



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TIALA KELLY MARTINS

**ATIVIDADE *in vitro* DO EXTRATO DE *Dysidea avara*
CONTRA *Helicobacter pylori***

Londrina
2018

TIALA KELLY MARTINS

**ATIVIDADE *in vitro* DO EXTRATO DE *Dysidea avara*
CONTRA *Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Martins , Tiala Kelly .

ATIVIDADE *in vitro* DO EXTRATO DE *Dysidea avara* CONTRA *Helicobacter pylori* / Tiala Kelly Martins . - Londrina, 2018.
60 f. : il.

Orientador: Celso Vataru Nakamura .

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. *Helicobacter pylori*; Infecção; Tratamento; Esponjas marinhas; *Dysidea avara* - Tese.
I. Nakamura , Celso Vataru . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

TIALA KELLY MARTINS

**ATIVIDADE *in vitro* DO EXTRATO DE *Dysidea avara*
CONTRA *Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Profa. Dra. Eliana Harue Endo
Universidade Paranaense – UNIPAR

Maringá, 06 de abril de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Tânia e Luís, por todo apoio
e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me conceder saúde e sabedoria para concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pelo auxílio, orientação, paciência e oportunidade de trabalhar junto ao seu laboratório e contribuir, desse modo, para o meu desenvolvimento intelectual e pessoal.

À Profa. Dra. Eliana Harue Endo pela amizade, disponibilidade e colaboração desde o início para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho por acompanhar a minha trajetória até o final emitindo sempre palavras de incentivo e otimismo.

À Karina Miyuki Retamiro pela amizade, companheirismo, apoio e acompanhamento com os experimentos e na elaboração do trabalho escrito desde o início até sua conclusão.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia que contribuíram para a minha formação no mestrado e aos colegas de turma pelo companheirismo e apoio, principalmente durante as disciplinas.

Aos colegas do Bloco I-90, técnicas, por todo o auxílio durante a elaboração deste estudo em especial à Juliana Cristina Castro pela amizade e apoio com o trabalho escrito.

Aos colegas e professores do Bloco B-08 pela amizade, incentivo, ajuda com os experimentos, dicas, companheirismo, paciência e também pelos momentos de lazer. Todos vocês foram fundamentais para a elaboração deste estudo.

A CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Agradeço de forma especial aos meus pais Tânia e Luís por todo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, sempre me motivando a crescer, assim como meus irmãos Murilo e Rômulo, demais familiares e amigos próximos. Vocês foram fundamentais para a minha chegada até aqui.

Enfim, agradeço de forma geral a todos que fizeram parte de minha formação.

Muito obrigada!

Para ser grande, sê inteiro: nada
teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
brilha, porque alta vive.

(Ricardo Reis)

MARTINS, Tiala Kelly. **Atividade *in vitro* do extrato de *Dysidea avara* contra *Helicobacter pylori***. 2018. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Helicobacter pylori, principal agente etiológico de gastrites, úlceras pépticas e adenocarcinoma gástrico, coloniza o estômago humano e está presente em metade da população global. A erradicação desta bactéria é dificultada pela resistência a antibioticoterapia clássica. Uma alternativa de tratamento com substâncias naturais como as esponjas marinhas que são ricas em metabólitos secundários e podem apresentar metabólitos inéditos e complexos variando o local, estação e profundidade da coleta. A espécie *Dysidea avara* já comprovou forte atividade antifúngica, antiprotozoária e antibacteriana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* do extrato da esponja marinha *D. avara* contra *H. pylori*. Inicialmente, foi analisado a Concentração Mínima Inibitória (CIM) deste extrato frente à bactéria durante 72 h onde se obteve um valor de 125 µg/mL. A atividade bacteriostática foi comprovada através da curva do tempo de morte onde foram usados diferentes concentrações do extrato nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 h. A partir de 9 h de exposição houve uma diminuição ≥ 2 log em contagem de viáveis para as concentrações de CIM (125 µg/mL) e 2 x CIM (250 µg/mL). A combinação entre o extrato *Dysidea avara* e o antibiótico padrão claritromicina foi feito utilizando-se o ensaio “Checkerboard”. O Índice de concentração fracional inibitória (FICI) foi de 0,30, indicando sinergismo entre essas substâncias. A atividade antioxidante *in vitro* do extrato foi comprovada através de 3 métodos, DPPH, FRAP e Xantina oxidase. O extrato de *D. avara* demonstrou elevada capacidade antioxidante em todas as metodologias empregadas, onde exibiu potencial antioxidante equivalente ao padrão, quercetina, no FRAP ($10,44 \pm 0,37$ mM ET/g) e muito próximo ao da quercetina nas metodologias do DPPH e da XOD (IC_{50} $5,85 \pm 0,09$ µg/mL e $0,23 \pm 0,01$ µg/mL, respectivamente). Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas para a análise morfológica e ultraestrutural da bactéria após tratamento com diferentes concentrações no tempo de 48 h e apontaram consideráveis mudanças em relação a morfologia e estrutura bacteriana bem como a diminuição da eletrodensidade celular. Em conclusão, obteve-se um resultado efetivo de atividade *in vitro* do extrato *D. avara* frente ao *H. pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; tratamento; esponjas marinhas; *Dysidea avara*.

MARTINS, Tiala Kelly. *In vitro* activity of the extract of *Dysidea avara* against *Helicobacter pylori*. 2018. 60 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Helicobacter pylori, main etiological agent of gastritis, peptic ulcers and gastric adenocarcinoma, colonizes human stomach and is present in half of the global population. The eradication of this bacterium is difficult by resistance to classical antibiotic therapy. An alternative treatment is the use of natural substances such as marine sponges that are rich in secondary metabolites and may present new and complex metabolites varying the site, season and depth of collection. The species *Dysidea avara* has already demonstrated strong antifungal, antiprotozoal and antibacterial activity. The aim of the present work was to evaluate an *in vitro* activity of *D. avara* marine sponge extract against *H. pylori*. Initially, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of this extract against bacteria were analyzed for 72 h obtained a value of 125 µg/mL. The bacteriostatic activity was confirmed through the Time-kill curve assay where different concentrations of the extract were used at times 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h. From 9 h of exposure there was a ≥ 2 log decrease in viable counts for MIC (125 µg/mL) and 2 x MIC (250 µg/mL). For combination of the *Dysidea avara* extract with standard antibiotic clarithromycin was used the "Checkerboard" assay. The Inhibitory Fraction Concentration Index (FICI) was 0.30, indicating synergism between these substances. The *in vitro* antioxidant activity of the extract was confirmed by 3 methods, DPPH, FRAP and Xanthine oxidase. The extract of *Dysidea avara* showed capacity in all the methodologies used, where it exhibited antioxidant potential equivalent to the standard, quercetin, in FRAP (10.44 ± 0.37 mM ET/g) and upcoming to that of quercetin in the XOD DPPH method (IC 50 5.85 ± 0.09 µg/mL and 0.23 ± 0.01 µg/mL, respectively). Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) were performed for the morphological and ultrastructural analysis of the bacteria after treatment with different concentrations in the time of 48 h and indicated considerable changes in relation to the morphology and bacterial structure as well as the reduction of cellular electro density. In conclusion, an effective *in vitro* activity of *D. avara* extract against *H. pylori* was observed.

Key words: *Helicobacter pylori*; treatment; marine sponges; *Dysidea avara*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	<i>HELICOBACTER PYLORI</i>	16
3.1.1	Características Gerais De <i>Helicobacter Pylori</i>	16
3.1.2	Fatores De Virulência	17
3.1.2.1	Ilha de patogenicidade <i>cag</i> – <i>PAI</i> e gene <i>cagA</i>	17
3.1.2.2	Gene <i>vacA</i>	18
3.1.2.3	Fatores de aderência.....	19
3.1.2.4	Proteína <i>OipA</i>	20
3.1.2.5	Enzima urease.....	21
3.1.2.6	Flagelos.....	22
3.1.3	Epidemiologia	22
3.1.3.1	Prevalência.....	22
3.1.3.2	Vias de transmissão	23
3.1.3.3	Fatores de risco.....	25
3.1.4	Patogênese	25
3.1.4.1	Gastrite.....	26
3.1.4.2	Úlcera péptica.....	27
3.1.4.3	Câncer gástrico	27
3.1.4.4	Linfoma de tecido linfóide associado a mucosa (MALT)	28
3.1.5	Tratamento	29
3.2	ESPONJAS MARINHAS	31
3.2.1	Características Gerais Das Esponjas Marinhas	31
3.2.2	Gênero <i>Dysidea</i> sp.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	ARTIGO	34

5	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram-negativa, microaerofílica, que coloniza a mucosa gástrica e é o agente etiológico desencadeador de gastrites, úlceras pépticas e câncer gástrico (DUNN et al., 1997; BLASER; BERG, 2001). Tendo o ser humano como principal reservatório, pode apresentar caráter assintomático e regredir espontaneamente, não desenvolvendo nenhum tipo de infecção. Porém, o aparecimento de doenças associadas a essa bactéria são dependentes de fatores genéticos e raciais, além de geográficos e estilo de vida (MCCALLION et al., 1996). A predominância da infecção se dá pela virulência das cepas, ou seja, cepas que tem expressado o *cag* – *PAI* e são *cagA*+ (positivas) apresentam-se muito mais virulentas em relação aquelas que não o expressam e são *cagA*- (negativas). O gene *vacA* também é determinante para esse grau de virulência já que cepas *vacA s1m1* são as que levam ao câncer gástrico (CENSINI et al., 1996; ATHERTON et al., 1997).

A prevalência de *H. pylori* é global, ou seja, encontra-se presente em todas as regiões do globo e acomete tanto indivíduos que vivem em países desenvolvidos como os que vivem nos países em desenvolvimento. Contudo, sua incidência é maior nos países em desenvolvimento, devido às más condições socioeconômicas e de higiene. Um terço das pessoas que vivem nos Estados Unidos e na Europa Ocidental, por exemplo, abrigam essa bactéria, e esse número cresce no Continente Asiático. Países desenvolvidos como o Japão, apresentam cepas muito virulentas e, desse modo, a incidência de infecção e doenças como gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico são bem altos (HU et al., 2009).

Para iniciar a colonização de *H. pylori* e por fim, estabelecer uma patologia, faz – se necessário à ação dos fatores de aderência bem como a ação da enzima uréase junto ao epitélio gástrico. Fatores de aderência são, em sua maioria, proteínas da membrana externa conhecidos como BabA (blood group antigen-binding adhesion), SabA (sialic acid-binding adhesion) AlpA-B (adherence-associated lipoprotein A and B), HopZ (*H. pylori* outer membrane protein) e HpaA (*H. pylori* adhesion A) (ODENBREIT, 2005) que medeiam à ligação da bactéria ao epitélio gástrico e estabelecem a colonização, facilitam a persistência da infecção

além de liberarem outros fatores de virulência como *cagA* e *vacA* (PRINZ et al., 2001). A enzima urease, por sua vez, também é essencial para a colonização de *H. pylori*, pois convertendo a uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, em amônia e bicarbonato, cria um microambiente alcalino na mucosa gástrica e, desse modo, faz com que a bactéria se instale na mucosa promovendo a infecção (KRAKOWKA et al., 1991).

