuição do pH luminal	Efeitos nas células epiteliais
Secreção de peptídeos antimicrobianos	Efeitos nas células dendríticas
Inibição da invasão bacteriana	Efeitos nos monócitos/macrófagos
Bloqueio da adesão bacteriana às células epiteliais	Efeitos nos linfócitos
Melhoria da Função de Barreira	- Linfócitos B
Aumento da produção de muco	- Células NK
Melhoria da integridade da barreira	- Células T

Tabela 2: Mecanismos de ação dos probióticos (Adaptado de Ng et al., 2009).

As bactérias probióticas têm múltiplas e diversas influências no hospedeiro (Tabela 2). Os seus mecanismos de ação são semelhantes aos dos componentes da microbiota indígena, já que são geralmente isolados desse ecossistema. A sua utilização tem como objetivo reforçar as funções dessa microbiota ou compensá-la quando apresenta falhas. As suas propriedades de adesão permitem a sua interacção com a superfície da mucosa intestinal melhorando a função de barreira, e permitem uma exclusão competitiva de patogénios (Badaró et al., 2008; Hajela et al., 2012; Saarela et al., 2000; Vandenplas et al., 2011; Vieira et al., 2007). Também atuam ao nível da resposta imune exercendo vários efeitos sobre numerosos tipos de células envolvidas na resposta imune inata e adaptativa,

como as células epiteliais, células dendríticas, monócitos/macrófagos, células B, células T, incluindo as células T reguladoras e células NK (Ng et al., 2009).

4.1. Actividade antimicrobiana

As bactérias probióticas podem antagonizar bactérias patogénicas através da redução do pH luminal, inibindo a aderência bacteriana e translocação, ou produzindo substâncias antibacterianas e defensinas. Um dos mecanismos pelo qual a flora intestinal resiste à colonização por bactérias patogénicas é através da produção de um ambiente fisiologicamente restritivo, em relação ao pH, potencial redox, e produção de sulfureto de hidrogénio. As bactérias probióticas diminuem o pH luminal (Ng et al., 2009).

As bactérias da microbiota intestinal e/ou componentes dos probióticos podem produzir e libertar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxidos de hidrogénio que têm ação bacteriostática ou bactericida, especialmente em relação às bactérias patogénicas. As bacteriocinas têm ação local e inibem o crescimento de patógenos intestinais (Gill, 2003; Ng et al., 2009; Varavallo et al., 2008; Vieira et al., 2007; Walsh et al., 2008).

As bactérias probióticas competem por sítios de ligação (receptores ou pontos de ligação), ocupando-os na mucosa intestinal, formando um tipo de barreira física às bactérias patogénicas. Assim, as bactérias patogénicas não se conseguem ligar a esses receptores e consequentemente são excluídas por competição (Gill, 2003; Varavallo et al., 2008; Vieira et al., 2007; Walsh et al., 2008). As bactérias probióticas também competem por nutrientes com as bactérias patogénicas, levando à sua escassez no lúmen intestinal, sendo um fator limitante de manutenção das bactérias patogénicas neste ambiente. (Badaró et al., 2008; Varavallo et al., 2008).

4.2. Melhoria da função de barreira

Para além da inibição do crescimento de organismos convencionais ou potenciais patogénicos, os probióticos podem influenciar as interações ente a mucosa das células e a estabilidade celular melhorando a função da barreira intestinal através da modulação da fosforilação de proteínas do citoesqueleto e “*tigh junctions*”. A função da barreira intestinal é mantida por vários sistemas inter-relacionados, incluindo a secreção de muco, a secreção de água e cloreto e a ligação de células epiteliais nas suas junções apicais por proteínas de “*tigh junctions*” (Ng et al., 2009; Wallace, 2011). Há redução da permeabilidade macromolecular e

a translocação bacteriana (Santos, 2010). O rompimento da função da barreira epitelial ocorre em várias condições, incluindo nas infecções intestinais, e a sua melhoria pode ser um importante mecanismo pelo qual as bactérias probióticas beneficiam o hospedeiro nessas doenças (Ng et al., 2009).

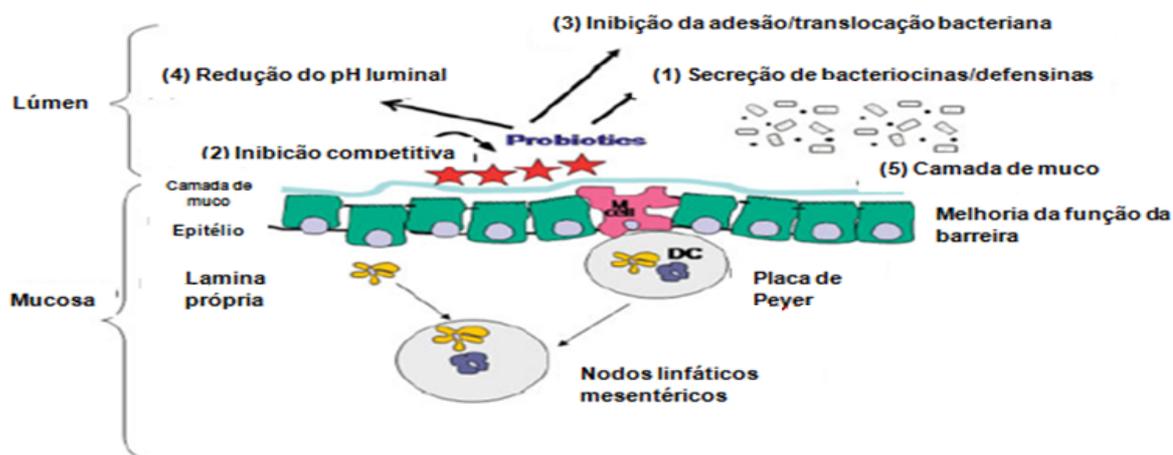


Figura 5: Inibição de bactérias entéricas e melhoria da função da barreira por bactérias probióticas (Ng et al., 2009).

A figura 5 é uma representação esquemática da relação entre bactérias probióticas e a mucosa intestinal. As atividades antimicrobianas dos probióticos incluem: a produção de bacteriocinas / defensinas (1), a inibição competitiva com as bactérias patogênicas (2), a inibição da aderência bacteriana ou translocação (3), a redução do pH luminal (4), e as bactérias probióticas também podem melhorar a função da barreira intestinal pelo aumento da produção de muco (5) (Ng et al., 2009).

4.3. Imunomodulação

A superfície da mucosa da membrana intestinal é protegida pelo sistema imunológico. A microflora interage diretamente com o sistema imunológico da mucosa intestinal, que compreende agregados linfóides organizados - as placas de Peyer e folículos isolados, estendendo-se pela mucosa e submucosa do intestino delgado formando o Tecido Linfóide Associado do Intestino (MALT), o qual permite a comunicação dos linfócitos T e B com as células de outros tecidos e a produção de IgA (Badaró et al., 2008; Oliveira e Silva, 2011).

A primeira linha de defesa do organismo contra infecções e doenças causadas por microrganismos é a mucosa intestinal, juntamente com a resposta imunológica específica do organismo. O uso de probióticos pode ter efeitos positivos sobre o sistema imunitário do seu hospedeiro, pois pode melhorar a composição da microflora intestinal e desta forma aumentar e manter a barreira imunológica local, amenizando as respostas inflamatórias. Este

efeito pode estar relacionado com a capacidade dos microrganismos probióticos interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA, a migração de células T do intestino, e a produção de interferon. Para além disto, as células probióticas favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistémica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (citocinas, células NK e/ou imunoglobulinas). Pode haver diferenças intrínsecas na maneira como as células epiteliais detectam as bactérias comensais e as probióticas relativamente às bactérias patogénicas, ao nível das vias de transdução de sinal e da produção de citocinas. De destacar o fato de que esses efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desenvolvimento de uma resposta inflamatória prejudicial (Badaró et al., 2008; Ng et al., 2009; Oliveira e Silva, 2011; Saarela et al., 2000; Thomas e Versalovic, 2010; Varavallo et al., 2008).

5. Função/ Benefícios para a saúde

Os probióticos são microrganismos capazes de conferir benefícios à saúde humana e têm sido industrialmente preparados para utilização nutricional e farmacêutica (Iannitti e Palmieri, 2010). Os probióticos têm efeitos benéficos ao nível intestinal, na síndrome do cólon irritável, na enterocolite necrosante, na borsite, na diarreia associada a antibióticos, em doenças por *Clostridium difficile*, na diarreia infecciosa, na diarreia do viajante, na intolerância à lactose, na doença inflamatória intestinal (doença de Crohn), na colite ulcerativa, na “pouchitis” (inflamação da bolsa ileal) e no cancro do cólon (Britton e Versalovic, 2008; Culligan et al., 2009; Fedorak e Madsen, 2004; Mendes, 2009; Ritchie e Romanuk, 2012; Rosenstiel e Stange, 2010; Thomas e Versalovic, 2010; Varavallo et al., 2008; Verna e Lucak, 2010). Bactérias probióticas mostraram efeitos benéficos inibindo a proliferação de *Helicobacter pylori*. Estudos revelaram que a administração de probióticos também melhorou casos de gastrite associada ao *H. pylori*, diminuindo a densidade populacional dessa bactéria no estômago, podendo ser um meio alternativo de prevenir ou diminuir a colonização gástrica por esse patógeno (Costa e Varavallo, 2011; Rosenstiel e Stange, 2010).

Modulam a resposta imune, melhorando os sintomas de alergia alimentar em crianças, reforçando a imunidade inata e protegem contra infeções virais. Diminuem a população de patógenos através da produção de ácidos láctico e acético, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos. Têm também efeitos a nível metabólico como a desconjugação e secreção de sais biliares levando à diminuição do colesterol sérico e triglicéridos, à hidrólise da lactose melhorando a intolerância à lactose e o fornecimento de

vitaminas do complexo B e vitamina k ao epitélio do cólon. Aumentam a absorção de minerais. Diminuem as reações mutagênicas e toxigênicas reduzindo assim os fatores de risco para o cancro do cólon (Badaró et al., 2008; Denipote et al., 2010; Granato et al., 2010; Holanda et al., 2008; Oliveira e Silva, 2011; Santos, 2010). Também são usados em infecções urogenitais e nas vaginites, na prevenção da cárie dentária e em doenças respiratórias como a fibrose cística (Granato et al., 2010; Holanda et al., 2008; Rosenstiel e Stange, 2010; Vandenplas et al., 2011; Varavallo et al., 2008).

6. Critérios de escolha

Um probiótico eficiente deve ser não patogênico e não tóxico, e exercer um efeito benéfico, não tendo história associada com doenças no ser humano. Além disso, deve ser capaz de sobreviver à passagem no trato gastrointestinal, particularmente às condições ambientais adversas do estômago e do intestino delgado (baixo pH, ácido gástrico, ácido biliar e pancreático, enzimas digestivas). Deve ser capaz de competir com um ambiente muito diverso e competitivo constituído pela microflora intestinal humana, aderir às células epiteliais intestinais, produzir substâncias antimicrobianas para os agentes patogênicos, sendo antagonista de bactérias patogênicas. É importante que seja antimutagênico, anticarcinogênico, modulador da resposta imune mas sem efeito pró-inflamatório. Deve manter-se estável no produto onde foi adicionado, ter boas propriedades sensoriais, deve ser isolado a partir do trato gastrointestinal humano, e não pode transferir genes de resistência aos antibióticos (Badaró et al., 2008; Mendes, 2009; Saarela et al., 2000).

7. Probióticos e *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é um microrganismo que coloniza a superfície da mucosa do estômago causando problemas ao nível gastrointestinal. Os probióticos têm um efeito benéfico no tratamento de doenças gastrointestinais como a infecção por *Helicobacter pylori* (Britton e Versalovic, 2008; Gotteland et al., 2006; Lesbros-Pantoflickova et al., 2007; Mendes, 2009; Myllyluoma et al., 2008; Santos, 2010).

7.1. Mecanismos de ação (não imunológicos e imunológicos)

Os mecanismos pelos quais os probióticos podem inibir a atividade do *Helicobacter pylori* podem ser mecanismos não imunológicos ou mecanismos imunológicos (Gotteland et al., 2006; Lesbros-Pantoflickova et al., 2007).

7.1.1. Mecanismos não imunológicos

Existem dois tipos principais de substâncias implicadas na inibição do *H. pylori* por probióticos: ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) e bacteriocinas. Os ácidos gordos de cadeia curta como o ácido fórmico, acético, propiónico, butírico e láctico são produzidos por probióticos durante o metabolismo de hidratos de carbono e têm um papel importante na diminuição do pH. A libertação de bacteriocinas contra *H. pylori* tem sido principalmente estudada em *Lactobacillus*, mas espécies de *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bifidobacterium* podem também produzir compostos proteicos estáveis ao calor, capazes de inibir o crescimento de espécies resistentes aos antibióticos e sensíveis ao *H. pylori* (Gotteland et al., 2006; Vítor e Vale, 2011; Ya Ar et al., 2010).

As barreiras não imunológicas como a acidez do estômago e a barreira da mucosa gástrica representam uma primeira linha de defesa contra bactérias patogénicas. Tem sido sugerido que a ingestão de probióticos reforça esta barreira através da produção de substâncias antimicrobianas, que vão competir com o *H. pylori* por recetores de adesão, que estimulam a produção de mucina, que estabilizam a barreira mucosa intestinal (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007; Myllyluoma et al., 2008).

7.1.1.1. Substâncias antimicrobianas

Os probióticos podem inibir o crescimento do *H. pylori* por secreção de substâncias antibacterianas. Certos Lactobacilos sintetizam compostos antimicrobianos relacionados com a família das bacteriocinas. A produção de quantidades relativamente grandes de lactato por lactobacilos pode também ser um fator de inibição do *H. pylori*. O ácido láctico, para além do seu efeito antimicrobiano resultante da redução do pH, pode também inibir a urease do *H. pylori*. No entanto, os efeitos inibitórios dos lactobacilos no *H. pylori* diferem de estirpe para estirpe (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007).

7.1.1.2. Competição pela adesão

A adesão do *H. pylori* às células epiteliais é um fator importante no estudo de doenças associadas a esta bactéria. Na mucosa gástrica, o *H. pylori* interage possivelmente com as células epiteliais através de componentes secretados ou como resultado da adesão. Assim, independentemente dos mecanismos envolvidos na inibição da adesão do *H. pylori* às células epiteliais, os probióticos inibem essa adesão, prevenindo a colonização da mucosa gástrica (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007; Myllyluoma et al., 2008).

7.1.1.3. Barreira mucosa

A redução da secreção de muco num epitélio lesado ou proliferado é frequentemente observado em gastrites associadas ao *H. pylori*. Esta bactéria suprime a expressão dos genes MUC1 e MUC5A em células gástricas humanas. Algumas bactérias probióticas como o *L. plantarum* e o *L. rhamnosus* aumentam a expressão destes genes e consequentemente a secreção extracelular de mucina pelas células do cólon. Esta propriedade permite que estes probióticos restaurem a permeabilidade da mucosa gástrica ou inibam a adesão de bactérias patogénicas como o *H. pylori* (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007; Lionetti et al., 2010; Myllyluoma et al., 2008).

7.1.2. Mecanismos imunológicos

A resposta inflamatória à infecção gástrica por *H. pylori* é caracterizada pela libertação de vários mediadores inflamatórios, tais como quimiocinas e citocinas. A resposta das citocinas é inicialmente mediada pela libertação da IL-8, o que leva à migração de neutrófilos e monócitos para a mucosa. Monócitos e células dendríticas ativados na lâmina própria produzem o fator de necrose tumoral α (TNF- α) assim como IL-1 e IL-6. Estas interleucinas estimulam as células T CD4⁺ (tipo 1), a produzirem uma série de citocinas. Esta resposta é incapaz de eliminar a infecção e sustenta a inflamação. Os probióticos podem modificar a resposta imunológica do hospedeiro através da interação com as células epiteliais e modulando a secreção de citocinas anti-inflamatórias, o que resulta numa redução da atividade gástrica e inflamação.

A ingestão de probióticos leva a uma diminuição de anticorpos específicos IgG para *H. pylori*, em paralelo com uma redução da inflamação. Reforçam também a barreira mucosa ao estimular locais de resposta à IgA, conduzindo assim a um efeito estabilizador da mucosa. Amostras diferentes de probióticos geram respostas imunes diferentes, as quais, por sua vez, dependem do estado imunológico do hospedeiro (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007; Lionetti et al., 2010; Myllyluoma et al., 2008).

8. Eficácia dos probióticos na terapia de erradicação do *Helicobacter pylori* por antibióticos (terapia tripla)

Os probióticos por si só não erradicam o *H. pylori* (Baryshnikova, 2012; Lesbros-Pantoflickova, et al., 2007; Medeiros et al., 2011; Ya Ar et al., 2010), e existe uma controvérsia sobre o efeito dos probióticos no processo de erradicação do *H. pylori* com

antibióticos (terapia tripla) (Yoon et al., 2010). Alguns estudos com certos probióticos sugerem um aumento das taxas de erradicação de *H. pylori* quando se suplementa com probióticos o tratamento com antibióticos (Baryshnikova, 2012; Gotteland et al., 2006; Lebros-Pantoflickova, et al., 2007; Lionetti et al., 2010; Matsushima e Takagi, 2012; Myllyluoma et al., 2005; Sheu et al., 2002; Vítor e Vale, 2011; Wilhelm et al., 2011; Wolvers et al., 2010; Ya Ar et al., 2010; Yoon et al., 2010) enquanto que outros sugerem o contrário (Ya Ar et al., 2010; Yoon et al., 2010). Apesar disto, é consensual que os probióticos quando associados à terapia com antibióticos ajudam na prevenção e melhoria dos efeitos secundários causados pelos antibióticos, no restabelecimento do normal funcionamento da microflora, na frequência de diarreia, náuseas e vômitos (Gotteland et al., 2006; Lebros-Pantoflickova, et al., 2007; Lionetti et al., 2010; Medeiros et al., 2011; Myllyluoma et al., 2005; Sheu et al., 2002; Vítor e Vale, 2011; Wilhelm et al., 2011; Wolvers et al., 2010; Ya Ar et al., 2010; Yoon et al., 2010).

FITOTERAPIA

Centenas de plantas distribuídas por todo o mundo são utilizadas há milhares de anos pelo homem no tratamento de diversas doenças, entre elas as infecções bacterianas. Atualmente o homem procura cada vez mais uma vida saudável e equilibrada, o que tem aumentado a procura de tratamentos alternativos, que visam a melhoria, não só dos problemas físicos, mas também do campo psíquico e afetivo, levando a uma maior sensação de melhoria e bem-estar. A fitoterapia vem de encontro a esta necessidade. É um tratamento completo, uma terapia eficiente e menos agressiva ao organismo (Oliveira et al., 2007; Pessini et al., 2003; Vítor e Vale, 2011).

A própria OMS não só reconhece como também estimula o uso de plantas medicinais pela população de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Elaborou estratégias para o uso da medicina tradicional, desenvolvendo políticas para segurança, eficácia e qualidade dos produtos naturais permitindo aumento do acesso à saúde, mas resguardando o uso racional desses produtos naturais (Souza, 2008).

A falha das terapias com antibióticos devido ao desenvolvimento de resistências das bactérias aos antibióticos, tem sido um problema crescente devido aos seus efeitos secundários, e também, principalmente nos países em desenvolvimento, o não cumprimento pelo paciente da terapia e a falta de acesso aos antibióticos devido aos custos (Lin et al., 2005; Ma et al., 2010; Ndip et al, 2007; O'Mahony et al., 2005; Vítor e Vale, 2011; Wang e

Huang, 2005). Muitas vezes nos países em desenvolvimento, há uma grande dificuldade no acesso aos medicamentos, assim como falta de saneamento básico e desnutrição. Todos estes fatores contribuem para que cada vez mais se recorra à fitoterapia, pois há uma necessidade constante de novos agentes antimicrobianos e novas abordagens para o tratamento, e prevenção de doenças (Michelin et al., 2005; Oliveira et al., 2007).

As plantas são conhecidas como sendo fonte de fitoquímicos que são benéficos para a saúde podendo também prevenir doenças. Entre estes fitoquímicos, os agentes antimicrobianos, anti-aderência e anti-inflamatórios, têm um interesse particular no caso de doenças infecciosas (Caetano et al., 2002; O'Mahony et al., 2005). Uma outra abordagem tem tido um considerável interesse como alternativa/adjuvante nos tratamentos, que é a utilização de compostos biologicamente ativos, incluindo antioxidantes a partir de plantas (Martini et al., 2009).

I. Atividade anti-*Helicobacter pylori* de extratos de plantas medicinais

A terapia antibiótica para erradicar a infecção por *Helicobacter pylori*, tem sido utilizada como primeira escolha, e como mencionado anteriormente, é uma combinação de 2 antibióticos e um inibidor da bomba de prótons (PPI) ou sais de bismuto. Contudo esta terapia tem tido falhas, devido principalmente à resistência aos antibióticos, entre outros fatores já descritos. Assim torna-se necessário recorrer a terapias adjuvantes como o uso de probióticos, já referido anteriormente, o uso de extratos de plantas entre outros (Castillo-Juárez et al., 2009; Funatogawa et al., 2004; Martini et al., 2009; Nostro et al., 2005; Vítor e Vale, 2011; Wang e Huang, 2005; Zaidi et al., 2009).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de encontrar novos agentes antimicrobianos contra vírus, fungos e bactérias como o *Helicobacter pylori*, obtidos de plantas (Oliveira et al., 2007).

Assim, vários estudos *in vitro* têm se dedicado ao estudo do efeito de alguns extratos de plantas sobre o *Helicobacter pylori*. Os estudos revelaram que alguns medicamentos fitoterápicos tradicionais são eficientes contra doenças gastrointestinais, incluindo a gastrite crônica e úlcera péptica, um dos principais resultados da infecção por *H. pylori*, indicando que as plantas medicinais podem conter componentes, que possuem atividades anti-bacterianas e anti-inflamatória (Fabry et al., 1996; Funatogawa et al., 2004; Ma et al., 2010; Ndip et al., 2007; Nostro et al., 2005; Oliveira et al., 2007; O'Mahony et al., 2005; Vítor e Vale, 2011; Zaidi et al., 2009). Efeitos antimicrobianos têm sido relatados para o alho, chá verde, mel, tomilho, algumas plantas iranianas e óleos essenciais de diversas espécies de hortelã. Alguns

desses estudos foram validados em animais e confirmado o potencial benefício da utilização de plantas como fonte de agentes antimicrobianos contra *H. pylori* (O'Mahony et al., 2005).

O sumo de oxicoço foi demonstrado ter propriedades anti-adesivas contra o *H. pylori*, inibindo a sua adesão à mucosa gástrica, sugerindo que a combinação de antibióticos e de uma preparação de sumo de oxicoço pode melhorar as taxas de erradicação do *Helicobacter pylori* (O'Mahony et al., 2005; Vítor e Vale, 2011; Wang e Huang, 2005).

Pesquisas recentes indicaram que o consumo moderado de vinho e cerveja protege contra a infecção por *H. pylori*. O agente antibacteriano no vinho é um polifenol, o resveratrol, produzido durante a fermentação. Este polifenol é ativo em condições ácidas (por exemplo no estômago) e pode estar associado à inibição de *H. pylori*. Outros estudos indicaram também que os fitoquímicos fenólicos do mel e pimentões podem inibir o *H. pylori* (Li et al., 2005).

Alguns flavonóides e isoflavonóides isolados de alcaçuz, tais como o *licochalcone A* e *licoisoflavone B*, demonstraram possuir atividade inibidora sobre o *H. pylori* (Ma et al., 2010).

Alguns extratos de plantas como o extrato de etanol de *Magnolia officinalis*, inibem a urease, levando a um aumento de pH e possível erradicação de *H. pylori* (Vítor e Vale, 2011).

Taninos hidrolisáveis podem ser utilizados na terapia da infecção por *H. pylori*, pois foi demonstrado poderem ter um efeito no ambiente ácido gástrico (Funatogawa et al., 2004).

Segundo Cwikla et al., 2010, o extrato de planta *Agrimonia eupatoria L.* tem atividade anti-*H.pylori*.

OBJETIVOS

- Avaliar o efeito dos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve* no crescimento de isolados de *H. pylori*.
- Avaliar o efeito de extratos de plantas medicinais *Agrimonia eupatoria* L. (AgC) e *Fragaria vesca* (Fv) no crescimento de isolados de *H. pylori*.

MATERIAIS E MÉTODOS

ESTIRPES BACTERIANAS

I. *Helicobacter pylori*

As estirpes de *Helicobacter pylori* utilizadas neste trabalho, são isolados clínicos obtidos de doentes dispépticos portugueses. Estes isolados clínicos foram obtidos a partir de biópsias recolhidas durante endoscopia gástrica de doentes seguidos na consulta de Gastreenterologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Estes isolados clínicos estavam conservados a - 80°C.

I.1. Crescimento dos isolados clínicos de *H. pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria de difícil crescimento e as suas culturas sofrem facilmente contaminações. Para além destas dificuldades a nível do crescimento por vezes perde a viabilidade mesmo quando conservado a - 80°C. Desta forma a fase inicial deste trabalho consistiu em avaliar quais os isolados clínicos que se mantinham viáveis e em cultura pura.

Com este objetivo, as estirpes de *H. pylori* foram descongelados e repicadas para caixas de gelose Columbia (BioMérieux). De seguida foram incubadas a 37°C, em condições de microaerofilia, durante 72 h. Apesar de estas estirpes terem sido identificadas como *H. pylori* antes de serem congeladas, no final da incubação observaram-se as culturas para avaliar se estavam puras e realizou-se o teste da urease (Anexo I) para confirmar a identificação. As culturas puras foram utilizadas para fazer a conservação das estirpes. As estirpes foram conservadas a -80°C em criotubos contendo 0,5 ml de caldo *Mueller-Hinton* (MH) e 0,5 ml de glicerol 30%. Os tubos foram identificados e congelados a -80°C em caixas compartimentadas e devidamente identificadas.