A busca por novos fármacos eficazes contra a infecção por *H. pylori*, bem como a inibição de sua adesão e inibição da enzima urease faz-se necessário devido às altas taxas de resistência aos antibióticos que compõe a terapia convencional, denominada de terapia tripla. Essa terapia é composta pelos antibióticos claritromicina, amoxicilina ou metronidazol e por um inibidor da bomba de próton. A alta taxa de resistência das cepas associadas a essa terapia dá-se, principalmente, a claritromicina (MALFERTHEINER et al., 2012; CHUAH et al., 2011). Essa terapia, muito utilizada em várias regiões do globo, apresenta uma resistência frente às cepas de *H. pylori* e é de caráter geograficamente variável sendo que quando ocorrem, substituições são necessárias, como a troca da claritromicina. Uma alternativa é a levofloxacina. Pode haver também a substituição desse tratamento por uma segunda linha, denominada de terapia quádrupla. Essa terapia inclui um inibidor da bomba de próton, tetraciclina, metronidazol e bismuto (GARZA-GONZÁLEZ et al., 2014).

Devido a essa infinidade de problemas relacionados à medicação já utilizada contra a infecção por *H. pylori*, a pesquisa de novos fármacos tem aumentado com o objetivo de superar a resistência, diminuir efeitos colaterais e promover a erradicação deste micro-organismo (WU et al., 2014). Diversos produtos naturais já foram testados para esse fim. Esponjas marinhas são uma forma de tratamento alternativa, promissora e nova. Descoberta por volta de 1950, com os achados da esponja *Tethia crypta*, essas esponjas apresentam esqueletos de carbono complexos e uma rica gama de propriedades (MEHBUB et al., 2014; SIMÕES et al., 2017). Atividades antibacterianas, antiprotozoário, antiviral e anti-psoríase entre outras, já foram relatadas na literatura (TURK et al., 2013; CARREIRA DE PAULA et al., 2015). Embora ainda haja uma dificuldade em estudar e isolar componentes das esponjas marinhas, diversos gêneros já foram catalogados. O gênero *Dysidea* sp. Onde contém a espécie *Dysidea avara* tem entre seus compostos, o avarol, composto com atividade antibacteriana, anti-inflamatória, anticancerígeno e anti-HIV.

O grande desafio das indústrias farmacêuticas que pesquisam e trabalham com esponjas marinhas, hoje, é o de isolar, entre seus componentes, quantidades suficientes de compostos para a produção de fármacos. Condições ecológicas influenciam diretamente essas esponjas e proporcionam uma variabilidade na composição química de uma mesma espécie. Desse modo, cada extrato ou composto isolado de uma determinada esponja poderá ser único (AKTAS et al., 2010; SIMÕES et al., 2017).

Nesse contexto, o estudo de novos fármacos para atuarem contra a infecção por *H. pylori* é de extrema importância para a contribuição da erradicação dessa bactéria em várias partes do mundo. Entender essa bactéria, seus fatores de virulência, o funcionamento da enzima urease e sua sobrevivência ao ambiente inóspito que é o estômago, são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais. O estudo da atividade do extrato da esponja marinha *D. avara* contra *H. pylori* pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos e, a partir desse extrato pode-se isolar compostos e aprofundar o estudo de atividade contra a infecção causada por essa bactéria, impedindo a sua colonização, garantindo a sua erradicação e, como consequência, diminuindo consideravelmente as patologias que a tem como agente etiológico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*H. pylori* “*in vitro*” do extrato da esponja marinha *D. avara*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a susceptibilidade antibacteriana através de ensaios de determinação da concentração mínima inibitória e curva do tempo de morte
- Pesquisar a atividade antibacteriana direta e seu efeito sinérgico em combinação com o antibiótico claritromicina, amoxicilina e o extrato de *D. avara*
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato *D. avara*
- Avaliar alterações morfológicas em *H. pylori* após o tratamento com o extrato de *D. avara*
- Avaliar alterações ultraestruturais em *H. pylori* após o tratamento com o extrato de *D. avara*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *HELICOBACTER PYLORI*

3.1.1 Características gerais de *Helicobacter pylori*

H. pylori foi descrito pela primeira vez em 1984, por dois pesquisadores australianos, Marshall e Warren, que confirmaram seus achados analisando 100 pacientes com queixas digestivas submetidas à gastroscopia (MARSHALL; WARREN, 1984). Inicialmente, essa bactéria foi classificada como *Campylobacter* sp, por ter sua estrutura semelhante as bactérias desse gênero e, mais tarde, foi reclassificada como um novo gênero, *Helicobacter* sp (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011). Isolado no estômago de humanos, podendo ser encontrado também em porcos e associada a doenças gastrointestinais, *H. pylori* pode ser o principal responsável por gastrites, úlceras duodenais e pépticas, adenocarcinoma gástrico e linfoma de células B do tecido linfoide associado à mucosa gástrica (MALT) (BLASER; BERG, 2001; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

É um bacilo Gram-negativo, importante representante da família *Helicobacteraceae*, mede aproximadamente 0,5 a 0,1 µm de largura e 3 a 5 µm de comprimento, móvel, não esporulado e microaerofílico. Cresce em condições ideais de temperatura, 35 °C a 37 °C apresenta-se como oxidase e catalase positivos e possui de 4 a 6 flagelos embainhados (DUNN et al., 1997; TRABULSI; ALTHERTUN, 2008). Morfologicamente, em culturas recentes, *H. pylori* tem uma forma bacilar ou espiralada podendo adquirir uma forma cocóide em culturas velhas, com mais de 5 dias (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

Localizado exclusivamente no epitélio gástrico e encontrado em maior densidade no antro estomacal, *H. pylori* distribui-se de maneira segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica (SALVADORI; LADEIRA; RODRIGUES, 2003). A produção de grande quantidade da enzima urease e a motilidade em “zigue – zague” são fatores cruciais para garantir sua sobrevivência no ambiente hostil dessa mucosa (NAKAMURA et al., 1998; WEEKS; SACHS, 2001).

A distribuição de *H. pylori* é universal e sua infecção é considerada uma das mais comuns no mundo (HU et al., 2009; MADIGAN et al., 2010). Dados da Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2002) o classificou como agente cancerígeno grau I, relacionando assim essa bactéria como uma das principais causas de adenocarcinoma gástrico. O potencial maligno de cada uma das cepas é definido pelos fatores de virulência. Um número grande desses fatores já foram bem reconhecidos e caracterizados em doenças associadas a essa bactéria (MADIGAN et al., 2010).

3.1.2 Fatores de virulência

H. pylori apresenta uma diversidade genotípica que codifica diferentes fatores de virulência. Assim, algumas cepas bacterianas são muito mais virulentas que outras, determinando, desse modo, o tipo de lesão no hospedeiro. Os genes associados à virulência e os mais estudados são os genes *cagA* e o *vacA*. No entanto, existem outros genes já estudados e que são, da mesma forma, de grande importância para a virulência desta bactéria (BLASER; BERG, 2001).

3.1.2.1 Ilha de patogenicidade *cag* – *PAI* e gene *cagA*

A ilha de patogenicidade *cag* – *PAI* (*Cytotoxin associated gene pathogenicity island* – *cag* – *PAI*) é um componente do genoma de *H. pylori*, apresenta-se como um segmento de DNA de 40 – kb e contém cerca de 31 genes. Desempenha um papel importante na patogênese dessa bactéria, mas não está expresso em todas as cepas (CENSINI et al., 1996; AKOPYANTS et al., 1998; WEN; MOSS, 2009). Aproximadamente 60% das cepas isoladas nos países ocidentais expressam o gene *cag* – *PAI*, enquanto que no leste asiático essa porcentagem aumenta para 90% (MIZUSHIMA et al., 2001).

Entre os genes integrantes dessa ilha destacam-se o gene *cagA* (*cytotoxin associated gene*) que codifica a proteína *cagA* e funciona como um marcador de patogenicidade. Cepas de *H. pylori* que contém esse gene são muito mais virulentos em relação as que não o contém sendo denominadas de cepas *cagA+* (SOZZI et al., 2005; BLASER; BERG, 2001). Existem também, genes homólogos aos de outras

bactérias os quais codificam o sistema de secreção do tipo IV e injetam moléculas efetoras dessa bactéria a célula hospedeira. Essas moléculas modulam vias do metabolismo da célula hospedeira incluindo a expressão de proto – oncogenes e, desse modo, pode-se dizer que *cag – PAI* está intimamente associada ao risco para desenvolvimento de câncer gástrico (CENSINI et al., 1996; WEN; MOSS, 2009).

Devido à alta virulência das cepas *cagA+*, estas são mais susceptíveis a intensas reações inflamatórias na mucosa gástrica humana devido a indução da síntese de interleucina – 8 (IL – 8). A IL – 8 por sua vez, é um forte quimioatraente de neutrófilos desenvolvendo, desse modo, a inflamação crônica dessa mucosa (CENSINI et al., 1996). O processo inflamatório envolve entre vários fatores, a reação de espécies reativas de oxigênio (EROs). No processo inflamatório gerado por *H. pylori* a produção de EROs é aumentada, tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (DAVIES, et. al., 1994). A produção excessiva de EROs causa lesões ao DNA celular induzindo à carcinogênese (DRAKE et. al., 1996). Além da carcinogênese induzida pela inflamação, gastrites agudas ou crônicas e úlceras pépticas também são geradas (SHARMA et al., 1995; CRABTREE et al., 1999).

3.1.2.2 Gene *vacA*

Outro importante fator de virulência é a toxina vacuolizante *vacA*. Codificada inicialmente pelo gene *vacA* como uma pré-prototoxina de aproximadamente 140 kDa, a proteína madura apresenta-se como um monômero que pode ser clivada em dois fragmentos: um N-terminal de 34 kDa e um C-terminal de 58 kDa. Esse gene diferentemente do gene *cag – PAI* é encontrada em todas as cepas de *H. pylori* (ILVER et al., 2004). Subunidades dessa toxina madura são lançadas pela bactéria no espaço extracelular podendo ser retidos na superfície bacteriana ou se agregar a complexos oligoméricos para a inserção em bicamadas lipídicas e formar canais seletivos de ânions (ILVER et al., 2004; COVER; BLANKE, 2005).

A toxina *vacA* pode expressar diferentes níveis de toxicidade dependendo do polimorfismo entre seus alelos. Variações na região de sinal (s) e na região média (m) é que determinam esse grau de virulência. A capacidade para vacuolizar está localizada principalmente no primeiro fragmento (s) com subtipos *s1* e *s2*, enquanto o segundo fragmento, região (m) com subtipos *m1* e *m2* é envolvido no

direcionamento celular (AGUILAR; AYALA; FIERROS-ZÁRATE, 2001). Cepas portadoras do genótipo *vacA s1m1* são muito mais virulentas em relação as cepas que contém o genótipo *s1m2*, ou seja, a atividade vacuolizante apresenta-se forte em cepas *s1m1*, moderada em cepas *s1m2* e ausente em cepas *s2m2*. Desse modo, cepas *vacA s1m1* podem ser fortemente associadas a úlcera duodenal, gástrica e câncer gástrico (ATHERTON et al., 1995; ATHERTON et al., 1997).

Diversos mecanismos de ação da toxina *vacA* contra a célula hospedeira já foram relatadas. Essa toxina tem a capacidade de gerar vacúolos intracitoplasmáticos nas células gástricas formando canais em diversas membranas celulares e de despolarizar a membrana interna das mitocôndrias, produzindo assim, alterações na dinâmica mitocondrial e na homeostase energética celular como um mecanismo associado a apoptose das células hospedeiras (KIM; BLANKE, 2012).