Quando as culturas obtidas não estavam puras fez-se um isolamento em gelose *Pylori* (BioMérieux) a partir de colónias com aspeto típico de *H. pylori* e incubou-se a 37°C, em condições de microaerofilia, durante 72 h. A partir das culturas puras obtidas fez-se uma repicagem para gelose Columbia (BioMérieux) e incubou-se a 37°C, em condições de microaerofilia, durante 72 h. As culturas puras foram utilizadas para fazer a conservação das estirpes.

Selecionaram-se 21 isolados de *Helicobacter pylori* para o trabalho.

2. Estirpes de probióticos

2.1. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC® 9595™

Lactobacillus rhamnosus é um bacilo de Gram-positivo, anaeróbio facultativo. O meio utilizado para crescer esta bactéria foi o meio *Man Rogosa Sharpe* (MRS) broth (BD).

Esta estirpe foi adquirida sob a forma liofilizada. A ampola onde vinha acondicionada foi aberta em condições assépticas e a partir de um tubo com 5-6 ml de caldo MRS (BD) retirou-se 0,5 a 1 ml deste caldo e hidratou-se o liofilizado. A suspensão obtida foi transferida para o tubo de caldo de onde se retirou a alíquota de meio e homogeneizou-se bem. A partir desta suspensão inocularam-se vários tubos de caldo MRS (BD) e várias placas contendo gelose MRS (BD). Os tubos e as placas foram incubados a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ durante 24-48 horas. Após o período de incubação, avaliou-se a presença de crescimento no meio líquido através da turvação e no meio sólido pelo desenvolvimento de colónias com aspeto leitoso.

Estas culturas foram utilizadas para fazer a conservação desta estirpe bacteriana. Colocou-se 0,5 ml de caldo *Mueller-Hinton* (MH) (BioMérieux) e 0,5 ml de glicerol a 30% em criotubos e ressuspenderam-se as bactérias desenvolvidas na gelose MRS (BD). Os criotubos foram identificados e congelados a -80°C em caixas compartimentadas e devidamente identificadas.

Sempre que necessário a estirpe de *Lactobacillus rhamnosus* foi descongelada e repicada para placas de gelose ou de caldo MRS (BD) e incubada a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ durante 24-48 horas.

2.2. *Bifidobacterium breve* ATCC® 15700™

Bifidobacterium breve é um bacilo de Gram-positivo, imóvel e anaeróbio. O meio utilizado para crescer o *Bifidobacterium breve* foi o *Reinforced Clostridial Medium* (RCM) (Oxoid), em placas e em tubos.

Esta estirpe foi adquirida sob a forma liofilizada. A ampola onde vinha acondicionada a estirpe foi aberta em condições assépticas e a partir de um tubo com 5-6 ml de caldo RCM (Oxoid) retirou-se 0,5 a 1 ml deste caldo e hidratou-se o liofilizado. A suspensão obtida foi transferida para o tubo de caldo de caldo RCM (Oxoid), a partir do qual se tinha retirado a alíquota de meio utilizada na hidratação do liofilizado e homogeneizou-se bem. A partir desta suspensão inocularam-se vários tubos de caldo RCM (Oxoid), e várias placas contendo gelose RCM (Oxoid). Os tubos e as placas foram incubados a 37°C em anaerobiose, durante

24-48 h. Após o período de incubação, avaliou-se a presença de crescimento no meio líquido através da turvação e no meio sólido pelo desenvolvimento de colônias brancas.

Estas culturas foram utilizadas para fazer a conservação desta estirpe bacteriana. Colocou-se 0,5 ml de caldo MH e 0,5 ml de glicerol a 30% em criotubos e ressuspenderam-se as bactérias desenvolvidas na gelose RCM (Oxoid). Os criotubos foram identificados e congelados a -80°C em caixas compartimentadas e devidamente identificadas.

Sempre que necessário a estirpe de *Bifidobacterium breve* foi descongelada e repicada para placas de gelose ou de caldo RCM (Oxoid) e, posteriormente incubada a 37°C em anaerobiose, durante 24-48 h.

EFEITO DE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* E *BIFIDOBACTERIUM BREVE* NO CRESCIMENTO DE *HELICOBACTER PYLORI*

I. Teste de inibição do crescimento em meio sólido

I.1. Atividade de culturas puras de probióticos

O teste de inibição do crescimento em meio sólido foi feito tendo como base a metodologia de Kirby e Bauer utilizada no antibiograma, baseada na difusão do agente inibitório presente num disco na gelose.

A partir de uma cultura pura de *H. pylori* em gelose Columbia (BioMérieux) com 72h de incubação preparou-se uma suspensão em PBS estéril com uma turvação equivalente a 4 da escala de McFarland. Embebeu-se uma zaragatoa nesta suspensão e inocularam-se por sementeira em toalha, quatro placas de gelose Columbia (BioMérieux) por cada estirpe. Paralelamente, a partir de uma cultura de *Lactobacillus rhamnosus* em caldo MRS, incubada a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 24-48h foi preparada uma suspensão em PBS com uma turvação equivalente ao 4 da escala de McFarland. Da mesma forma, preparou-se uma suspensão em PBS (tampão fosfato salino) com uma turvação equivalente ao 4 da escala de MacFarland, a partir de uma cultura de *Bifidobacterium breve* em caldo RCM (Oxoid), incubada a 37°C em anaerobiose durante 24-48h.

Após secagem do inóculo foram aplicados, dois discos estéreis de papel de filtro com 7 mm de diâmetro, por caixa, com o auxílio de uma pinça, em duas das caixas inoculadas. A partir das suspensões preparadas anteriormente, colocou-se 10µl de cada suspensão de probióticos nos discos de papel de filtro. Nas outras duas placas inoculadas com *H. pylori* foram feitos 2 poços por placa utilizando pipetas de Pasteur estéreis e em cada poço foram

colocadas alíquotas de 50 µl das suspensões obtidas a partir das culturas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve*.

As placas foram incubadas a 37°C em condições de microaerofilia, durante 72 h. Após este período as placas foram observadas para avaliar a existência de halos de inibição. Os resultados foram lidos com ajuda de uma craveira, medindo o halo de inibição em milímetros.

Este procedimento foi repetido em três culturas diferentes, e o resultado foi considerado positivo quando houve inibição em pelo menos duas das três placas.

1.2. Atividade de extratos brutos preparados a partir culturas puras de probióticos

A partir de uma cultura de *Lactobacillus rhamnosus* em caldo MRS, incubada a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 24-48h foi preparada uma suspensão em 1 ml PBS com uma turvação equivalente a 4 da escala de McFarland. Da mesma forma, preparou-se uma suspensão em PBS partir de uma cultura de *Bifidobacterium breve*. As células bacterianas foram sonicadas em gelo durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos com um sonicador *Vibra Cell, Sonics and Material Inc.* a 120 MHz. Os sonicados foram centrifugados em tubos *eppendorf*, 12 000g/20 min., à temperatura ambiente e os sobrenadantes (extratos brutos) foram utilizados para avaliar a sua atividade sobre o *Helicobacter pylori*.

A partir de uma cultura pura de *H. pylori* em gelose Columbia (BioMérieux) com 72h de incubação preparou-se uma suspensão em PBS estéril com uma turvação equivalente a 4 da escala de McFarland. Embebeu-se uma zaragatoa nesta suspensão e inoculou-se por sementeira em toalha, uma placa de gelose Columbia (BioMérieux) por cada estirpe. Após secagem do inóculo foram aplicados, dois discos estéreis de papel de filtro com 7 mm de diâmetro, por caixa. Em dois dos discos de papel de filtro colocou-se 10µl de cada um dos extratos brutos preparados anteriormente.

As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia durante 72h. Após este período as placas foram observadas para avaliar a existência de halos de inibição. Os resultados foram lidos com ajuda de uma craveira, medindo o halo de inibição em milímetros.

Este procedimento foi repetido em três culturas diferentes, e o resultado foi considerado positivo quando houve inibição em pelo menos duas das três placas.

EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS NO CRESCIMENTO DE *HELICOBACTER PYLORI*

Neste estudo foram utilizados dois extratos de plantas medicinais. Um foi obtido a partir de folhas de *Fragaria vesca* (Fv), uma planta normalmente selvagem e popularmente conhecida como morango-silvestre (Fig. 6A).

O outro extrato foi obtido a partir da parte aérea de *Agrimonia eupatoria* L. (AgC). A *Agrimonia eupatoria* L. é uma rosácea que habita as regiões temperadas do hemisfério norte e é uma planta medicinal muito utilizada na medicina tradicional (Fig. 6B).



Figura 6A: *Fragaria vesca* (Fv).



Figura 6B: *Agrimonia eupatoria* L. (AgC).

Assim, os extractos utilizados foram:

1. Extrato hidro-alcoólico de folhas de *Fragaria vesca* (Fv), obtido por extração num homogeneizador do tipo *Ultra-Turrax*;
2. Macerado hidro-alcoólico da parte aérea de *Agrimonia eupatoria* L. (AgC).

Após a extração, cada um dos dois extratos foi filtrado e concentrado num evaporador rotativo, a temperatura inferior a 40°C tendo-se, finalmente, procedido à liofilização.

A composição fenólica de cada extrato foi avaliada por cromatografia líquida de alta resolução com detetor de fotodíodos (HPLC-PDA), por recurso a uma coluna de fase reversa e a um gradiente de metanol e água acidificada pelo ácido fórmico.

Para os ensaios microbiológicos utilizaram-se os liofilizados, solubilizados em etanol a 40%, em 4 concentrações diferentes: 200 mg/ml, 150 mg/ml, 100 mg/ml e 50 mg/ml.

Os extratos foram-nos amavelmente cedidos pela Professora Doutora Teresa Batista.

I. Detecção de Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Disco

O teste de difusão em disco foi utilizado como método de *screening* da susceptibilidade dos isolados clínicos de *H. pylori* aos extratos de plantas.

O teste de difusão em disco foi feito tendo como base a metodologia de Kirby e Bauer utilizada no antibiograma, tal como mencionado anteriormente para o teste de inibição de *H. pylori* por probióticos em meio sólido.

A partir de uma cultura pura de *H. pylori* em gelose Columbia (BioMérieux) com 72h de incubação preparou-se uma suspensão em PBS estéril com uma turvação equivalente a 4 da escala de McFarland. Embebeu-se uma zaragatoa nesta suspensão e inocularam-se por sementeira em toalha, duas placas de gelose Columbia (BioMérieux) por cada estirpe de *H. pylori*. Cada placa foi utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana de cada um dos extratos utilizados e colocaram-se 4 discos de papel de filtro com 7mm (BioMérieux) por placa, na superfície da gelose inoculada. Os discos de papel de filtro foram impregnados com 10 µl de cada uma das quatro concentrações de extrato. Na primeira placa: 1. AgC 200 mg/ml; 2. AgC 150 mg/ml; 3. AgC 100 mg/ml; 4. AgC 50 mg/ml e na segunda placa: 5. Fv 200 mg/ml; 6. Fv 150 mg/ml; 7. Fv 100 mg/ml; 8. Fv 50 mg/ml.

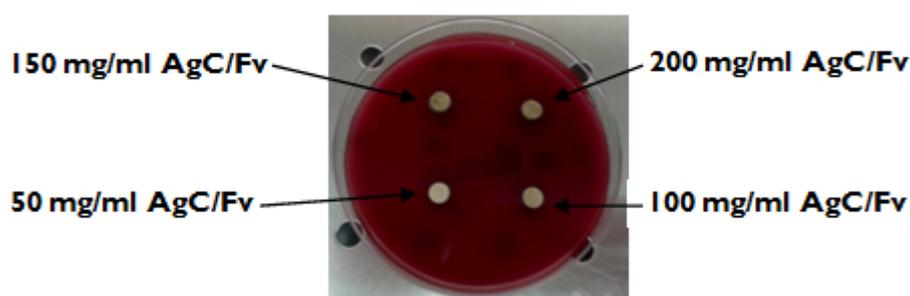


Figura 7: Cultura de um isolado de *H. pylori* para detecção de atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais pelo método de difusão em disco.

As placas foram incubadas a 37°C em condições de microaerofilia, durante 72 h. Após este período, avaliou-se a existência de halos de inibição e o diâmetro dos halos de inibição foram lidos em milímetros com ajuda de uma craveira.

Todos os testes foram realizados em triplicado e a atividade antibacteriana foi expressa como a média dos diâmetros de inibição em milímetros produzidos pelos extratos de plantas.

Inicialmente avaliou-se o efeito do solvente dos extractos das plantas, no crescimento de *H. pylori*, procedendo-se como anteriormente descrito, para avaliar o efeito dos extractos.

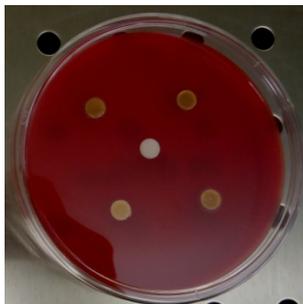


Figura 8: Cultura de um isolado de *H. pylori* para detecção de atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais e do seu solvente pelo método de difusão em disco.

2.Determinação da concentração mínima inibitória

Os extratos de plantas medicinais utilizados neste estudo demonstraram possuir atividade anti-*H. pylori* para todos os isolados estudados e como o perfil de inibição era semelhante em todos os isolados foram escolhidos aleatoriamente 5 para determinar a concentração mínima inibitória (CMI). A CMI é definida como a concentração mínima de extracto de planta capaz de inibir o crescimento visível.

2.1. Crescimento em caldo cérebro-coração

Antes de se proceder à determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi feito o crescimento dos isolados clínicos de *H. pylori* em caldo cérebro coração com duas concentrações diferentes de soro bovino fetal (5 e 10%) com o objetivo de avaliar qual a concentração de soro mais favorável ao crescimento de *H. pylori* e assim selecionar a concentração a utilizar nos ensaios de microdiluição.

Com esse objetivo, a partir das culturas obtidas em gelose Columbia (BioMérieux), incubadas durante 72 h, inocularam-se com cada estirpe de *H. pylori* dois matrizes com 25 ml de caldo cérebro-coração, um contendo 5% e outro 10% de soro bovino fetal. Estes matrizes foram incubados numa estufa orbital, a 37°C, em condições de microaerofilia durante 72 h. Após este período de incubação, o crescimento foi avaliado medindo a absorvância a 600 nm.

2.2. Ensaio de microdiluição

Em placas estéreis com 96 poços foram colocados 100 μ l de caldo cérebro-coração (Oxoid) com 5% de soro bovino fetal em cada poço. De seguida no primeiro poço das primeiras 6 filas da placa colocou-se 100 μ l do extrato de AgC com a concentração de 100 mg/ml. Depois transferiu-se 100 μ l da mistura presente no primeiro poço para o segundo, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente, obtendo-se uma série de diluições de 1:2 nas primeiras 6 filas. Do último poço foram retirados 100 μ l e desprezados. As duas últimas colunas ficaram apenas com o meio de cultura.

Foi realizado o mesmo procedimento para o extrato Fv, tendo-se colocado no primeiro poço 100 μ l do extrato Fv com uma concentração de 150 mg/ml.

Paralelamente foi preparada uma suspensão bacteriana a partir das estirpes a serem testadas, de forma a ficarem com uma turbidez equivalente a 4 da escala de McFarland. A partir desta suspensão foram inoculados 100 μ l em cada poço, de acordo com o esquema da figura:

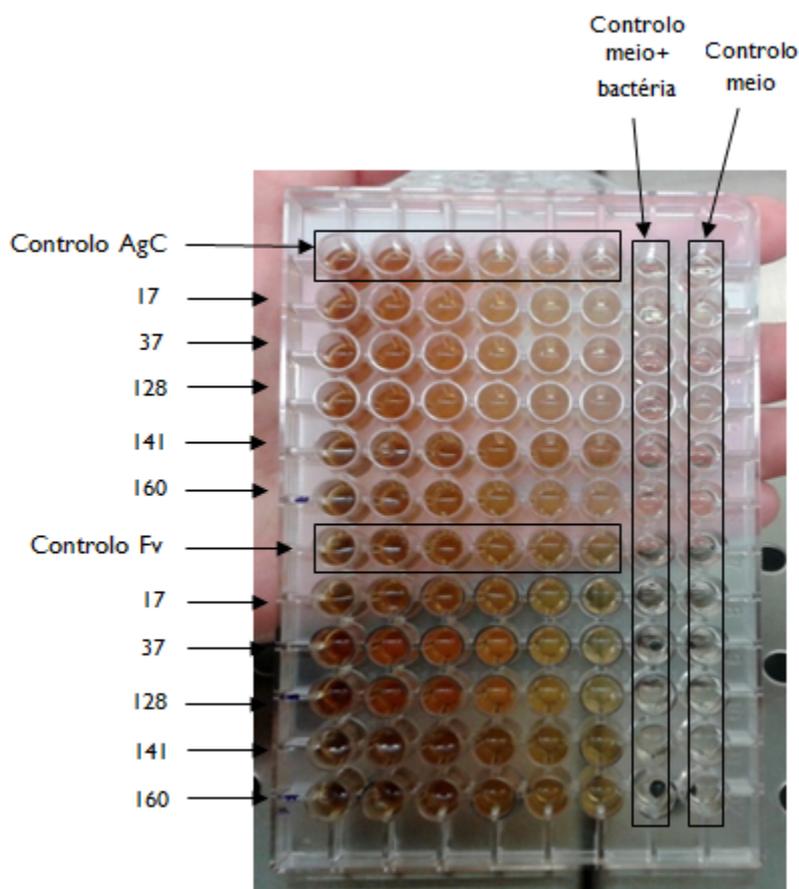


Figura 9: Esquema do ensaio de microdiluição para a determinação da CMI.

A 1ª fila corresponde ao controlo do extrato AgC.

A 7ª fila corresponde ao controlo do extrato Fv.

A penúltima coluna de poços, que continha apenas meio de cultura e estirpe bacteriana foi utilizada como controlo do crescimento bacteriano bacteriano e a última coluna de poços tendo apenas meio de cultura, corresponde ao controlo de esterilidade do meio de cultura.

As placas foram incubadas a 37°C, em condições de microaerofília, durante 72 horas e a absorvância foi lida a 600nm num leitor de placas (*Synergy HT, Bio-TEK*). A partir destes valores determinou-se a CMI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFEITO DE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* E *BIFIDOBACTERIUM BREVE* NO CRESCIMENTO DE *HELICOBACTER PYLORI*

I. Teste de inibição do crescimento em meio sólido

O efeito dos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve* no crescimento de *H. pylori* foi avaliado em 18 isolados diferentes.

I.1. Atividade de culturas puras de probióticos

O efeito dos probióticos no crescimento dos isolados de *H. pylori* 18, 26, 31, 32, 33, 35, 42 e 56 foi avaliado pipetando 10 μ l das culturas puras dos probióticos para discos de papel de filtro colocados sobre uma gelose Columbia previamente inoculada com cada um dos isolados de *H. pylori* (Fig. 10 A). O efeito dos probióticos no crescimento dos isolados de *H. pylori* 24, 27, 29, 37 e 75 foi testado colocando 50 μ l das culturas de probióticos em cada poço da gelose Columbia previamente inoculada com cada um dos isolados de *H. pylori* (Fig. 10 B).

Após incubação das placas de gelose Columbia observou-se a ausência de halos de inibição em torno dos discos e dos poços onde tinham sido colocadas as suspensões de probióticos, para todas as estirpes estudadas.

Este teste foi repetido três vezes, observando-se sempre a inexistência de halos de inibição.

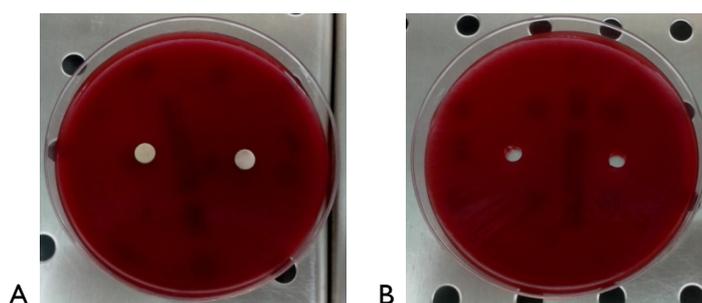


Figura 10: Efeito de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Bifidobacterium breve* no crescimento de um isolado clínico de *H. pylori*. As culturas puras de probióticos foram colocadas em discos de papel de filtro (A) e em poços (B).

1.2. Atividade de extratos brutos preparados a partir culturas puras de probióticos

O efeito de extratos brutos preparados a partir de culturas puras de probióticos foi avaliado em 10 isolados clínicos de *H. pylori*. Os isolados de *H. pylori* testados foram o número 12, 17, 18, 21, 23, 26, 35, 37, 75 e 84. O efeito de extratos brutos preparados a partir de culturas puras de probióticos foi avaliado adicionando 10 μ l de extratos brutos em discos de papel de filtro colocados sobre uma gelose Columbia previamente inoculada com cada um dos isolados de *H. pylori*.

Após observação das placas de gelose Columbia verificou-se a inexistência de halos de inibição em todas as estirpes estudadas. Este teste foi repetido três vezes, observando-se sempre a ausência de halos de inibição.



Figura 11: Efeito de extratos brutos obtidos a partir de culturas puras de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve* no crescimento de isolados clínicos de *H. pylori*.

Os resultados obtidos demonstraram que as culturas puras dos probióticos testados e os extractos brutos obtidos a partir dessas culturas não apresentavam atividade anti-*H. pylori*.

Apesar dos isolados de *H. pylori* estudados não terem sido inibidos pelas estirpes de probióticos testadas, não significa que não possam ser inibidas por outras estirpes, de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve*. Myllyluoma et al., 2008, estudaram o efeito do *Lactobacillus rhamnosus* GG e Lc 705 e *Bifidobacterium breve* Bb99 sobre o *H. pylori in vivo* tendo obtido efeitos anti- *H. pylori*. Vários estudos com outros probióticos têm demonstrado actividade anti-*H.pylori in vitro* (Chen et al., 2012; Chenoll et al., 2011; Midolo et al., 2008; Sakamoto et al., 2001; Sgouras et al., 2004; Wang et al., 2004).

Nas últimas décadas, tem sido dada particular atenção aos benefícios para a saúde humana da utilização de probióticos. Vários estudos têm demonstrado a utilidade da administração de probióticos no tratamento de várias patologias gastrintestinais. Neste

âmbito, tem sido realçado os benefícios do uso de agentes probióticos conjuntamente com a terapêutica, em indivíduos infectados com *H. pylori*. O uso de probióticos para além de poder prevenir a diarreia associada à toma de antibióticos, parecem possuir, acção anti- *H. pylori* e capacidade de redução da resposta inflamatória provocada pelo microrganismo (Franceschi et al., 2007; Lesbros-Pantoflickova et al., 2007; Pena et al., 2005; Rokka et al., 2008; Sgouras et al., 2005). Assim, abordagens dietéticas que permitam manter num nível baixo a densidade de colonização de *H. pylori* e a inflamação associada à infecção pode, pelo menos nalguns doentes, constituir um adjuvante desejável da terapêutica.

A maioria dos autores concorda que existe uma melhoria das taxas de erradicação do *H. pylori* com probióticos como complemento ao tratamento com antibióticos (Baryshnikova, 2012; Gotteland et al., 2006; Lebros-Pantoflickova, et al., 2007; Lionetti et al., 2010; Matsushima e Takagi, 2012; Myllyluoma et al., 2005; Sheu et al., 2002; Vítor e Vale, 2011; Wilhelm et al., 2011; Wolvers et al., 2010; Yoon et al., 2010; Ya Ar et al., 2010), mas há também autores que defendem que os probióticos não têm influência nas taxas de erradicação de *H. pylori* (Ya Ar et al., 2010; Yoon et al., 2010).

Outro efeito benéfico associado ao uso de probióticos durante o tratamento da infecção por *H. pylori* com antibióticos, é a melhoria dos efeitos secundários. (Gotteland et al., 2006; Lebros-Pantoflickova, et al., 2007; Lionetti et al., 2010; Medeiros et al., 2011; Myllyluoma et al., 2005; Sheu et al., 2002; Vítor e Vale, 2011; Wilhelm et al., 2011; Wolvers et al., 2010; Yoon et al., 2010; Ya Ar et al., 2010).

Apesar de não se ter observado efeitos *in vitro* anti-*H. pylori* com os probióticos estudados, estes probióticos poderão melhorar os sintomas da infecção por *H. pylori* e os efeitos secundários durante a terapia com antibióticos. Outro tipo de estudos teria que ser realizado para testar esta hipótese.

EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS NO CRESCIMENTO DE *HELICOBACTER PYLORI*

Como já referido anteriormente, foram utilizados neste estudo dois extractos de plantas medicinais. Um obtido a partir de folhas de *Fragaria vesca* (Fv), e outro obtido a partir da parte aérea de *Agrimonia eupatoria* L.

I. Detecção de Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Disco

O efeito dos extractos de plantas medicinais no crescimento de *Helicobacter pylori* foi estudado em 12 isolados diferentes. O efeito destes extractos foi avaliado adicionando 10 µl de cada uma das quatro concentrações de extrato em discos de papel de filtro, colocados numa gelose Columbia previamente inoculada com um dos isolados de *H. pylori*.

Após observação das placas verificou-se a presença de halos de inibição na presença de ambos os extractos e para todas as concentrações de extrato testadas. Estes ensaios foram repetidos três vezes para cada estirpe e os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e anotados (Tabelas 3-14). A partir destes valores foi calculada a média e o desvio padrão.