3.1.2.3 Fatores de aderência

A adesão ao epitélio gástrico é o passo inicial para a infecção por *H. pylori*. Fatores de aderência são fundamentais para o estabelecimento da colonização e a persistência da infecção, além de facilitar a liberação de outros fatores de virulência como o *cagA* e *vacA* (PRINZ et al., 2001). Fatores de aderência são, em sua maioria, proteínas identificadas na membrana externa de *H. pylori* conhecidas como BabA (blood group antigen-binding adhesion), SabA (sialic acid-binding adhesion) AlpA-B (adherence-associated lipoprotein A and B), HopZ (*H. pylori* outer membrane protein) e HpaA (*H. pylori* adhesion A) (ODENBREIT, 2005).

Dois dos principais fatores de aderência, as proteínas da membrana externa BabA e SabA, se ligam aos antígenos Lewis b, ABO e ao antígeno sialil-Lewis x / a. Esses antígenos fazem parte da composição das mucinas gástricas das células epiteliais gástricas de indivíduos muco secretores positivos e funcionam como receptores para a bactéria. BabA é codificada pelo gene *BabA2*, apresenta 78 kDa e é um dos mais importantes fatores de adesão. A presença de *BabA*, *cagA* e *vacA s1* em uma mesma cepa de *H. pylori* reflete uma maior virulência a essa cepa e são denominadas de cepas “triplo positivas”, sendo associadas com úlcera duodenal e adenocarcinoma gástrico (GERHARD et al., 1999; MAHDAVI et al., 2002).

A adesina *SabA* também é uma importante proteína que medeia a adesão da bactéria a célula hospedeira e participa da ativação de neutrófilos. Com a infecção por *H. pylori* o processo inflamatório na mucosa gástrica é estabelecido e, desse modo, essa adesina se liga a resíduos glicoconjugados de ácido siálico durante esse processo. O ácido siálico, uma classe de carboidratos de nove carbonos é expresso em grande quantidade em tecidos animais quando há um processo inflamatório ou neoplásico e, raramente, ocorre na mucosa gástrica normal (UNEMO et al., 2005).

AlpA-B são dois genes homólogos que foram identificados e denominados de genes *AlpA* e *AlpB*. Após serem caracterizados geneticamente foi comprovado que esses genes fazem parte de um operon que codifica proteínas integrais da membrana externa de *H. pylori* e são essenciais para a ligação dessa bactéria a células da mucosa gástrica (ODENBREIT et al., 1999).

A proteína HopZ é um dos seis fatores de aderência envolvidos na colonização e adesão de *H. pylori*. De acordo com Peck e colaboradores (1999) essa proteína não é essencial para promover a adesão. Estudos *in vitro* comprovaram que a ausência dessa proteína na bactéria pode reduzir, mas não anular a aderência às células gástricas. E, por fim, a adesina *HpaA*, uma lipoproteína encontrada na superfície da bactéria e indispensável para promover a adesão de *H. pylori*. Foi identificada como um potente objeto de estudo para o desenvolvimento de vacinas. Flach e colaboradores (2011) identificaram essa adesina em anticorpos de indivíduos infectados por *H. pylori*. Além disso, comprovaram também que a expressão da proteína *HpaA* é altamente conservada entre os isolados dessa bactéria.

3.1.2.4 Proteína OipA

Essa proteína também conhecida como *HopH* é um membro da família das proteínas da membrana externa (OMPs) e é codificada pelo gene presente na bactéria *H. pylori* conhecido como *HP0638/HopH*. Está intimamente ligada ao aumento da secreção de IL-8, aumento da inflamação gástrica e adaptação da bactéria ao microambiente da mucosa gástrica do hospedeiro (AGHDAM et al., 2014). Segundo um estudo feito em (2011), por Markovska e colaboradores, 97% dos pacientes com úlcera peptídica e 66% dos pacientes com gastrite são OipA

positivos. Cepas mais virulentas de *H. pylori*, *cagA+* e *vacA s1m1*, abrigam o status *OipA* “on”, ou seja, possuem a proteína *OipA* e são, conseqüentemente, associados diretamente aos casos de câncer gástrico.

3.1.2.5 Enzima Urease

A urease, proteína de alto peso molecular, 500 a 600 kDa, constitui um dos principais fatores de virulência de *H. pylori*. Essa enzima é produzida em sua forma inativa e contém 6 subunidades UreA e 6 subunidades UreB. Para a ativação desta enzima é necessário que receba 2 íons níquel e um de seus aminoácidos, a lisina 219, seja carboxilada. Esse processo é realizado pelas proteínas UreF, UreG e UreH que interagem entre si formando um complexo heterotrimético. Esse complexo formado interage com a urease promovendo alterações espaciais de forma a permitir que os íons de níquel a ative (FONG et al., 2011).

A urease contribui para que a bactéria colonize o ambiente ácido do estômago fornecendo, assim, um microambiente alcalino, característica esta, essencial para sua infecção (KRAKOWKA et al., 1991). Esse mecanismo se dá por meio da hidrólise da ureia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando a produção de amônia. A urease converte ureia em amônia e CO₂, que posteriormente é convertido a bicarbonato. Para que isso ocorra é necessário a secreção da citotoxina *vacA* que induz a formação de canais seletivos de ânions nas células epiteliais induzindo assim à exsudação da ureia para o lúmen gástrico (TOMBOLA et al., 2001). A entrada da ureia na bactéria é controlada por uma proteína, codificada por um gene da família urease denominado de Urel. Cepas de *H. pylori* com deleção da Urel não sobrevivem ao pH ácido. Desse modo, a proteína Urel funciona como um portão de um canal que permite o refluxo da urease, aumentando o pH e evitando o acúmulo tóxico da ureia dentro da bactéria (WEEKS; SACHS, 2001).

3.1.2.6 Flagelos

A motilidade exerce um papel vital na colonização e também aumenta a adesão de *H. pylori*. Essa bactéria possui de 4 a 6 flagelos embainhados do tipo

unipolar e sua função é determinada e dependente da expressão de alguns genes como: *flhA*, *flaA*, *flaB*, *flgE*. A flagelina, proteína que compõe o flagelo, é codificada pelos genes *flaA* e *flaB*, que forma o filamento flagelar e, em seguida, conecta-se ao gancho, codificado pelo gene *flgE*. O gene *flhA* funciona codificando um componente integral da membrana e regulando a expressão dos genes *flaA* e *flaB* (KAO; SHEU; WU, 2014).

KRAKOWKA e colaboradores (1991) comprovaram que todas as amostras clínicas de *H. pylori* são móveis. Amostras aflageladas ou defeituosas não são capazes de promover a colonização gástrica e, desse modo, pode-se dizer que sua infectividade diminui. A estrutura flagelar permite que a bactéria atravesse rapidamente a camada viscosa de muco que tem como função a proteção química e mecânica do revestimento gástrico do hospedeiro. Além de a estrutura flagelar, *H. pylori* sintetiza lipases e proteases que degradam o muco. A forma bacilo-espiralada dessa bactéria também é um facilitador para promover a motilidade desta em meio a esse ambiente inóspito (AGUILAR; AYALA; FIERROS-ZÁRATE, 2001).

3.1.3 Epidemiologia

3.1.3.1 Prevalência

A infecção por *H. pylori* é universal, porém, sua prevalência é muito variável em relação à geografia, etnia, idade e fatores socioeconômicos apresentando uma alta nos países em desenvolvimento. Globalmente é estimado que mais da metade da população global seja *H. pylori* positivo (TANIH et al., 2010).

Embora haja uma tendência nos últimos anos para a diminuição da prevalência de *H. pylori* em muitas partes do mundo, comparações epidemiológicas diretas de úlcera péptica entre países desenvolvidos e em desenvolvimento são complexas pois a infecção pode ser assintomática e o acesso para os testes diagnósticos principalmente nos países em desenvolvimento, variam amplamente. Nos países em desenvolvimento, a infecção ocorre precocemente e com frequência mais alta, fenômeno esse, associado à presença de condições socioeconômicas e ambientais inadequadas (TONKIC et al., 2012). Um terço das pessoas nos Estados Unidos e na Europa Ocidental abrigam essa bactéria ocorrendo uma proporção

muito mais elevada no continente Asiático e nos países em desenvolvimento. Países como México, integrantes da América Central, América do Sul e Continente Africano apresentam uma população com uma taxa de infecção entre 70% a 90%. No Continente Asiático a taxa de infecção é cerca de 50% a 80% e, no continente Europeu, a maior taxa de infecção encontra-se na Europa oriental, cerca de 70%. Já na Europa ocidental a porcentagem diminui para 30% a 50%. Países da América do Norte, como Estados Unidos e Canadá apresentam uma taxa de 30% e, a Austrália, pertencente à Oceania apresenta uma taxa ainda menor, cerca de 20%. A imigração é um fator que influencia também a infecção por *H. pylori*, justificando a alta prevalência em algumas áreas isoladas (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002).

Nos países da América Latina a prevalência da infecção pode variar entre 52,7% a 84,7% dependendo do país e a taxa de reinfecção após o tratamento de erradicação é alto, atingindo aproximadamente 50% dos casos ao ano (RAMOS; SÁNCHEZ, 2009). Já nos países desenvolvidos, a infecção é pouco frequente na infância. A incidência aumenta com a idade e cerca de 50% da população acima dos 60 anos apresentam a infecção. A taxa de reinfecção é variável atingindo até 4,7% ao ano (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002). Países como o Japão, por exemplo, em que a economia passou a se desenvolver muito nos últimos 50 anos teve um declínio acentuado na prevalência de *H. pylori*. É notório que os adultos com mais de 40 anos são *H. pylori* positivos refletindo assim, as más condições nesse país antes de 1960, período em que eram crianças. No entanto, desde 1970, novas infecções com *H. pylori* têm sido muito menos comum, fazendo com que menos que 5% das crianças japonesas adquiram a infecção (MARSHALL, 2002).

3.1.3.2 Vias de Transmissão

As vias de transmissão de *H. pylori* são variáveis podendo apresentar a via oral-oral, transmissão iatrogênica e transmissão fecal-oral. O ser humano é o principal reservatório e sua aquisição ocorre com frequência na infância. A proximidade com membros da família e aglomerações intrafamiliares ocasiona a transmissão de pais infectados para filhos, existindo uma maior incidência de *H. pylori* em crianças cujos pais são portadores desta bactéria (BROWN, 2000; TANIH et al., 2010).

A transmissão oral se dá principalmente pelo fato de que a cavidade oral é um verdadeiro reservatório para *H. pylori*, sendo uma forma muito comum de transmissão nos países em desenvolvimento. A bactéria pode ser encontrada e detectada na saliva e em placa dentária. A regurgitação e vômitos também podem ser fontes viáveis de contaminação, podendo ainda ser denominados de rota gastro-oral. Essa via além de ser uma das mais altas fontes de transmissão, apresenta uma taxa de reinfecção também alta, devido às rotas de transmissão ser fácil de adquirir (BROWN, 2000; NDIP et al., 2003).

A transmissão fecal-oral é muito comum nos países em desenvolvimento onde apresenta uma maior população com más condições socioeconômicas, falta de higiene-pessoal e água potável. A bactéria pode ser adquirida através dessa via pela transmissão de origem alimentar, ou seja, pelas mãos sujas do manipulador através da má higienização e pelo consumo de vegetais crus relacionados com a água contaminada por fezes e, por último, a ingestão desta contaminada, embora seja difícil a detecção de *H. pylori* através da água (RAMOS; SÁNCHEZ, 2009).