Figura I2: Efeito do extrato Fv no crescimento de um isolado de *H. pylori*.

O efeito do solvente dos extractos das plantas medicinais foi avaliado inicialmente não se tendo observado qualquer efeito inibitório sobre os isolados de *H. pylori*.

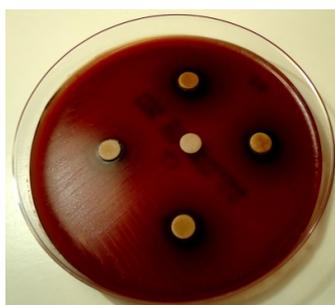


Figura I3: Efeito do extracto AgC e do seu solvente no crescimento de um isolado de *H. pylori*.

Amostra		Isolado 12 de <i>Helicobacter pylori</i>						
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	19	15	12	10	26	23	18	13
	20	20	17	12	20	19	17	12
	20	18	15	11	21	21	19	18
Média	20	18	15	11	22	21	18	14
Desvio padrão	0,6	2,1	2,1	0,8	2,6	1,6	0,8	2,6

Tabela 3: Diâmetros dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 12.

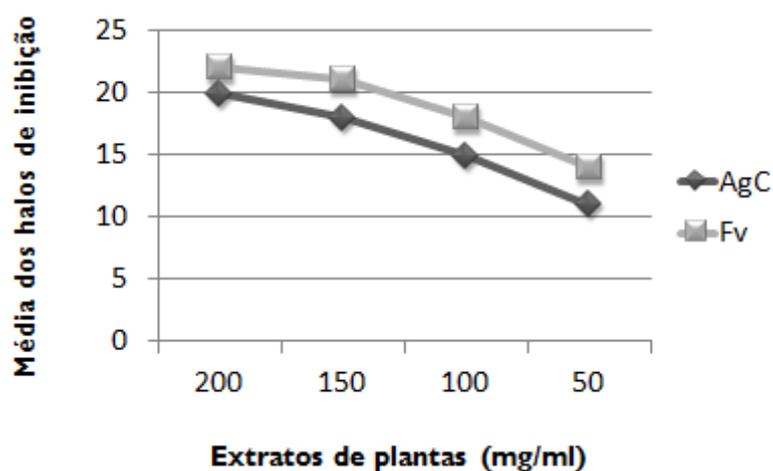


Figura 14: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 12, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Amostra		Isolado 17 de <i>Helicobacter pylori</i>						
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	18	18	16	12	25	22	19	13
	18	17	14	11	26	25	21	17
	18	18	14	12	28	24	20	14
Média	18	18	15	12	26	24	20	15
Desvio padrão	0	0,7	1,2	0,7	1,6	1,6	1	2,1

Tabela 4: Diâmetros dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 17.

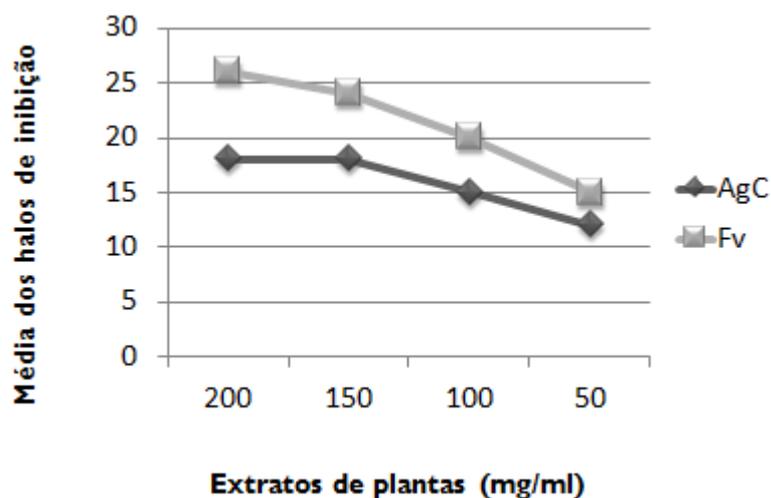


Figura 15: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 17, com a concentração, em mg/ml, dos extratos AgC e Fv.

Amostra	Isolado 24 de <i>Helicobacter pylori</i>							
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	17	14	11	9	25	24	20	15
	16	14	12	9	22	20	18	14
	17	14	12	9	24	22	19	15
Média	17	14	12	9	24	22	19	15
Desvio padrão	0,6	0	0,6	0	1,3	1,6	0,8	0,6

Tabela 5: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 24.

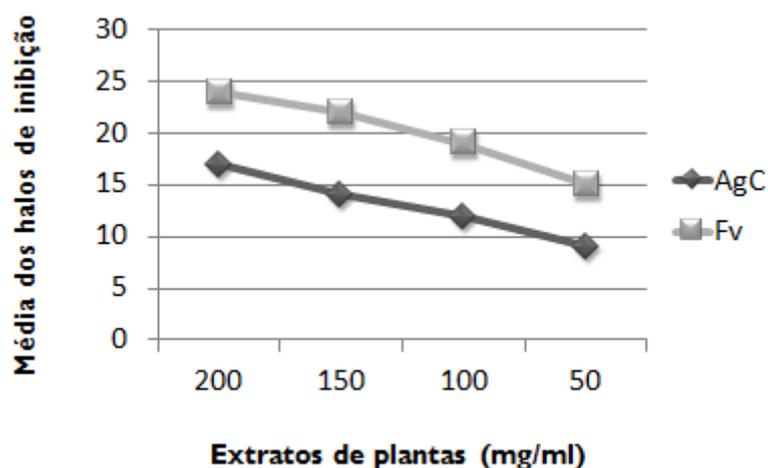


Figura 16: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 24, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra		Isolado 25 de <i>Helicobacter pylori</i>							
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50	
	16	15	13	10	27	24	20	16	
	20	17	17	13	25	23	21	16	
	20	18	17	12	25	23	21	16	
Média	19	17	16	12	26	23	21	16	
Desvio padrão	2,3	1,6	2,3	1,6	1,2	0,7	0,7	0	

Tabela 6: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 25.

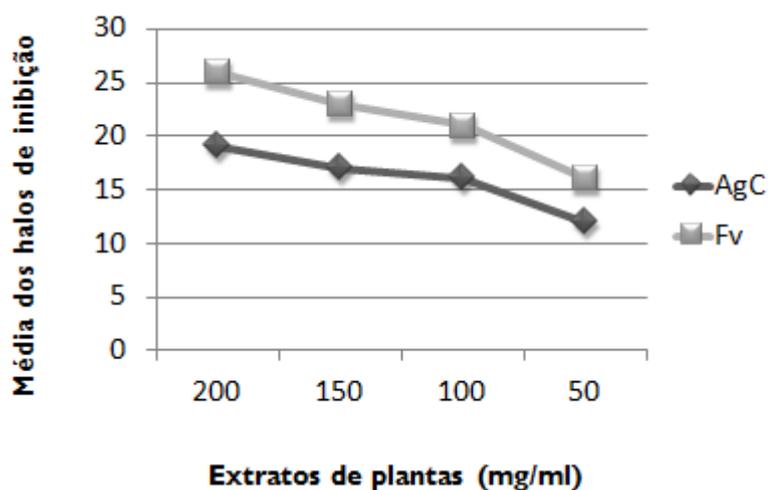


Figura 17: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 25, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra		Isolado 26 de <i>Helicobacter pylori</i>							
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50	
	13	12	12	9	23	21	18	12	
	17	15	13	10	28	25	22	19	
	15	13	12	10	26	23	21	15	
Média	15	13	13	10	26	23	20	15	
Desvio padrão	2	1,7	1	0,7	2,5	2	2,1	3,5	

Tabela 7: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 26.

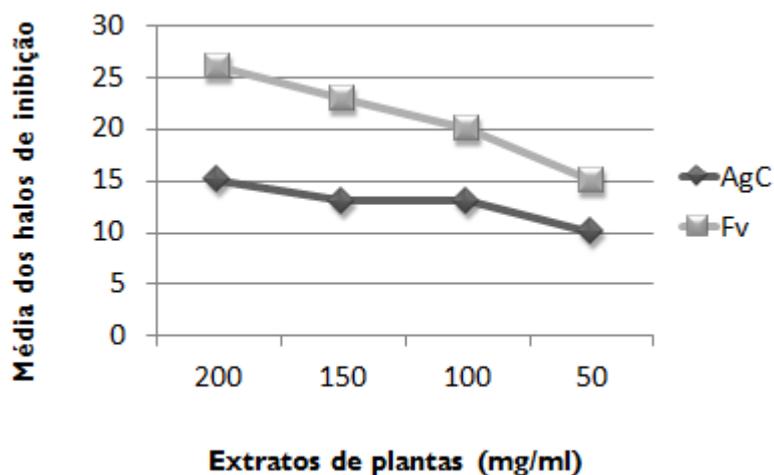


Figura 18: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 26, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra	Isolado 27 de <i>Helicobacter pylori</i>							
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	13	12	11	9	22	20	18	14
	16	14	13	10	25	23	21	16
	15	14	12	10	25	24	19	14
Média	15	13	12	10	24	22	19	15
Desvio padrão	1,6	1,2	1	0,7	1,7	2,1	1,6	1,2

Tabela 8: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 27.

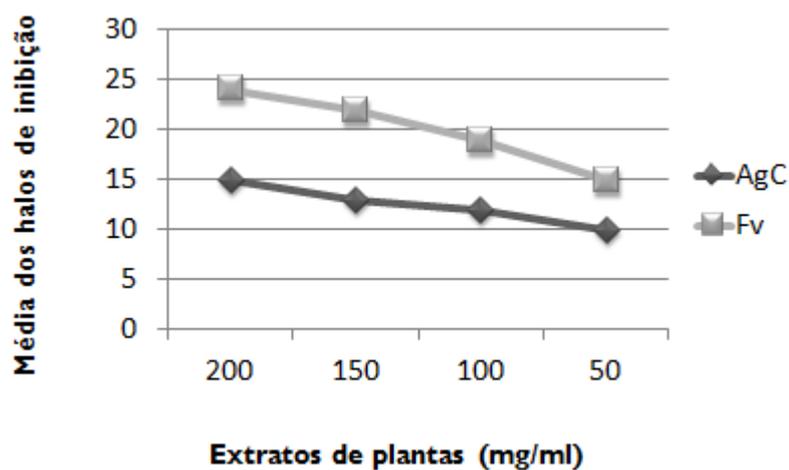


Figura 19: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 27, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra		Isolado 35 de <i>Helicobacter pylori</i>						
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	16	14	13	10	20	19	16	12
	17	15	13	10	22	20	20	16
	17	16	14	11	24	23	20	14
Média	17	15	13	10	22	21	17	14
Desvio padrão	0,7	1	0,7	0,7	2	2,1	3	2

Tabela 9: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 35.

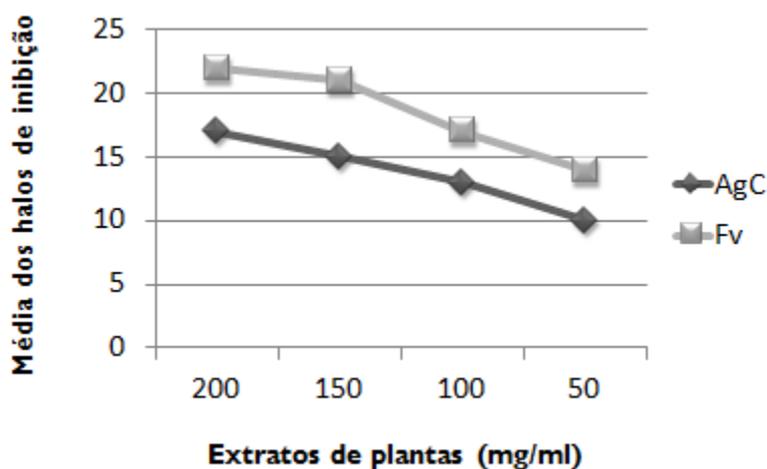


Figura 20: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 35, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra		Isolado 37 de <i>Helicobacter pylori</i>						
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	18	16	14	11	25	23	21	16
	21	19	17	14	26	25	23	20
	29	28	26	22	30	30	29	28
Média	23	21	19	16	27	26	24	21
Desvio padrão	5,7	6,2	6,2	5,7	2,6	3,6	4,2	6

Tabela 10: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 37.

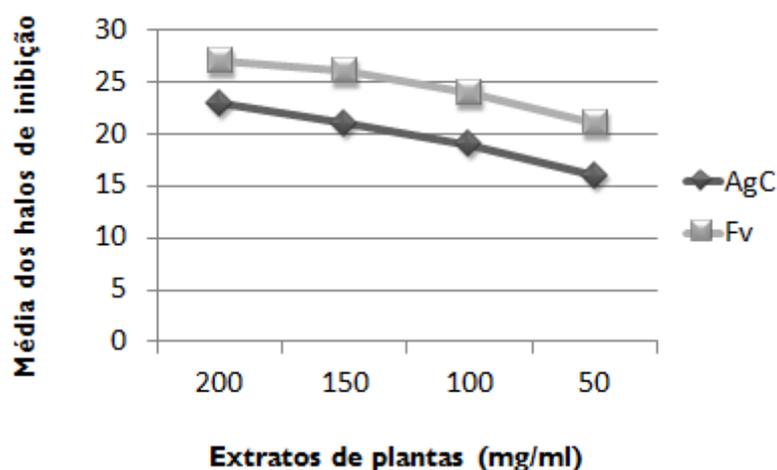


Figura 21: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 37, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra	Isolado 56 de <i>Helicobacter pylori</i>							
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	24	21	20	18	30	28	28	20
	22	22	18	16	28	26	26	21
	22	22	20	15	29	27	27	21
Média	23	22	19	16	29	27	27	21
Desvio padrão	1	0,6	1	1,3	0,8	0,8	0,8	0,6

Tabela 11: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 56.

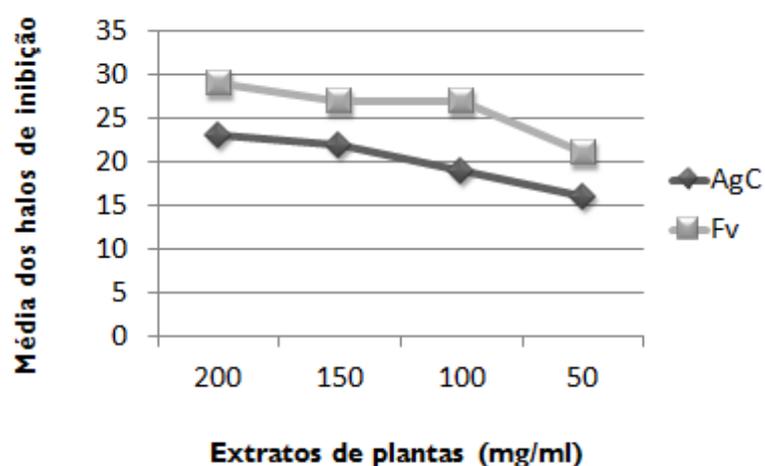


Figura 22: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 56, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra		Isolado 75 de <i>Helicobacter pylori</i>						
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	13	12	12	9	23	21	18	12
	16	14	12	8	24	21	19	17
	15	14	12	10	25	24	20	14
Média	15	13	12	9	24	22	19	14
Desvio padrão	1,6	1,3	0	1	1	1,7	1	2,5

Tabela 12: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 75.

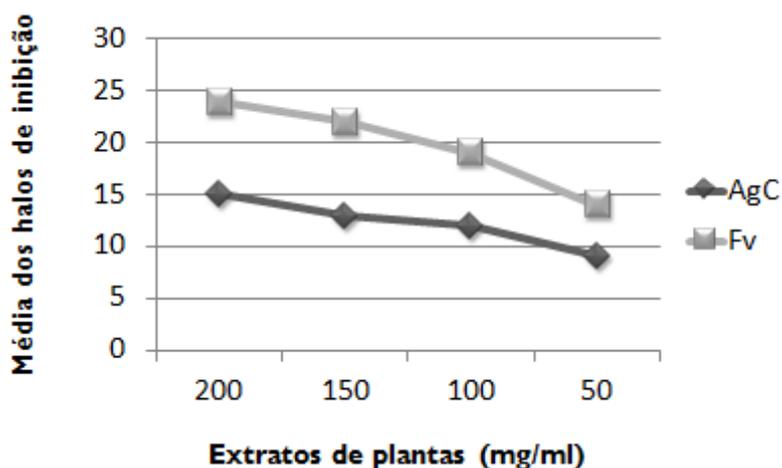


Figura 23: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 75, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra		Isolado 128 de <i>Helicobacter pylori</i>						
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	17	15	12	10	25	22	19	13
	23	21	19	16	26	23	21	15
	23	21	19	16	25	23	21	16
Média	21	19	17	14	25	23	20	15
Desvio padrão	3,5	3,5	4	3,5	0,7	0,7	1,2	1,6

Tabela 13: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 128.

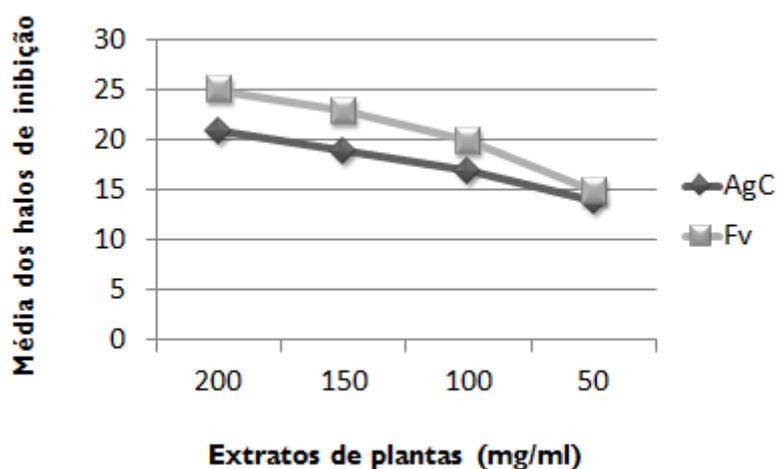


Figura 24: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 128, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Amostra	Isolado 160 de <i>Helicobacter pylori</i>							
Extratos (mg/ml)	AgC 200	AgC 150	AgC 100	AgC 50	Fv 200	Fv 150	Fv 100	Fv 50
	15	13	12	10	24	21	20	15
	26	23	19	16	26	23	21	15
	21	20	16	14	25	24	21	16
Média	21	19	16	13	25	23	21	15
Desvio padrão	6,5	7	4,6	4	2,1	1,7	0,7	1

Tabela 14: Diâmetro dos halos de inibição obtidos a partir do isolado 160.

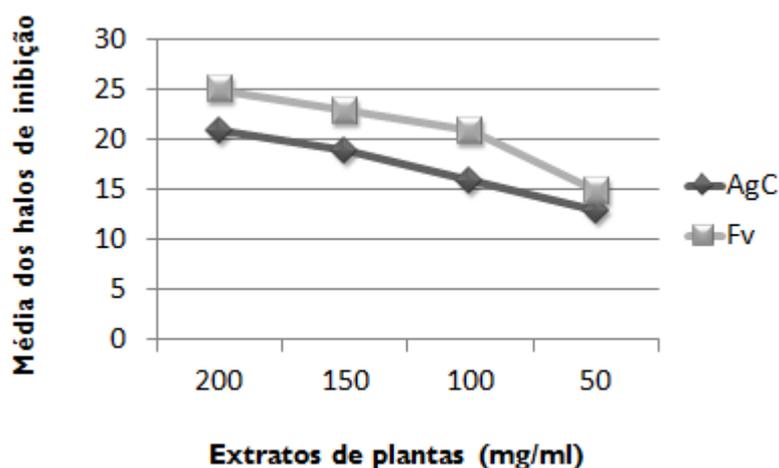


Figura 25: Correlação do diâmetro dos halos de inibição obtidos com o isolado 160, com a concentração, em mg/ml, de AgC e Fv.

Representando graficamente os diâmetros dos halos de inibição obtidos com cada isolado estudado, em função da concentração de extrato, observa-se um efeito inibitório dependente da concentração utilizada (Fig. 14-25) em todos os isolados de *Helicobacter pylori*. O diâmetro dos halos de inibição diminui à medida que a concentração dos extratos de plantas (AgC e Fv) diminui. Ou seja, a inibição é maior para concentrações mais elevadas de extratos.

Comparando o efeito inibitório dos dois extractos, observa-se uma maior inibição para todas as estirpes, com o extracto da *Fragaria vesca*.

Actualmente, não existe nenhum estudo que tenha avaliado a atividade anti-*H. pylori* da *Fragaria vesca*, e da *Agrimonia eupatoria* L. em meio sólido. No entanto existem vários estudos com outros extratos de plantas que demonstram o efeito inibitório desses extratos *in vitro*, avaliado pelo método de difusão em disco, sobre o *Helicobacter pylori* (Nariman et al., 2004; Ndip et al., 2007; Nostro et al., 2005; Souza, 2008; Wang e Huang, 2005;).

2. Determinação da concentração mínima inibitória

Uma vez que os extratos de plantas medicinais utilizados neste estudo apresentaram atividade anti-*H. pylori* para todos os isolados estudados foram escolhidos aleatoriamente 5 isolados para a determinação da concentração mínima inibitória.

Após incubação da placa de 96 poços (Figura 26) a absorvância foi lida a 600nm em leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK) e os resultados representados nos gráficos 26 e 27.

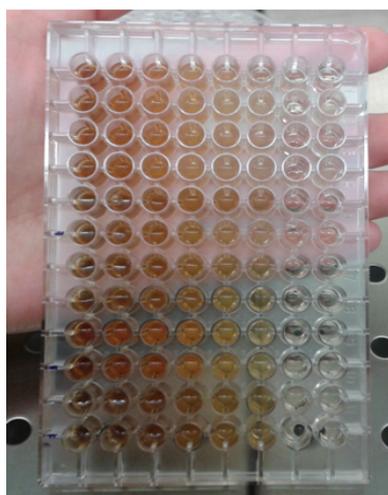


Figura 26: Determinação das CMI's dos extratos AgC e FV nos isolados, 17, 37, 128, 141, 160 de *H. pylori*.

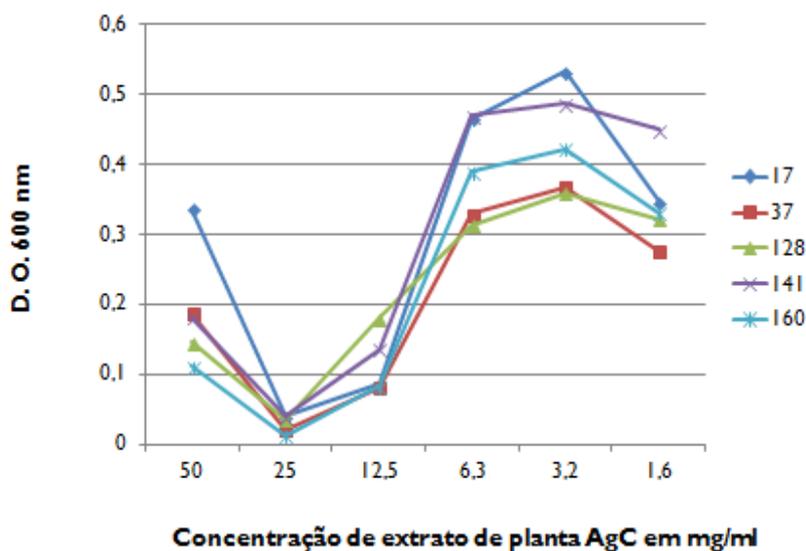


Figura 27: Efeito de extrato de planta AgC no crescimento em meio líquido dos isolados 17, 37, 128, 141 e 160 de *H. pylori*.

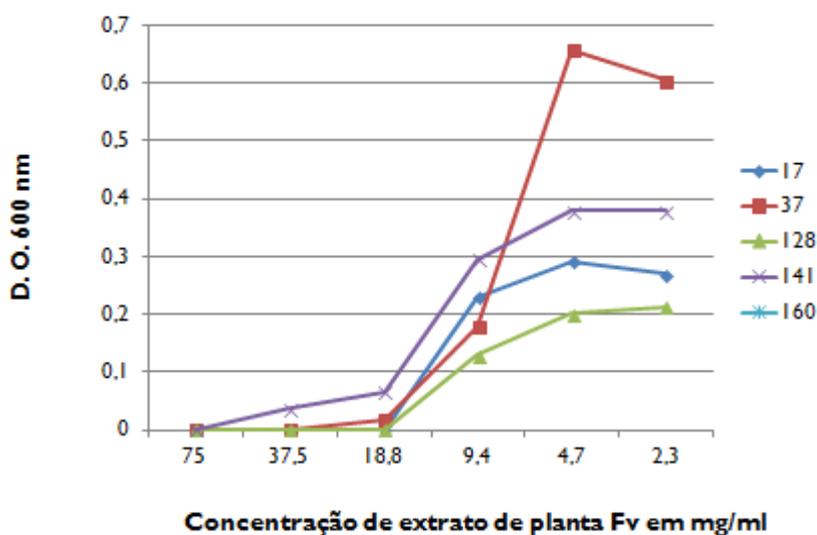


Figura 28: Efeito de extrato de planta Fv no crescimento em meio líquido dos isolados 17, 37, 128, 141 e 160 de *H. pylori*.

Analisando os gráficos anteriores verifica-se que a CMI para todos os isolados estudados para o extracto AgC, corresponde à concentração 25 mg/ml, e para o extrato Fv a concentração mínima inibitória corresponde à concentração 18,8 mg/ml.