A transmissão iatrogênica é decorrente da passagem da bactéria de uma pessoa doente a uma pessoa sadia, através de uma ineficiente desinfecção e esterilização do aparelho de endoscopia, o gastroscópio. Médicos e enfermeiros também estão sujeitos à contaminação quando não usam vestimentas e materiais de proteção adequados ao realizar o exame. Esse procedimento poderá levar não só a infecção pelo *H. pylori*, mas de outras doenças infecciosas como hepatite B, hepatite C, tuberculose e, possivelmente HIV (Vírus da Imunodeficiência adquirida). Dentre as formas de transmissão já estabelecidas para a infecção por *H. pylori* essa é a menos comum. A esterilização completa e adequada do gastroscópio reduz consideravelmente a incidência de transmissão (BROWN, 2000; TANIH et al., 2010).

3.1.3.3 Fatores de risco

Existem alguns fatores que aceleram o processo de transmissão por *H. pylori* como a idade, condições socioeconômicas, raça, geografia, coabitação. A idade de maior infecção acontece nos primeiros 5 anos de vida e esse número aumenta quando se trata de crianças provenientes de famílias com baixo nível socioeconômico. Crianças podem representar um importante papel também na

transmissão de *H. pylori* além de serem muito mais predispostas para a infecção em comparação aos adultos (MCCALLION et al., 1996).

Alguns estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos que convivem em uma mesma área diferem significativamente em termos de infecção por *H. pylori*, ou seja, a prevalência sempre é maior em negros que em brancos, justificando assim a relação raça versus infecção. Nos países orientais, como China, por exemplo, as taxas de infecção por cepas altamente virulentas são bem maiores. De acordo com Aziz e colaboradores (2015) a China apresenta 42% dos casos globais de câncer gástricos desencadeados por *H. pylori*. Em relação ao número de habitantes em uma mesma moradia, as descrições de surtos de infecção por *H. pylori* causadas por cepas geneticamente idênticas, em uma mesma família, afirmam o alto risco de infecção em pessoas que vivem agrupadas. Esse tipo de infecção pode ser estendido em instituições diversas onde há grande aglomerado de pessoas que convivem entre si (MCCALLION et al., 1996).

3.1.4 Patogênese

Antes da descoberta de *H. pylori*, em 1982, doenças como gastrite, úlcera e outras enfermidades que acometem o estômago humano eram considerados patologias fruto do desequilíbrio entre o sistema imunológico do hospedeiro e a produção de secreção ácida. No entanto, pós-descoberta, Marshall e Warren, propuseram pela primeira vez, a possível relação entre *H. pylori* e as doenças na mucosa gástrica. Em junho de 1994 a Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer da Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou *H. pylori* como um agente cancerígeno grau I. A infecção causada por *H. pylori* pode ser considerada umas das infecções crônicas mais frequentes em humanos já que, aproximadamente metade da população mundial se apresenta *H. pylori* positivo. Embora essa taxa de colonização seja extremamente alta nem sempre estará associada ao desenvolvimento de doenças, ou seja, cerca de 70% das pessoas infectadas no mundo são assintomáticos. Contudo, indivíduos uma vez colonizados poderão desenvolver gastrite, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma de tecido associado à mucosa (MALT) gástrica (SANTOS; RIBEIRO, 2015).

3.1.4.1 Gastrite

Gastrite refere-se à infecção da mucosa gástrica, acomete mais o corpo e antro do estômago com evidente inflamação na cárdia, na maioria dos indivíduos infectados. Pode ser dividida em aguda ou crônica e as três principais causas são o uso abusivo de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), autoimunidade e a presença da bactéria *H. pylori*. A endoscopia pode aumentar a precisão de seu diagnóstico. A gastrite aguda é caracterizada pela hipocloridria logo nos primeiros dias da infecção e envolve preferencialmente o antro gástrico. Em síntese não causa atrofia e pode ser uma inflamação transitória da mucosa, ainda que provoque uma intensa infiltração neutrofílica e, dependendo da lesão poderá apresentar manifestações clínicas como azia, aflição gástrica, vômitos e, em situações mais graves, levar a uma hemorragia estomacal. No entanto, a gastrite aguda pode, muitas vezes, não desenvolver nenhuma manifestação clínica e permanecer assintomática sendo uma lesão auto limitante e, apresentar uma regeneração e cura completa. Em alguns casos porém, essa gastrite poderá evoluir para uma infecção crônica levando a atrofia gástrica e até a metaplasia (OPPONG et al., 2015).

A gastrite crônica caracteriza-se pela ausência de erosões visíveis e a presença de mudanças inflamatórias no epitélio gástrico, levando a atrofia do epitélio glandular do estômago. Acomete o antro e o corpo gástrico e as mudanças ocorridas nesse epitélio podem se tornar displásicas e, possivelmente transformar-se em carcinoma. O consumo de álcool, cigarro, uso constante de anti-inflamatórios do tipo AINEs, aspirina, como citados anteriormente, são fatores agravantes para a cronicidade da gastrite além, da gastrite aguda não tratada (WATARI et al., 2014).

3.1.4.2 Úlcera Péptica

A úlcera caracteriza-se por ser uma ferida no revestimento interno do estômago e duodeno podendo, raramente, acometer a parte final do esôfago. Seu mecanismo se dá pela produção excessiva do hormônio gastrina, secretado pelas células G no antro estomacal. Esse hormônio estimula a produção de suco gástrico diminuindo a produção de muco, essencial para proteção deste local. Pode ser dividida em duodenal e gástrica e, aproximadamente 70% dos indivíduos que apresentam essa patologia, são *H. pylori* positivos. Outras causas de úlcera péptica

são estresse e a síndrome de Zollinger-Ellison. A úlcera péptica pode apresentar exacerbações e remissões representando desse modo, um problema de saúde pública. Estima-se que 10% da população mundial têm ou terá essa patologia (MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2011).

Úlceras duodenais são muito mais comuns que as gástricas e ocorrem em qualquer idade, mas frequentemente é visto no início da vida adulta. As principais manifestações clínicas apresentadas são dor, desconforto e queimação. Já a úlcera gástrica, menos comum que a duodenal, afeta uma faixa etária mais velha, entre indivíduos de 55 a 70 anos. Esse tipo de úlcera ocorre ao longo da curvatura menor do estômago, em particular na transição do corpo para a mucosa antral. Ambos os tipos de úlcera afetam de 3 a 4 vezes mais homens em relação às mulheres e podem apresentar complicações como hemorragias e perfuração da mucosa. A hemorragia é causada pelo sangramento do tecido de granulação ou a erosão de uma úlcera em uma artéria ou veia e afeta de 10 a 20% dos indivíduos portadores dessa doença (TANIH et al., 2010).

3.1.4.3. Câncer Gástrico

O câncer gástrico representa a segunda causa de mortalidade por cânceres em todo o mundo. O grupo de maior risco encontra-se no Japão e China, devido à incidência de cepas *H. pylori* altamente virulentas. Desenvolve-se a partir de mudanças epigenéticas no DNA levando a ativação de oncogêneses ou a inativação de genes supressores de tumores. Nota-se que o desequilíbrio entre reguladores do ciclo celular, alterações em fatores de crescimento e citocinas ou falhas no DNA levam a instabilidade genética e proliferação celular. De acordo com a classificação histológico de Lauren, para os carcinomas gástricos, esse tipo de câncer pode ser dividido em intestinal ou difuso.

O carcinoma gástrico do tipo intestinal tem origem em células gástricas mucosas que sofreram metaplasia intestinal e é caracterizado por estruturas de células malignas unidas que se assemelham a glândulas gastrointestinais. É o tipo mais comum em populações de maior risco, como Japão e China e acometem mais homens com faixa etária de 50 anos. Seu aparecimento é sequencial, ou seja, inicia

com a gastrite, progride para gastrite atrófica seguida de metaplasia intestinal e câncer gástrico.

O carcinoma gástrico do tipo difuso por sua vez, origina-se diretamente de células gástricas e tem como característica um padrão de células soltas, não aderentes que se infiltram difusamente no estroma gástrico com pouca formação glandular. É mais frequente em jovens e sua evolução é tipicamente hereditária sem etapas progressivas, ou seja, sem relação com a gastrite (SANTOS; RIBEIRO, 2015).

3.1.4.4 Linfoma de tecido linfóide associado à mucosa (MALT)

Os linfomas gástricos são um tipo de neoplasia rara que correspondem apenas a 5% das neoplasias que acometem o estômago. Apresentam uma distribuição mundial com áreas de maior incidência possivelmente relacionadas com altas taxas de infecção por *H. pylori*. De acordo com um estudo feito por Wotherspoon e colaboradores (1991) dos 110 pacientes acometidos por essa patologia, *H. pylori* fez-se presente em 92% dos casos, ou seja, de todas as patologias descritas anteriormente, linfoma MALT é o que apresenta uma integral dependência entre a infecção bacteriana crônica e o desenvolvimento dessa doença.

É comprovado que a transformação de linfoma no tecido gástrico se dá através da inflamação crônica por *H. pylori*. A bactéria identificada como um antígeno local provoca a proliferação de células T e células B e, uma pequena porcentagem dessas células B resulta em um linfoma. Diretrizes internacionais recomendam fortemente a erradicação bacteriana em todos os pacientes com linfoma MALT gástrico, havendo assim regressão da doença em 60% a 80% dos casos.

Os sintomas clínicos mais comuns dessa patologia são dor epigástrica e queixas dispépticas inespecíficas. O indivíduo poderá apresentar ainda náuseas e vômitos. Na maioria dos casos esse linfoma encontra-se, por um longo período, localizado apenas no estômago, mas, quando disseminado, tendem a ocupar a zona marginal dos linfonodos e ainda podem infiltrar a zona marginal esplênica e a mucosa intestinal (PARK; KOO, 2014).

3.1.5 Tratamento

O tratamento da infecção por *H. pylori* bem como sua erradicação são desafios enfrentados hoje pela atual terapêutica. A prevalência global dessa bactéria bem como as inúmeras doenças que causam no epitélio gástrico justificam a procura de novas drogas em todo o mundo. Contudo, há um desafio que é o de driblar as altas taxas de resistência às drogas convencionais utilizadas. Cada vez mais se aumenta o número de cepas resistentes e diminui, em uma escala inversamente proporcional, as taxas de erradicação (WU et al., 2014).

Para se ter efetividade no tratamento, faz-se necessário combinações de antibióticos juntamente com agentes não antibióticos e, além disso, a terapêutica deve ser de baixo custo, fácil administração, poucos efeitos colaterais e a taxa de erradicação deve ser maior que 80%. De acordo com as recomendações do IV Consenso de Maastricht, 2012, a primeira linha de tratamento, denominada de terapia tripla, inclui um inibidor da bomba de próton e antibióticos como claritromicina, amoxicilina ou metronidazol e tem duração de 7 a 14 dias. No entanto, a recomendação é que essa terapia seja abandonada quando a taxa de resistência à claritromicina seja de 15% a 20%. Além da resistência, fatores como alta acidez gástrica, alta carga bacteriana e mau cumprimento do tratamento também contribuem para o declínio da taxa de erradicação de *H. pylori* (MALFERTHEINER et al., 2012).

Em substituição a terapia tripla é recomendada se utilizar a terapia quádrupla, que contém bismuto. Essa terapia é uma segunda linha de tratamento e é constituída por um inibidor de bomba de próton, bismuto, tetraciclina e metronidazol (MALFERTHEINER et al., 2012). Segundo WU e colaboradores (2014) a taxa de erradicação do *H. pylori* através dessa terapia fica em torno de 80%. Porém, há várias questões que envolvem esse tratamento, como a disponibilidade do bismuto, aumento das cepas resistentes ao metronidazol e a duração da terapia.