As CMI obtidas para os extratos AgC e Fv estão de acordo com os resultados do método de difusão em disco, onde se tinha obtido um maior efeito inibitório com o extrato Fv. Como o extrato Fv é mais ativo, então é necessária uma menor concentração para inibir o crescimento visível de *H. pylori*, relativamente ao extracto AgC.

Os resultados obtidos com o extracto AgC foram um pouco surpreendentes, uma vez que com a maior concentração de extrato ensaiada não se obteve inibição do crescimento visível. A inibição total de crescimento visível foi obtida com a segunda concentração estudada. A explicação para este resultado não é clara, no entanto como os extratos de plantas são matrizes biológicas muito complexas, alguns constituintes poderão, quando presentes em determinadas concentrações, terem um efeito antagónico relativamente a outros constituintes.

O aumento da resistência do *H. pylori* aos antibióticos tem motivado uma forte investigação focada em novos agentes com diferentes mecanismos de acção. Uma grande variedade de extratos de plantas medicinais têm sido testados para avaliar o seu potencial efeito anti-*H. pylori*. Alguns autores avaliaram a atividade anti-*H. pylori* de extratos de plantas determinando as respectivas CMI's (Castillo Juárez et al., 2009; Nariman et al., 2004; Ndip et al., 2007; Nostro, 2008; Wang e Huang, 2005; Yesilada et al., 1999; Zaidi et al, 2009).

A *Agrimonia eupatoria L* é uma planta medicinal muito utilizada na medicina tradicional, para o tratamento de várias patologias, nomeadamente patologias gastrintestinais. A atividade anti-*H. pylori* da *Agrimonia eupatoria L* observada no nosso estudo, está de acordo com os resultados obtidos por Cwikla et al., 2010. Para além deste efeito anti-*H. pylori*, Correia et al., 2007 mostraram que o extrato da *Agrimonia eupatoria L* possui atividade anti-inflamatória e Ivanova et al., 2013 realçaram os efeitos benéficos do consumo de chá preparado a partir da *Agrimonia eupatoria L*, no estado oxidativo e inflamatório de adultos saudáveis. Estas propriedades anti-inflamatórias poderão ser extremamente benéficas no contexto da infecção por *H. pylori*.

Propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias também têm sido associadas à *Fragaria vesca* (Kanodia et al., 2009 e Nesterova et al., 2009) e de forma semelhante à *Agrimonia eupatoria L*, a utilização desta planta medicinal poderá também contribuir para uma melhoria da infecção por *H. pylori*.

CONCLUSÃO

As estirpes de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 e *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 utilizadas neste estudo não apresentam atividade anti-*H. pylori in vitro*. Apesar disso, estes resultados não excluem a possibilidade de estas estirpes poderem ter efeitos benéficos no contexto da infecção por *H. pylori*.

A avaliação da atividade anti-*H. pylori* dos extratos de plantas medicinais *Fragaria vesca* e *Agrimonia eupatoria* L, permitiu concluir que estes extratos possuem atividade anti-*H. pylori in vitro*, verificando-se um maior efeito inibitório com a *Fragaria vesca*. A atividade antibacteriana obtida com a *Agrimonia eupatoria* L. está de acordo com resultados anteriores descritos por Cwikla et al., 2010. Estes resultados apoiam o que está descrito na literatura acerca do efeito anti-*H. pylori* de vários extratos de plantas medicinais.

Os extratos utilizados neste estudo têm vários efeitos benéficos para a saúde humana, nomeadamente efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. A sua atividade anti-*H. pylori* associada aos seus efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes, faz deles um possível adjuvante terapêutico no tratamento da infeção por *H. pylori*. Estes dados são encorajadores ao desenvolvimento de novos esquemas terapêuticos, incluindo a fitoterapia como abordagem alternativa para o tratamento a infeção por *H. pylori*. No entanto, antes que isto se torne uma realidade, serão necessários mais estudos para investigar o efeito destes extratos quando combinados com os agentes antimicrobianos comumente utilizados na erradicação do *H. pylori*. Para além disso, deverão ser realizados estudos citotóxicos para avaliar se as concentrações para as quais estes extratos apresentam atividade anti-*Helicobacter* não são prejudiciais para as células epiteliais do tracto gastrintestinal.

As plantas são seres vivos muito complexos, capazes de fornecer inúmeros benefícios à saúde, sendo cada vez mais são procuradas como terapias alternativas para o tratamento de todo o tipo de patologias.

BIBLIOGRAFIA

AL-SULAMI, A. [et.al] (2008) - Primary isolation and detection of *Helicobacter pylori* from dyspeptic patients: a simple, rapid method. "Eastern Mediterranean Health Journal", 14 (2008) 269–276.

ÁLVARES, M. M. D. [et.al] (2006) - Características da gastrite crônica associada a *Helicobacter pylori*: aspectos topográficos, doenças associadas e correlação com o status cagA. "J Bras Patol Med Lab" 42 (2006) 51–59.

BADARÓ, A. C. L. [et.al] (2008) - Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde. "Revista Digital de Nutrição" 2 (2008) 1-29.

BARYSHNIKOVA, N. V. (2012) - *Helicobacter pylori*-associated gastroenterological diseases: genetic features and probiotic treatment. "Beneficial Microbes" 3 (2012) 157–161.

BRITTON, R. A.; VERSALOVIC, J. (2008) - Probiotics and Gastrointestinal Infections. "Hindawi Publishing Corporation" (2008) 1–10.

CAETANO, N. [et.al] (2002) - Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. "Revista Brasileira de Farmacognosia" 12 (2002) 132–135.

CASTILLO-JUÁREZ, I. [et.al] (2009) - Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. "Journal of Ethnopharmacology" 122 (2009) 402–405.

CHEN, X. [et.al] (2012) - Antagonistic Activities of Lactobacilli against *Helicobacter pylori* Growth and Infection in Human Gastric Epithelial Cells. "Journal of Food Science" 71 (2012) 9–14.

CHENOLL, E. [et.al] (2011)- Novel Probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 Strain Active against the Pathogenic Bacterium *Helicobacter pylori*. "Applied and Environmental Microbiology" 77 (2011) 1335–1343.

CORREIA, H. S. [et.al] (2007) - The activity of an extract and fraction of *Agrimonia eupatoria* L. against reactive species. "BioFactors" 29 (2007) 91–104.

COSTA, E. dos S.; VARAVALLO, M. A. (2011) - Probióticos e Prebióticos: Relações com a imunidade e promoção da saúde. "Revista Científica do ITPAC" 4 (2011) 4–11.

CULLIGAN, E. P. [et.al] (2009) - Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. "Gut Pathogens" 1 (2009) 1–12.

CWIKLA, C. [et.al] (2010) - Investigations into the Antibacterial Activities of Phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. "PHYTOTHERAPY RESEARCH" 24 (2010) 649–656.

DENIPOTE, F. G. [et.al] (2010) - Probióticos e Prebióticos na atenção primária ao câncer de colon. "Arq Gastroenterol" 47 (2010) 93–98.

- FABRY, W. [et.al] (1996) - Activity of East African Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. "Chemotherapy" 42 (1996) 315–317.
- FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. (2004) - Probiotics and the Management of Inflammatory Bowel Disease. "BASIC SCIENCE ON THE CUTTING EDGE" 10 (2004) 286–299.
- FERREIRA, L. I. D. S. (2006) - Diagnóstico Laboratorial da Infecção por *Helicobacter pylori*. Monografia. Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, Porto. (2006) 73pp.
- FRANCESCHI, F. [et.al] (2007) - Role of probiotics in patients with *Helicobacter pylori* infection. "Helicobacter 2007" 12 (2007) 59–63.
- FULLER, R. (1989) - Probiotics in man and animals. "Journal of Applied Bacteriology" 66 (1989) 365–378.
- FUNATOGAWA, K. [et.al] (2004) - Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins derived from Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. "Microbiol. Immunol." 48 (2004) 251-261.
- GILL, H. S. (2003) - Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. "Clinical Gastroenterology" 17 (2003) 755–773.
- GODOY, A. P. O. [et.al] (2007) - Análise das impressões digitais de DNA e de fatores de virulência de linhagens de *Helicobacter pylori*. "Arq Gastroenterol" 44 (2007) 1–6.
- GOTTELAND, M. [et.al] (2006) - Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? "Alimentary Pharmacology & Therapeutics" 23 (2006) 1077–1086.
- GRANATO, D. [et.al] (2010) - Probiotic Dairy Products as Functional Foods. "Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety" 9 (2010) 455–470.
- HAJELA, N. [et.al] (2012) - Health impact of probiotics - vision and opportunities. "Gut Pathogens" 4 (2012) 1–6.
- HOLANDA, L. B. [et.al] (2008) - Conhecimento sobre probióticos entre estudantes de uma instituição de ensino superior. "Revista Acadêmica Digital do Grupo POLIS Educacional" 5 (2008) 1–15.
- IANNITTI, T.; Palmieri, B. (2010) - Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. "Clinical Nutrition" 29 (2010) 701–725.
- IVANOVA, D. [et.al] (2013) - Agrimonia eupatoria tea consumption in relation to makers of inflammation, oxidative status and lipid metabolism in healthy subjects. "Arch Physiol Biochem" 119 (2013) 32–37.
- KANODIA, L. [et.al] (2009) - Effect of fruit extract os *Fragaria vesca* L. on experimentally induced inflammatory bowel disease in albino rats. "Indian Journal of Pharmacology" 43 (2009) 18–21.

- KUSTERS, J. G. [et.al] (2006) - Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. "Clinical Microbiology Reviews" 19 (2006) 449–490.
- KWON, D. H. [et.al] (2000) - *Helicobacter pylori* Tetracycline-Resistant Clinical Isolates of Isolation and Characterization of. "Antimicrobial Agents and Chemotherapy" 44 (2000) 3202–3205.
- LADEIRA, M. S. P. [et.al] (2003) - Biopatologia do *Helicobacter pylori*. "Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial" 39 (2003) 335–342.
- LESBROS-PANTOFLICKOVA, D. [et.al] (2007) - *Helicobacter pylori* and Probiotics. "The Journal of Nutrition" (2007) 812–818.
- LIN, Y. T. [et.al] (2005) - Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. "Process Biochemistry" 40 (2005) 2059–2065.
- LIONETTI, E. [et.al] (2010) - Role of Probiotics in Pediatric Patients with *Helicobacter pylori* Infection: A Comprehensive Review of the Literature. "Blackwell Publishing Ltd, *Helicobacter*" 15 (2010) 79–87.
- MA, F. [et.al] (2010) - Screening test for anti-*Helicobacter pylori* activity of traditional Chinese herbal medicines. "World Journal of Gastroenterology" 16 (2010) 5629–5634.
- MALFERTHEINER, P. [et.al] (2006) - Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. "GUT" 56 (2006) 772–781.
- MALFERTHEINER, P. [et.al] (2012) - Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. "GUT" 61 (2012) 646–664.
- MARAIS, A. [et.al] (1999) - Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. "Microbiology and Molecular Biology Reviews" 63 (1999) 642–674.
- MARTINI, S. [et.al] (2009) - Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. "International Journal of Antimicrobial Agents" 34 (2009) 50–59.
- MATSUSHIMA, M.; TAKAGI, A. (2012) - "Is it effective?" to "How to use it?": the era has changed in probiotics and functional food products against *Helicobacter pylori* infection. "Journal of Gastroenterology and Hepatology" 27 (2012) 888–892.
- MEDEIROS, J. A. da S. [et.al] (2011) - Evaluation of *Helicobacter pylori* eradication by triple therapy plus *Lactobacillus acidophilus* compared to triple therapy alone. "Eur J Clin Microbiol Infect Dis" 30 (2011) 555–559.
- MÉGRAUD, F.; LEHOURS, P. (2007) - *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. "Clinical Microbiology Reviews" 20 (2007) 280–322.
- MENDES, A. (2009) - O uso de Probióticos na Saúde Humana. Monografia. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação - Universidade do Porto, Porto. (2009) 49pp.

- MICHELIN, D. C. [et.al] (2005) - Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. "Revista Brasileira de Farmacognosia" 15 (2005) 316–320.
- MIDOLO, P. D. [et.al] (1995) - In vitro inhibition of Helicobacter pylori NCTC 11367 by organic acids and lactic acid bacteria. "Journal of Applied Microbiology" 79 (1995) 475–479.
- MISHRA, S. (2012) - Is Helicobacter pylori good or bad? "Eur J Clin Microbiol Infect Dis" (2012) 1773–1779.
- MORAES, M. M. C.; SILVA, G. A. P. da S. (2003) - Fatores de risco para infecção pelo Helicobacter pylori em crianças. "Jornal de Pediatria" 79 (2003) 21–8.
- MYLLYLUOMA, E. [et.al] (2008) - Effects of Multispecies Probiotic Combination on Helicobacter pylori Infection In Vitro. "Clinical and Vaccine Immunology" 15 (2008) 1472–1482.
- MYLLYLUOMA, E. [et.al] (2005) - Probiotic supplementation improves tolerance to Helicobacter pylori eradication therapy – a placebo-controlled, double-blind randomized pilot study. "Aliment Pharmacol Ther" 21 (2005) 1263–1272.
- NARIMAN, F. [et.al] (2004) - Anti-Helicobacter pylori Activities of Six Iranian Plants. "Gastroenterology & Hepatology" 9 (2004) 146–151.
- NDIP, R. N. [et.al] (2007) - In vitro anti-Helicobacter pylori activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. "Journal of Ethnopharmacology" 114 (2007) 452–457.
- NESTEROVA, L. [et.al] (2009) - Evaluation of anti-inflammatory activity of extracts from Siberian plants. "Akad Med Nauk" 11 (2009) 30 – 34.
- NG, S. C. [et.al] (2009) - Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. "Inflamm Bowel Dis" 15 (2009) 300–310.
- NILSSON, H. O. (2000) - Identification of Helicobacter Other and Helicobacter pylori Species by PCR, Hybridization, and Partial DNA Sequencing in Human Liver Samples from Patients with Primary Sclerosing Cholangitis or Primary Biliary Cirrhosis. "Journal of Clinical Microbiology" 38 (2000) 1072–1076.
- NOSTRO, A. [et.al] (2005) - Antibacterial Effect of Plant Extracts against Helicobacter pylori. "Phytotherapy Research" 19 (2005) 198–202.
- O'CONNOR, A. [et.al] (2011) - Treatment of Helicobacter pylori Infection 2011. "Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter" 16 (2011) 53–58.
- O'MAHONY, R. (2005) - Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against Helicobacter pylori. "World Journal of Gastroenterology" 11 (2005) 7499–7507.
- OLIVEIRA, C. E. C. [et.al] (2007) - Avaliação do efeito antimicrobiano dos extratos de alhom gengibre e orégano em culturas de Helicobacter pylori. Faculdade Assis Gurgacz. (2007) 12pp.

- OLIVEIRA, C. P. de; SILVA, J. A. da. (2011) - Leite Fermentado Probiótico e suas implicações na Saúde. "Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável" 6 (2011) 25–31.
- PARSONNET, J. (1991) - Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. "The New England Journal of Medicine" 325 (1991) 1127–1131.
- PARSONNET, J. (1994) - Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. "The New England Journal of Medicine" 330 (1994) 1267–1271.
- PENA, J. [et.al] (2005) - Probiotic Lactobacillus spp. diminish Helicobacter hepaticus-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. "Infect Immun" 73 (2005) 912–920.
- PESSINI, G. L. (2003) - Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. "Revista Brasileira de Farmacognosia" 13 (2003) 21–24.
- PICCOLOMINI, R. (1997) - Optimal combination of media for primary isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens. "Journal of Clinical Microbiology" 35 (1997) 1541–1544.
- RAIZEL, R. (2011) - Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. "Revista Ciência & Saúde, Porto Alegre" 4 (2011) 66–74.
- RITCHIE, M. L.; ROMANUK, T. N. (2012) - A Meta-Analysis of Probiotic Efficacy for Gastrointestinal Diseases. "PLoS ONE" 7 (2012) 1–11.
- ROKKA, S. (2008) - Effect of specific colostrum antibodies and selected lactobacilli on the adhesion of Helicobacter pylori on AGS cells and the Helicobacter-induced IL-8 production. "Scand J Immunol" 68 (2008) 280–286.
- ROSENSTIEL, P.; STANGE, E. F. (2010) - Probiotics and Intestinal Diseases. "Annals of Nutrition & Metabolism" 57 (2010) 27–28.
- SAARELA, M. [et.al] (2000) - Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. "Journal of Biotechnology" 84 (2000) 197–215.
- SAKAMOTO, I. [et.al] (2001) - Suppressive effect of Lactobacillus gasseri OLL 2716 (LG21) on Helicobacter pylori infection in humans. "Journal of Antimicrobial Chemotherapy" 47 (2001) 709–710.
- SANDERS, M. E. [et.al] (2010) - Safety assessment of probiotics for human use. "Gut Microbes" 1 (2010) 164–185.
- SANTOS, A. C. A. L. (2010) - Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal. Monografia. Instituto de Nutrição. Universidade do estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. (2010) 39pp.
- SCHILLING, C. H. [et.al] (2002) - Genome-Scale Metabolic Model of Helicobacter pylori 26695. "Journal of Bacteriology" 184 (2002) 4582–4593.

SGOURAS, D. [et.al] (2004) - In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. "Applied and Environmental Microbiology" 70 (2004) 518–526.

SGOURAS, D.N. [et.al] (2005) - *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. "Clin Diagn Lab Immunol" 12 (2005) 1378–1386.

SHEU, B.-S. [et.al] (2002) - Impact of supplement with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium* containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. "Aliment Pharmacol Ther" 16 (2002) 1669–1675.

SIQUEIRA, J. S. [et.al] (2007) - Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* Revisão. "RBAC" 39 (2007) 9–13.

SOUZA, M. D. C. (2008) - ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori* IN VITRO DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO MATO-GROSSENSE E ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori* IN VIVO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA (DCM 2) DE *Calophyllum brasiliense* CAMB. (Clusiaceae). Dissertação. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. (2008) 122pp.

THOMAS, C. M.; VERSALOVIC, J. (2010) - Probiotics-host communication Modulation of signaling pathways in the intestine. "Gut Microbes" 1 (2010) 148–163.

THOMAZINI, C. M. [et.al] (2006) - Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas *cagA* e *vacA* em pacientes com câncer gástrico. "J Bras Patol Med Lab" 42 (2006) 25–30.

THOMPSON, S. A.; BLASER, M. J. (1995) - Isolation of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. "Infection and Immunity" 63 (1995) 2185–2193.

TOLONE, S. [et.al] (2012) - Evaluation of *Helicobacter Pylori* eradication in pediatric patients by triple therapy plus lactoferrin and probiotics compared to triple therapy alone. "Italian Journal of Pediatrics" 38 (2012) 1–12.

VANDENPLAS, Y. [et.al] (2011) - Probióticos e Prebióticos na prevenção e tratamento de doenças em lactentes e crianças. "Jornal de Pediatria" 87 (2011) 292–300.

VARAVALLO, M. A. [et.al] (2008) - Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. "Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina" 29 (2008) 83–104.

VERNA, E. C.; LUCAK, S. (2010) - Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? "Therapeutic Advances in Gastroenterology" 3 (2010) 307–319.

VIEIRA, L. Q. (2007) - Uso de probióticos na prevenção e tratamento de infecções e inflamações gastrintestinais. "Rev Med Minas Gerais" 17 (2007) 45–53.

VÍTOR, J. M. B.; VALE, F. F. (2011) - Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytotherapy. "Immunology and Medical Microbiology" 63 (2011) 153–164.

- WALLACE, T. C. [et.al] (2011) - Human gut microbiota and its relationship to health and disease. "Nutrition in Clinical Care" 69 (2011) 392–403.
- WALSH, M. C. [et.al] (2008) - Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. "Federation of European Microbiological Societies" 64 (2008) 317–327.
- WANG, Y. C.; HUANG, T. L. (2005) - Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. "Immunology and Medical Microbiology" 43 (2005) 295–300.
- WILHELM, S. M. (2011) - Treating Bugs with Bugs: The Role of Probiotics as Adjunctive Therapy for *Helicobacter pylori*. "The Annals of Pharmacotherapy" 45 (2011) 960–966.
- WILSON, K. T.; CRABTREE, J. E. (2007) - Immunology of *Helicobacter pylori*: Insights Into the Failure of the Immune Response and Perspectives on Vaccine Studies. "Reviews in basic and clinical Gastroenterology" 133 (2007) 288–308.
- WNUK, M. (2010) - *Helicobacter pylori* *cagA* Gene Polymorphism Affects the Total Antioxidant Capacity of Human Saliva. "Blackwell Publishing Ltd, *Helicobacter*" 15 (2010) 53–57.
- WOLVERS, D. [et.al] (2010) - Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Prevention and Management of Infections by Probiotics. "The Journal of Nutrition" (2010) 698–712.
- WONG, B. C. Y. [et.al] (2004) - *Helicobacter pylori* Eradication to Prevent Gastric Cancer in a High-Risk Regions of China. "American Medical Association" 291 (2004) 184–194.
- YAR, B. (2010) - Efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy. "Turk J Gastroenterol" 21 (2010) 212–217.
- YESILADA, E. [et.al] (1999) - Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. "Journal of Ethnopharmacology" 66 (1999) 289–293.
- YOON, H. (2010) - Effects of multistrain probiotic-containing yogurt on second-line triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. "Journal of Gastroenterology and Hepatology" 26 (2010) 44–48.
- YOON, S. S.; SUN, J. (2011) - Probiotics, Nuclear Receptor Signaling, and Anti-Inflammatory Pathways. "Gastroenterology Research and Practice" (2011) 1–16.
- ZAIDI, S. F. H. [et.al] (2009) - Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. "Journal of Ethnopharmacology" 121 (2009) 286–291.

ANEXOS

I. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho, foram comprados, previamente preparados, à empresa bioMérieux.

I.1. Gelose Columbia

A gelose Columbia foi idealizada por Ellner et al. Este meio com adição de peptona especial suporta o crescimento rápido e abundante tanto de organismos fastidiosos como não fastidiosos. Este meio também estimula a morfologia típica da colónia, a produção de pigmento e as reações hemolíticas são melhores definidas. Este meio contém uma mistura de peptonas, o que proporciona uma mistura de compostos azotados e de aminoácidos para aumentar o crescimento. É usado para a preparação de diversos meios de cultura especiais, pode ser suplementado com 5 - 10% de sangue de carneiro, coelho, ou de cavalo para ser usado no isolamento, cultura e determinação de reações hemolíticas de microrganismos patogénicos exigentes.

O *H. pylori* apesar de ser uma bactéria de difícil crescimento, cresce neste meio sendo fácil o reconhecimento das colónias à superfície do meio. As colónias aparecem não coalescentes e translúcidas.



Figura 29: Aspecto das colónias de *H. pylori* em gelose Columbia após incubação em microaerofilia, a 37°C e durante 72 horas.

I.2. Gelose *pylori*

A Gelose *pylori* é um meio seletivo utilizado no isolamento de *Helicobacter pylori* a partir de biópsias gástricas.

As peptonas fornecem azoto, carbono, aminoácidos e vitaminas. O amido fornece aminoácidos e vitaminas. A suplementação com Vitalex fornece fatores de crescimento necessários ao crescimento de microrganismos exigentes. O trimetoprim interfere com a síntese de ácidos nucleicos e proteínas e tem um efeito bacteriostático em muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas. A vancomicina inibe a de parede da célula de bactérias gram-negativas. Sangue de cavalo lisado é utilizado como suplemento de crescimento.

1.3. Caldo cérebro de coração

O caldo cérebro de coração é um meio nutritivo e bem tamponado que permite o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, mesmo dos mais exigentes. A adição de 0.1% de gelose melhora o crescimento de microaerofílicos e microrganismos anaeróbicos. Dado o seu elevado teor nutritivo e a sua versatilidade, pode ser usado como base de outros meios de grande importância em microbiologia.

1.4. Gelose *Mueller-Hinton*

A gelose *Mueller-Hinton* é um meio nutritivo adequado para o crescimento de numerosos microrganismos. Assim como em forma de agar, o caldo *Mueller-Hinton* mostra uma boa reprodutibilidade dos resultados. Pode ser suplementado para o crescimento de bactérias exigentes.

1.5. Gelose *Man-Rogosa-Sharpe*

A gelose *Man-Rogosa-Sharpe* é baseada na formulação de *Man*, *Rogosa* e *Sharpe* e é usada para isolamento e contagem de *Lactobacillus* em carne e seus derivados. Suporta bom crescimento de todos os *Lactobacillus* incluindo linhagens de crescimento lento. O meio torna-se seletivo pelo ajuste de pH o que favorece o crescimento de *Lactobacillus* tolerantes a pH baixo.

1.6. Meio “*Reinforced Clostridium*”

O meio “*Reinforced Clostridium*” (RCM), é um meio semi-sólido, formulado por *Hirsch* e *Grinstead*. É um meio de enriquecimento não seletivo, onde crescem várias bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas quando incubadas anaerobicamente. Este meio é usado para a detecção de clostrídios, bifidobactérias e outros anaeróbios, em alimentos e amostras fecais.

2. Teste da urease

O *H. pylori* possui a enzima urease, que na presença de ureia a hidrolisa dando origem a amoníaco e CO_2 , criando um ambiente neutro à sua volta o que favorece a sua sobrevivência.

O teste da urease foi usado como confirmação após crescimento das bactérias em gelose Columbia. Colocou-se num *eppendorf* uma pequena quantidade de meio ureia indol e com uma ansa raspou-se uma porção de bactérias do meio de cultura e ressuspendeu-se no meio ureia indol. Quando está presente *H. pylori* o meio ureia indol que tinha uma cor laranja passou a cor-de-rosa, após alguns minutos.