Dentre essas terapias, existe uma terceira linha de tratamento onde é recomendado a seleção de antibióticos de acordo com a cultura bacteriana e testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Em um estudo relatado por CAMMAROTA et al (2004) foram avaliados 94 pacientes em que a infecção por *H. pylori* foi persistente apesar das terapias de erradicação. O teste de sensibilidade aos

antimicrobianos revelou que a porcentagem de resistência ao metronidazol, claritromicina, levofloxacina e tetraciclina foi de 100%, 95%, 31% e 5%, respectivamente. Curiosamente, esse estudo não apresentou resistência à amoxicilina. Desse modo, a erradicação do *H. pylori* foi satisfatória em 90% dos pacientes guiados pela cultura bacteriana e por testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Esse tipo de terapia, no entanto, apresenta algumas limitações quanto a sua eficácia, pois testes de sensibilidade *in vitro* nem sempre prometem sucesso de erradicação *in vivo* (SAVARINO et al., 2000).

Um estudo feito por HSU e colaboradores (2008) propôs uma terapia quádrupla de 10 dias com antibióticos com comprovada eficácia contra o *H. pylori* e que apresentam uma porcentagem de cepas resistentes ainda pequena. Essa terapia foi proposta a fim de selecionar antibióticos quando o teste de sensibilidade antimicrobiana não é possível e compreende um inibidor da bomba de próton, rabeprazol 20 mg, subcitrate de bismuto 300 mg, amoxicilina 500 mg, e levofloxacino 500 mg. Essa terapia atingiu uma taxa de erradicação de 84% em pacientes nos quais a taxa de erradicação com terapias padrões não foram eficazes. Outro medicamento avaliado que demonstrou eficácia contra o *H. pylori* foi a furazolidona. Antibiótico da classe dos nitrofuranos, essa substância pode substituir o metronidazol na terapia quádrupla e assim, oferecer uma taxa de erradicação do *H. pylori* promissora, por volta dos 90% (TREIBER et al., 2002; WU et al., 2014).

Devido a inúmeros problemas enfrentados nas terapias de erradicação do *H. pylori*, a vacinação pode representar a melhor alternativa. Desenvolver uma vacina que confira imunidade protetora em longo prazo é uma estratégia para erradicar a infecção crônica, principalmente, causada em escala global pelo *H. pylori* (AGUILAR; AYALA; ZÁRATE, 2001). Desde meados da década de 90 já se busca uma vacina contra esta bactéria. Vários antígenos da bactéria como glicoconjugados do LPS ou outros compostos contendo carboidratos bacterianos bem como ensaios *in vivo* já foram realizados para o desenvolvimento de vacinas. Porém, ainda não houve sucesso no desenvolvimento (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

Um estudo randomizado, duplo-cego controlado com placebo, de fase 3, realizado por ZENG e colaboradores (2015) na China demonstrou a eficácia, segurança e imunogenicidade de uma vacina oral recombinante dada em 3 doses contra o *H. pylori* em crianças. Essa vacina apresentou efetividade e segurança, sugerindo uma proteção de até 3 anos contra a infecção por *H. pylori*, reduzindo

drasticamente a incidência de gastrites, úlcera gástrica, úlcera duodenal, e adenocarcinoma gástrico causados pelo *H. pylori*. No entanto, um maior tempo de observação no grupo vacinado seria necessário para fornecer evidências em relação a vacina e sua proteção contra doenças gástricas associadas a presença do *H. pylori*, além de se fazer necessário doses de reforço no momento adequado para proteção a longo prazo.

3.2 ESPONJAS MARINHAS

3.2.1 Características gerais das esponjas marinhas

A busca constante por novos fármacos com atividades farmacológicas de interesse antibiótico, antiviral ou antitumoral faz-se necessário. Considerando que dois terços da superfície terrestre é coberto por mares e que o meio marinho possui uma imensa biodiversidade, abre – se um vasto caminho de possibilidades quanto a descoberta de novas drogas. O estudo e os achados, ao acaso, de esponjas marinhas, especificamente da esponja *Tethya crypta* se deu por volta do ano de 1950, onde foram isolados compostos como arabinosil – nucleosídeos espongotimidina e espongouridina. Esses achados são frutos do mergulho autônomo e técnicas espectroscópicas que permitiram a elucidação estrutural de moléculas muito complexas, dando início a um caminho para a pesquisa de derivados nucleosídeos de esponjas marinhas e a suas possíveis atividades terapêuticas, além da constatação de toxinas marinhas, responsáveis por intoxicações alimentares (SIMÕES et al., 2017). Desde então, a partir dos anos 80, mais de 15 mil novos produtos marinhos foram descobertos e, 8368 novos registros foram feitos de 2001 a 2010, correspondendo a mais da metade de todos os compostos descobertos desde 1950 (MEHBUB et al., 2014).

Segundo a classificação científica, as esponjas são pertencentes ao Domínio *Eukaryota*, Reino *Animalia*, Subreino *Parazoa* e Filo *Porifera*. São animais primitivos, sésseis, podendo ser de água doce ou salgada e o registro fóssil dessas esponjas datam desde a Era pré-cambriana ou Neoproterozóica. Pela rica gama de compostos que compõem essas esponjas, numerosos estudos revelaram um amplo

espectro de atividades biológicas incluindo atividade anticancerígena, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, anti-helmíntica, anti-inflamatória entre outros (MEHBUB et al., 2014).

Os compostos farmacologicamente ativos das esponjas podem ser compostos sintetizados pelas próprias esponjas ou então, podem ser advindos de micro-organismos simbiotes, ou seja, bactérias e fungos existentes ali nessas esponjas e que exercem uma relação de simbiose com esses seres vivos. As esponjas marinhas apresentam já catalogadas, um vasto número de gêneros e espécies que podem ser encontrados em diversas partes do mundo. Uma das características mais interessantes dessas esponjas é a de que, muitas vezes, seus compostos podem apresentar esqueletos carbonados inéditos e combinações de grupos funcionais pouco habituais como os de produtos naturais de origem terrestre. Essas esponjas também podem ser influenciadas por fatores ecológicos, ou seja, pode haver uma variabilidade na composição química de uma mesma espécie coletada em diferentes lugares e em diferentes profundidades, portanto, cada extrato é, muitas vezes, único (SIMÕES et al., 2017).

3.2.2 Gênero *Dysidea* sp.

O gênero *Dysidea* sp. pertencente à classe Demospongiae, ordem Dictyoceratida e família *Dysideaidae*, apresenta muitas espécies já catalogadas, incluindo a espécie *Dysidea avara*. Proveniente de mares, essa esponja possui o esqueleto formado por fibras de espongina e contém alguns compostos já identificados e com comprovada atividade farmacológica. Um desses compostos é o avarol, componente mais estudado dessa esponja. Trata-se de uma hidroquinona sesquiterpênica que apresenta atividades anti-inflamatórias, anticancerígeno, antimicrobianas, antipsoríase e atividade anti – HIV. No entanto, altas quantidades desse composto fazem-se necessário para a produção de produtos farmacêuticos, dificultando assim, o seu uso, já que a coleta da esponja não é fácil e a produção desse composto também é dependente de condições ecológicas favoráveis (AKTAS et al., 2010). Essa espécie já demonstrou grande potencial farmacêutico, mas, no entanto, tentativas de cultivar e produzir seus compostos fora de seu habitat natural não foram eficazes. Algumas empresas privadas, especializadas em pesquisa e desenvolvimento marinho, cultivam essa espécie no Mar Mediterrâneo e, com

algumas técnicas, tentam obter maior quantidade de avarol extraído dessas esponjas e aumentar assim, os testes para a produção de possíveis produtos de potencial farmacêutico (DE CARALT et al., 2010).

O composto avarol bem como outros componentes existentes na esponja *D. avara* já apresentaram comprovadas atividades *in vitro* frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus faecalis* (CARIELLO et al., 1982). Outros compostos, além do avarol, também já foram isolados e identificados como majoritários por meio de cromatografia gasosa com espectrômetro de massa na esponja *D. avara* coletada na região de Medas Cataluña, no Mar Mediterrâneo, Espanha. Esses compostos identificados como 3-etil 2-metil 1,3 hexadieno e 2-ácido furóico, 2-methyloct-5-yn-4yl ester fazem parte da classe de hidrocarbonetos e ácido carboxílico, respectivamente, apresentam efetiva atividade *in vitro* anti-protozoário contra as formas de *Trypanosoma cruzi* (CARREIRA DE PAULA et al., 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO

In vitro activity of the extract of *Dysidea avara* against *Helicobacter pylori*

Tiala Kelly Martins¹, Karina Miyuki Retamiro², Tânia Ueda-Nakamura²,
Mariana Maciel de Oliveira², Celso Vataru Nakamura^{1,2*}.

¹ Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

² Laboratory of Innovation and Cosmetic Technology, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil.

* e-mail: cvnakamura@uem.br

Abstract

Helicobacter pylori, main etiological agent of gastritis, peptic ulcers and gastric adenocarcinoma, colonizes human stomach and is present in half of the global population. The eradication of this bacterium is difficult by its resistance to classical antibiotic therapy. An alternative treatment would be the use of natural products such as marine sponges, as *Dysidea avara*, which are rich in secondary metabolites and already proved antibacterial activity. The aim of the present work was to evaluate the *in vitro* activity of *D. avara* marine sponge extract against *H. pylori*. Initially, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of this extract against bacteria was 125 µg/mL. The bacteriostatic activity was confirmed through the Time-kill curve assay where different concentrations of the extract were used at times 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h. From 9 h of exposure there was a ≥ 2 log decrease in viable counts at MIC (125 µg/mL) and 2 x MIC (250 µg/mL). For combination of the *Dysidea avara* extract with standard antibiotic clarithromycin was used the "Checkerboard" assay. The Inhibitory Fraction Concentration Index (FICI) was 0.30, indicating synergism between these substances. The *in vitro* antioxidant activity of the extract was confirmed by 3 methods, DPPH, FRAP and Xanthine oxidase. The extract of *Dysidea avara* showed antioxidant capacity in all the methodologies used, where it exhibited antioxidant potential equivalent to the standard, quercetin, in FRAP (10.44 ± 0.37 mM ET/g) and upcoming to that of quercetin in the XOD DPPH method (IC 50 5.85 ± 0.09 µg / mL and 0.23 ± 0.01 µg/mL, respectively). Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) were performed for the morphological and ultrastructural analysis of the bacteria after treatment with different concentrations in the time of 48 h and indicated considerable changes to the morphology and bacterial structure as well as the reduction of cellular electrodensity. In conclusion, an effective *in vitro* activity of *D. avara* extract against *H. pylori* was observed.

Key words: *Helicobacter pylori*; Treatment; Marine sponges; *Dysidea avara*

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a pathogenic bacterium, found in all regions of the globe, has the human as the main reservoir and colonizes the gastric mucosa. Etiologic agent of diseases such as gastritis, peptic ulcers and gastric cancer, once the gastric mucosa colonization begins, it may be a symptomatic and regress spontaneously, not developing any type of infection. However, the appearance of diseases associated to this bacterium is dependent on the type of strain, genetic and racial factors, as well as geographic factors and lifestyle (MCCALLION et al., 1996; HU et al., 2009).

The infection of *H. pylori* in the gastric epithelium, are determining factors for the establishment of the pathologies that this microorganism is associated. *H. pylori* infected individuals have an intense inflammatory response, with the release of a large amount of cytokines such as interleukin-1 β (IL1- β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (SHARMA et al., 1995). Cytokines produced in the inflammatory response induced by *H. pylori* infection can activate several defense cells, such as neutrophils, activated by IL-8. Neutrophils release a large amount of ROS (Oxygen-reactive species) in an attempt to eliminate the infectious agent. In addition, neutrophils and epithelial cells increase the expression of the enzymes nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH oxidase) and nitric oxide synthase, which also produce ROS (Butcher, et al., 2017). The presence of excess ROS leads to DNA damage, protein, lipid peroxidation and inflammatory response intensification (BA; WU; WANG, 2012). As a consequence of the high production of ROS, *H. pylori* infection lesions become more serious, besides contributing to the development of gastric adenocarcinoma (ISRAEL, PEEK, 2001; DRAKE et al., 1996)

The treatment used for infections related to this bacterium is based on the use of antibiotics such as amoxicillin and clarithromycin, present in triple therapy and also a proton pump inhibitor, omeprazole (MALFERTHEINER et al., 2012). The major challenge related to this therapy is to circumvent the high resistance rates to the conventional drugs used, mainly related to clarithromycin. Progressively, the number of resistant strains increases and the rates of eradication of this bacterium decrease on an inverse scale, and thus, the search for new drugs effective against the *H. pylori* infection is necessary (WU et al., 2014).

Marine sponges are an alternative and promising form of treatment. The pharmacologically active compounds may be compounds synthesized by the sponges themselves or may be derived from symbiotic microorganisms (SIMÕES et al., 2017). *Dysidea avara*, Dysideaidae, has their skeleton formed by spongina fibers and some compounds with verified pharmacological activity, such as the avarol compound, with *in vitro* activity against bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus faecalis* (CARIELLO et al., 1982; AKTAS et al., 2010). Other compounds have also been isolated and identified as the 2-furoic acid, 2-methyloct-5-yn-4yl ester and (3E)-3-ethyl-2-methyl-1,3-hexadiene and have already verified *in vitro* anti-protozoal activity against *Trypanosoma cruzi* (CARREIRA DE PAULA et al., 2015).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of *D. avara* extract against *H. pylori* through determination of direct antibacterial activity and its synergistic effect in combination with standard antibiotics such as clarithromycin and amoxicillin, its effect on morphology and ultrastructure of *H. pylori* and its antioxidant capacity.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining sponge *Dysidea avara*

The marine sponge *D. avara* was collected by the Department of Marine Biology of Fluminense Federal University through free diving and SCUBA diving, from tide zone to 19 m depth in Medas, region of Catalonia in the Mediterranean Sea, Spain.

Preparation of extracts

After collection, sponge *D. avara* was frozen and then lyophilized. Freeze dried materials (100 g) was extracted at room temperature by maceration with acetone three times for a period of 72 h. The crude extract obtained was evaporated to dryness under low temperatures (< 50 °C) on a rotary evaporator.

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analyses

According with Carreira de Paula et. al., (2015), the extract of marine sponge *D. avara* was analyzed by gas chromatography couple with mass spectrometry (GC-MS) in the apparatus of Shimadzu QP2010. A mixture of (C₉–C₂₀, C₂₁–C₄₀) linearhydrocarbons was injected under the same conditions to identify the components. In this sample of *D. avara*, identified the compound 2-furoic acid, 2-methyloct-5-yn-4yl ester and (3E)-3-ethyl-2-methyl-1.3-hexadiene, molecular formula C₉H₁₆, were identified. The crude extract was ceded of the Department of Marine Biology of Fluminense Federal University, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

Strains and growth conditions

The bacterial strain *H. pylori* ATCC 43504 was maintained in Brain and Heart infusion broth (BHIB, Difco) containing 20% glycerol at -80 °C. Before each experiments, the bacterial was grown in BHIB, pH 7.4, supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C for 72 h under microaerophilic conditions (10% CO₂).

Stock solutions of extract *D. avara* and standard antibiotics

Stock solutions of extract and standard antibiotics clarithromycin and amoxicillin, were prepared in dimethylsulphoxide (DMSO). Before each experiment, 5 mg of the crude extract of *D. avara* were diluted in 50 μL of DMSO acquiring a concentration of 100.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This solution was diluted in BHI medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The antibiotics clarithromycin (100M08298V) and amoxicillin (100M0828V) were purchased from Sigma Aldrich. Before each experiment, these antibiotics were diluted to a final concentration of 20 mg/mL. Then, these stocks were diluted in BHI medium supplemented with 10% fetal bovine serum.

Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC of the extract *D. avara* against *H. pylori*, ATCC 43504, was performed using the microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). For MIC, 96 well plates were used and 100 μL BHI broth culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum was added to each well. Then, serial dilution of extract *D. avara* was performed (1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). *H. pylori* inoculum was standardized according to the CLSI M100, Table 2J, S15 (2005), observing turbidity compared to McFarland 2.0 scale tube (BaSO_4 suspension corresponding to 6.0×10^8 CFU/mL) followed by dilutions to give a final suspension of 10^6 CFU/mL and then, 5 μL were added in each well, except in media control. For control of experiment was used standard antibiotics Clarithromycin (0.003 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Amoxicillin (3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 0.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used. The microplate was incubated at 37 °C for 72 h under microaerophilic conditions (10% CO_2). MIC was defined as the lowest concentration that inhibited visual growth. The experiment was performed in triplicate.

Time-kill curve assay

Time-kill curve assay for *D. avara* against *H. pylori* was performed in BHI broth supplemented with 10% fetal bovine serum. *D. avara* was tested at concentrations of 250 µg/mL (2 x MIC), 125 µg/mL (MIC) and 62.5 µg/mL (0.50 MIC). The assay included a growth control with no extract. The final inoculum used was 10⁶ CFU/mL. At predetermined time points (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 h), a 100 µL sample was removed from each test suspension, serially diluted in sterile saline, and plated on BHI agar supplemented with 5% sheep's blood plates for colony count determination. Plates were incubated at 37 °C for 72 h under microaerophilic conditions (10% CO₂). Data from triplicate runs were averaged and plotted as log CFU/mL versus time (h) for each time point (SANTOS et al., 2008).

Checkerboard assay

Checkerboard assay was performed using combinations of the extract of *D. avara* with the antibiotic Clarithromycin (CLA) and Amoxicillin (AMOX) against *H. pylori* ATCC 43504, according to the microdilution reference procedure of the (SIQUEIRA et al., 2014) with BHI broth supplemented with 10% fetal bovine serum. The final inoculum used was 10⁶ CFU/mL. The final concentrations ranged from 0.19 µg/mL to 0.003 µg/mL for clarithromycin, from 1.56 µg/mL to 0.024 µg/mL for amoxicillin and from 500 µg/mL to 0.48 µg/mL for extract *D. avara*. Each well of plate contained a combination of different concentrations of CLA and extract and AMOX and extract. The plates were incubated at 37 °C for 72 h under microaerophilic conditions (10% CO₂). The result was verified by observing the inhibition of visible growth and, in order to calculate the synergistic effect, the following formula was used:

$$FICI = FICI_A + FICI_B = \frac{MIC (A\text{-combined})}{MIC (A\text{-alone})} + \frac{MIC (B\text{-combined})}{MIC (B\text{-alone})}$$

According ODDS (2003) FICI – (Inhibitory Fraction Concentration Index values) ≤ 0.5 indicated synergistic interaction between compounds A and B; 0.5 < FICI < 4 indicated that there is no interaction between compounds A and B; and, FICI ≥ 4 indicated antagonistic interaction between the two compounds.

Antioxidant activity

DPPH• Method

For this analysis 100 μL of DPPH• methanolic solution (130 μM) was added to 100 μL of *D. avara* methanolic solution sample. Protected from light, after 30 min, the absorbance was measured in a spectrophotometer, 517 nm. The percentage of inhibition of DPPH • was calculated by the equation $I\%_{\text{DPPH}} = (A_0 - A_1/A_0) \times 100$, where A_0 is the absorbance value of the DPPH • solution, and A_1 of the DPPH• solution in the presence of the sample. The assay was performed in triplicate and IC_{50} values were estimated by linear regression (EL MASSRY et al., 2002).

FRAP Method

For this analysis, the FRAP reagent was prepared by the mixture of acetate buffer 0.3 M, pH 3.6, TPTZ reagent 10 mM and the FeCl_3 20 mM solution on the proportion 10:1:1. In a 96-well microplate, 30 μL of *D. avara* extract (1000 - 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or standard (800 - 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to 180 μL of the FRAP reagent for 30 min at 37°C, protected from light. After stabilization at room temperature the reading was performed at 593 nm in Bio Tek - Power Wave XS microplate reader. For the calibration curve, it was used the antioxidant standard, trolox ethanolic solution (2-carboxylic acid-6-hydroxy-2,5, 7,8-tetramethylchroman) and the results were calculated by linear regression and expressed in $\mu\text{mol ET}/\text{g}$ of the sample. The assay was performed in triplicate (BENZIE; STRAIN, 1996).

Xanthine oxidase (XOD)

The XOD methodology was performed according to Girotti et al. (2000). For this analysis, different concentrations of the *D. avara* extract were prepared in 50% ethanol. 400 μL glycine buffer pH 9.4 (EDTA 1 mmol/L and glycine 100 mmol/L), 150 μL of xanthine 6 mmol/L, 10 μL of the sample and 10 μL of luminol 0.6 mmol/L solution were added in microtubs. 100 μL of XOD (20 mU/mL) were added and the solution was transferred to 96-well microplates. The reading was performed by

Autolumat LB 953 luminometer and the percentage of superoxide anion inhibition ($I\%_{O_2^-}$) was calculated by the equation $I\%_{O_2^-} = (Q_0 - Q_1 / Q_0) \times 100$, where Q_0 is the chemiluminescence value of the negative control and Q_1 of the xanthine/XOD/luminol system in the presence of the samples. The experiment was performed in triplicate and IC_{50} values were estimated by linear regression.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

For scanning electron microscopy, *H. pylori* (ATCC 43504) was treated with BHI broth supplemented with 10% fetal bovine serum at concentrations of 250 $\mu\text{g/mL}$ (2 x MIC), 125 $\mu\text{g/mL}$ (MIC) and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.50 x MIC) of *D. avara* extract added to a growth control without extract for 48 h at 37°C under microaerophilic conditions (10% CO_2). The samples were fixed for 2 h with 2.5% of glutaraldehyde and 0.1 M cacodylate buffer at room temperature. Then, they were placed in a support with poly-L-lysine, dehydrated in series of increasing concentrations of ethanol, submitted to the critical point in CO_2 and metallized with gold. The observation of the material was done in the Quanta 250 (FEI) model (SANTOS et al., 2008).

Transmission Electronic Microscopy (MET)

For the Transmission Electronic Microscopy, *H. pylori* (ATCC 43504) was treated with 125 $\mu\text{g/mL}$ (MIC) and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ (0.50 x MIC) of the *D. avara* extract concentrations with a control of growth without the extract for 48 h at 37°C under microaerophilic conditions (10% CO_2). These samples were fixed for 2 h with 2.5% of glutaraldehyde with 0.1 M cacodylate buffer at room temperature, and then, post-fixed with 1.0% of osmium tetroxide and 2.0% of potassium ferrocyanide. After the post fixation, the samples were dehydrated with increasing concentrations of acetone and incorporated into Epon® resin. Ultra thin cuts of 65 nm thickness were made in the sample and, finally, they were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The images were made on the microscope JEM-1400 model, operated at 80kV (SANTOS et al., 2008).

Statistical Analysis

The data for the antioxidant activity were submitted to analysis of variance by ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$) was used to compare the means, using Statistica version 10. The graphics were constructed using SigmaPlot software version 11.0.

RESULTS

Minimum Inhibitory Concentration of *Dysidea avara* extract against *H. pylori*

The *in vitro* activity of *D. avara* extract against *H. pylori* growth was analyzed by broth microdilution technique. According to CLSI (2012), MIC was determined as the lowest extract concentration resulting in a 90% reduction in visible bacterial growth compared to control. The Table 1 shows the effect of the extract against *H. pylori*. The MIC value after 72 h of incubation was 125 $\mu\text{g/mL}$, considered a moderate activity related to *H. pylori* (Holetz et al., 2002). The vehicle used DMSO to solubilize the *D. avara* extract did not interfere with growth nor present toxicity to the bacteria since the concentrations used were equal to or less than 1%. The bacterial strain used, ATCC 43504, was sensitive to the standard antibiotic Clarithromycin, presenting a MIC of 0.19 $\mu\text{g/mL}$ and resistant to amoxicillin, with a MIC of 0.39 $\mu\text{g/mL}$. The "breakpoints" table was used as sensitivity and resistance criteria according to CLSI (2012).

Table 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) of the *D. avara* extract and the standards Clarithromycin and Amoxicillin against *H. pylori* (ATCC 43504).

Compound	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>D. avara</i> extract	125
Clarithromycin	0.19
Amoxicillin	0.39

Time- kill curve assay

Time-kill curve assay defined the time required for the *D. avara* extract to inhibit the growth of *H. pylori* at different concentrations as shown in Figure 2. The results showed a decrease ≥ 2 log in counts of viable for MIC and 2 x MIC from 9 h of exposure. At concentration 0.50 x MIC, a decrease in viable counts was observed in 12 h of exposure, however, there was an increase in viable cells, reaching ≥ 3 log. After a peak of growth in 24 h, these values stabilized and remained constant. Compared to the control, a gradual increase of 3 logs in up to 12 h of exposure was observed, and then this growth stopped. There was an expressive difference in the viability of *H. pylori*, independent of time, between the highest concentration of the drug, 2 x MIC and the control, of approximately 5 log, thus demonstrating the effect *in vitro* on the reduction of viable cells caused by *D. avara*. The bacteriostatic activity of this extract was confirmed, since in 48 h of exposure there was a stability on the decrease of viability until the time of 72 h, mainly in MIC values and 2 x MIC (Figure 2).

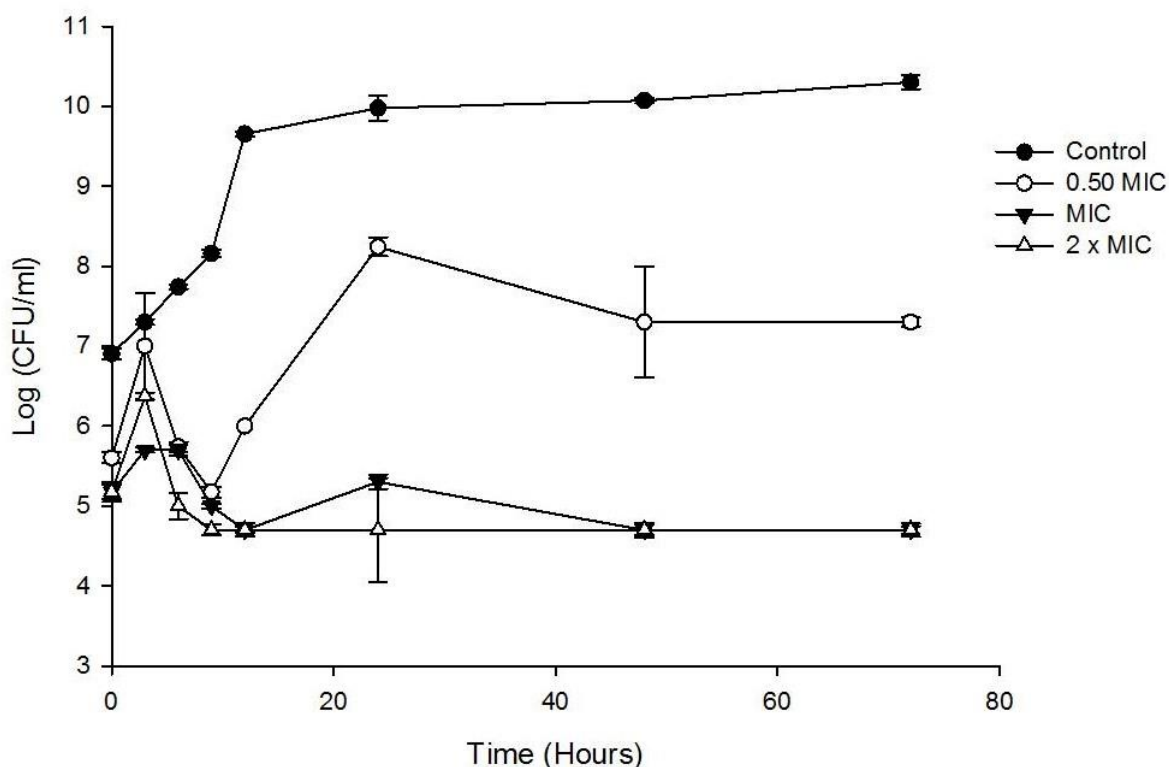


Figure 2. Time-kill curve with the concentrations of 0.50 MIC, MIC, 2 x MIC of the *D. avara* extract against *H. pylori* ATCC 43504. Times evaluated: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h. Each data point represents the mean values (log CFU/mL) \pm standard deviations. The experiment was performed in duplicate.

Combination of the *Dysidea avara* extract with the standard antibiotics Clarithromycin and Amoxicillin against *H. pylori*.

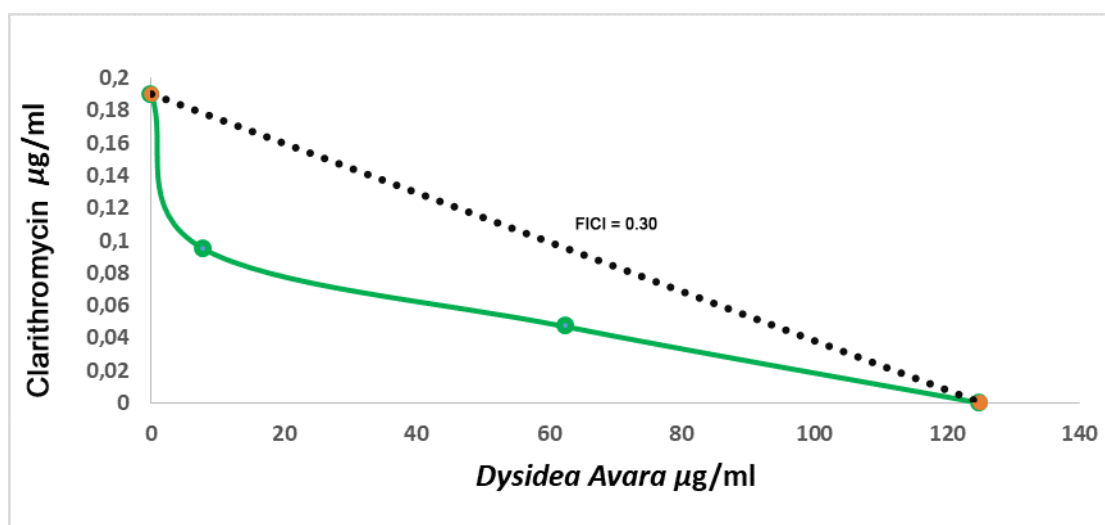
The technique to evaluate the combination of substances, known as "Checkerboard", consists on the unique combination of different concentrations of drugs tested in which the percentage of inhibition of bacterial growth is determined in the presence of different combinations of these drugs compared to the control. The results of the combination of the *D. avara* extract with the standard antibiotics CLA and AMOX are shown in Table 3 and Figure 4, through the FICI values (CLA and AMOX + *D. avara*) and the isobologram of CLA, respectively. The therapeutic interactions are described as synergistic, indifferent and additive. Values that presented $FICI \leq 0.5$ represent synergistic interactions. Values such as $0.5 < FICI < 4$ do not present interactions or are indifferent and, finally, FICI values ≥ 4 present

antagonistic interactions (ODDS, 2003). The FICI value presented by the combination of the *D. avara* extract with CLA was 0.30. The combination of the extract and AMOX was 2. These values showed that the extract was effective, therefore it had synergic effect only when combined with the CLA. When combined with AMOX, the *D. avara* extract was indifferent.

Table 3. MIC values of the standard antibiotics, *D. avara* extract and the combination of them.

Strain	Antibiotic	(µg/mL)		Σ FICI
		MIC		
		Antibiotic (comb./alone)	<i>D. avara</i> (comb./alone)	
<i>H. pylori</i>	CLA	0.047/0.19	7.81/125	0.30
	AMOX	0.39/0.39	125/125	2

Figure 4. Isobologram representing synergism between the extract of *D. avara* and Clarithromycin (CLA). The dotted line indicates the theoretical additive activity.



Evaluation of the antioxidant activity

Several mechanisms may be involved with the antioxidant capacity of a sample, thus, it becomes interesting to evaluate the anti radical ability of the *D. avara* extract by more than one methodology. Among the *in vitro* methods that quantify the antioxidant activity, stands out the DPPH•, which evaluates the ability of the sample to sequester the radical DPPH • 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl by transferring an electron or an atom, the FRAP, which is based on the reduction of the ferric ion to ferrous ion at low pH, and the xanthine oxidase (XOD) method, which evaluates the ability of the sample to sequester the superoxide anion (O₂ • -) produced from of the oxidation of xanthine to uric acid. The *D. avara* extract showed high antioxidant capacity in all the methodologies used (Table 5), where it showed antioxidant potential equivalent to quercetin in the FRAP methodology (10.44 ± 0.37 mM ET/g) and very close to quercetin in the XOD and DPPH method (IC₅₀ 5.85 ± 0.09 µg/mL and 0.23 ± 0.01 µg/mL, respectively).

Table 5: Antioxidant capacity of the *D. avara* extract evaluated by the DPPH, ABTS•+, FRAP e XOD.

Samples	DPPH• (IC₅₀ - µg/mL)	FRAP (mM ET/g)	XOD (IC₅₀ - µg/mL)
<i>D. avara</i>	5.85 ± 0.09*	10.44 ± 0.37	0.23 ± 0.01*
QT	2.53 ± 0.05	11.47 ± 0.48	0.14 ± 0

Data presented as mean ± standard deviation; TE: Trolox equivalent; IC₅₀: 50% inhibitory concentration; QT: quercetin; Coefficient of variation <5%. * indicates significant difference according to the Tukey test (p <0.05).

Morphological and structural changes

According to the result obtained by Time-kill curve assay, the time of 48 h of treatment was established for both the MEV and MET analyzes. This time was defined as at 48 h the bacteriostatic activity of the *D. avara* extract was shown and a decrease in viable cells stabilized. *H. pylori* was exposed to different concentrations of the *D. avara* extract as 2 x MIC (250 µg/mL), MIC (125 µg/mL) and 0.5 x MIC (62.5

$\mu\text{g/mL}$) for MEV and MIC and 0.5 x MIC for MET, with its respective controls (*H. pylori* untreated). These analyzes determined morphological and ultrastructural alterations of the bacteria resulted from the treatment made with the extract. The morphological changes were verified through the MEV after 48 h of treatment. Rounded cells were observed at subinhibitory concentrations (0.5 x MIC) (Figure 6B). This rounding became more evident according to the increase of concentrations, MIC (Figure 6C) and 2 x MIC (Figure 6D). At the highest concentration, 2 x MIC, the bacterial cell presented an evident roundness and, furthermore, its cell wall showed small signs of wrinkling (Figure 6D). The MET detected ultrastructural changes in cell wall of *H. pylori* as well as the decrease of its electro density probably due to its loss of cellular content. In figures 7A and 7B, where control is indicated, *H. pylori* showed regular forms with intact surfaces. Rounded cells and cell wall disintegration were observed in Figures 7C, 7D and 7F. Cells less electrodensities were observed in Figure 7E.

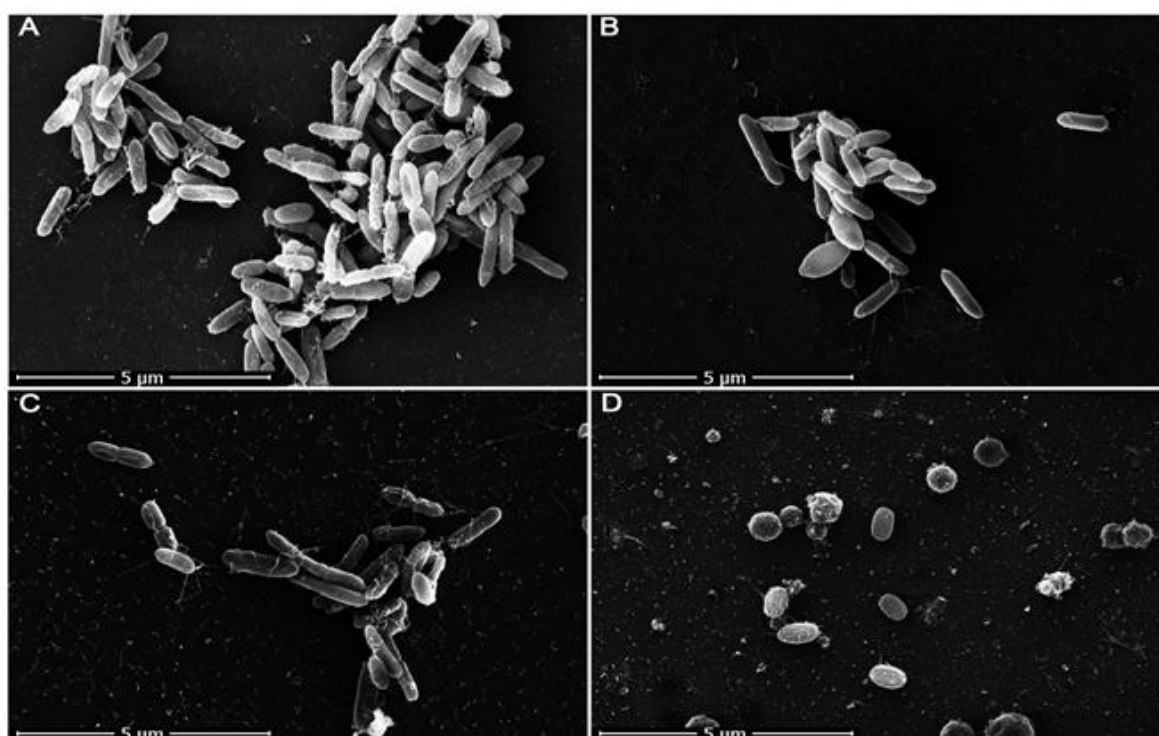


Figure 6: Scanning Electron Microscopy of *H. pylori* treated with different concentrations of the *Dysidea avara* extract. (A) Control; (B) 0.5 x MIC (62.5 $\mu\text{g/mL}$); (C) MIC (125 $\mu\text{g/mL}$); (D) 2 x MIC (250 $\mu\text{g/mL}$). Bars: 5 μm .

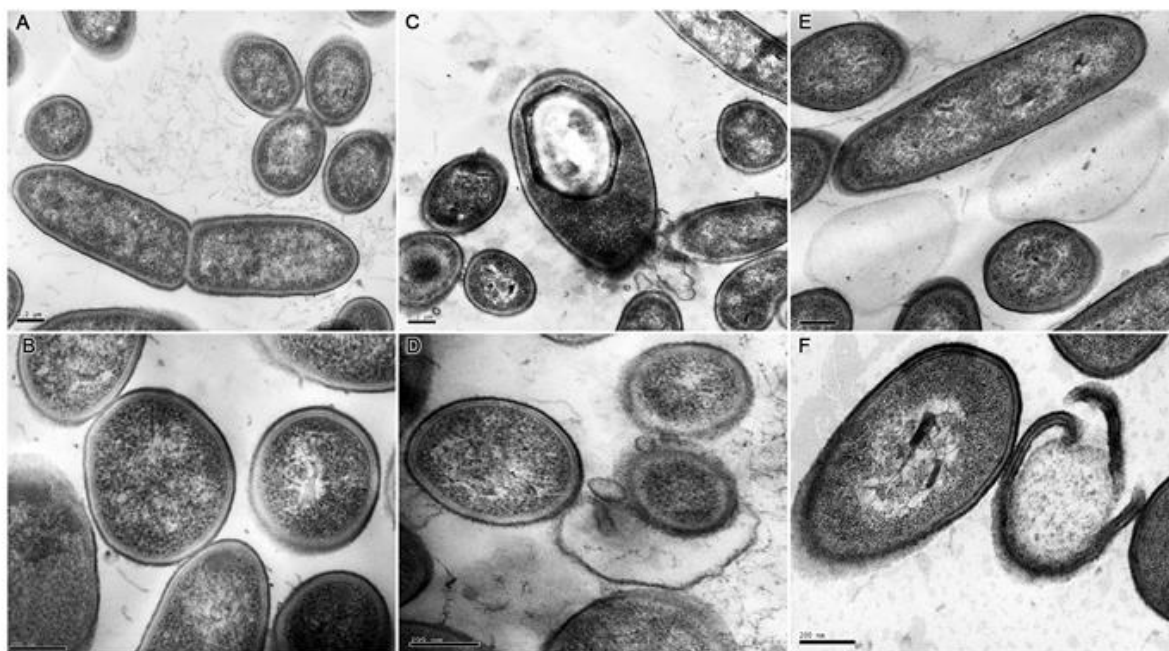


Figure 7: Scanning Electron Microscopy of *H. pylori* treated with different concentrations of *Dysidea avara* extract. (A and B) Control; (C and D) 0.5 x MIC (62.5 µg/mL); (E and F) MIC (125 µg/ml). Bars A, C and E = 0.2 µm; Bars B, D and F = 200 nm.

DISCUSSION

The search for new treatments to treat *H. pylori* infection has grown considerably. It is noteworthy that the high rate of antibiotic resistance related to classical therapy, the adverse effects and the poor adherence to the treatment are the main triggers of the decrease in the eradication of this bacterium (WU et al., 2014).

Marine biodiversity favors a rich environment of animals and plants and, therefore, its components have the potential to be tested against a wide range of microorganisms (SIMÕES et al., 2017). The genus *Dysidea* has already exhibited potent activity against microorganisms.

For *H. pylori*, *D. avara* extract presented moderate activity (HOLETZ et al., 2002; CARREIRA DE PAULA et al., 2015), with a minimum inhibitory concentration of 125 µg/mL (Table 1). The death kinetics of the bacteria against the extract were determined through the time-kill curve assay, where the concentrations of 125 µg/mL (MIC) and 250 µg/mL (2 x MIC) showed a decrease in bacterial viability to the control

in 12 h, and thus, they remained constant until 72 h, demonstrating the bacteriostatic activity of the extract (Figure 2). In the treatment of *H. pylori*, the antibiotic used in the therapy, clarithromycin has also a bacteriostatic (CLSI, 2012) activity therefore this fact does not forbid that the sea sponge extract be a potential drug for the therapy of this infection.

The use of the drugs combination in the current therapy is recommended and also a strong ally to the activity tests *in vitro* against a series of pathologies such as cancer, diabetes, inflammation and infections (FEALA et al., 2010). The association of clarithromycin and *D. avara* extract showed a synergistic result between the two substances at the lowest inhibitory concentrations of each (Table 3 and Figure 4). This fact indicates the reduction of the side effects caused by the therapy (YIN et al., 2014) and the possible decrease of *H. pylori* bacterial resistance to clarithromycin.

H. pylori infected individuals present an intense inflammatory response with the release of a large amount of cytokines (SHARMA et al., 1995) that may activate defense cells, such as neutrophils, that release ROS in an attempt to eliminate the infectious agent. The high ROS production in the infection lesions caused by *H. pylori* becomes more serious, as well as contributing to the development of gastric adenocarcinoma (ISRAEL, 2001; DRAKE et al., 1996). Thus, in addition to the inhibition of bacterial growth, compounds with antioxidant capacity may assist in the protection of the cells against the damage caused by ROS generated during the infection by this bacterium (BAGCHI et al., 2002). The *D. avara* extract showed a good antioxidant when compared to quercetin, flavonoid capable to neutralize EROs and promote the protection of macromolecules against oxidative stress (Table 5).

For the morphological and ultrastructural analysis of the bacteria *H. pylori* treated with different concentrations the *D. avara* extract for 48 h, they suggest a possible action of this extract at the cell surface level, according to MEV results where bacillary forms were swollen, spherical and even wrinkled when submitted to high concentrations of the extract (Figure 6). The ultrastructural forms confirmed the hypothesis of the possible action of this extract showing cells in rounding and the disintegration of the cell wall. Some cells were less electron-dense when submitted to MIC concentration (Figure 7).

CONCLUSION

According to the results obtained in this study, the action of the extract was confirmed and that this induced morphological alterations such as rounding, wrinkling and disintegration of the cell wall, facts that indicate that the extract can act on the cell surface of the bacterium.

The synergistic effect between clarithromycin and sponge *D. avara* causes the reduction of the concentration of the two substances, which consequently leads to fewer side effects. The good antioxidant activity demonstrated, may aid in inflammation of the gastric mucosa.

The results obtained in this study demonstrated that the marine sponge *D. avara* presents an *in vitro* activity against *H. pylori* opening perspectives for studies against this bacterium, giving new alternatives of treatment to this infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported through grants from CNPq, CAPES, Graduate Program in Microbiology of the State University of Londrina, Laboratory of Microbiology applied to the Natural and Synthetic Products of the State University of Maringá, Laboratory of Innovation and Cosmetic Technology of the State University of Maringá and Department of Marine Biology of Fluminense Federal University.

REFERENCES

- AKTAS, N. et al. Avarone and avarol from the marine sponge *dysidea avara* schmidt from aegean coast of Turkey. **Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 3, p. 119–123, 2010.
- BA, L. C. et al., The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **J Am Academy Dermatol**. v. 67 n. 5, 2012.
- BAGCHI D. et al. *Helicobacter pylori* induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 47, n. 6, p. 1405-412, 2002.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidante Power". The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 292, p. 70-76, 1996.

BONACORSI C. **Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de espécies vegetais do Cerrado brasileiro**. 2009. 216f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus de Araraquara. Araraquara, 2009.

BUTCHER L. D et al., Oxidative Stress Resulting From *Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 3, p. 316 – 322, 2017

CARIELLO, L.; ZANETTI, L. Antimicrobial activity of avarol, a sesquiterpenoid hydroquinone from the marine sponge, *Dysidea avara*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 2, p. 281–283, 1982.

CARREIRA DE PAULA, J. et al. Trypanocidal activity of organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 651–656, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for testing antimicrobial sensitivity**. 15 ed., West Valley Road, suite 1400 Wayne, Pennsylvania. USA: NCCLS 2005 [NCCLS document M100-S15 n. 1].

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 9 ed., West Valley Road, suite 1400 Wayne, Pennsylvania. USA: NCCLS 2012 [NCCLS document M7-A9].

DRAKE, I. M. et al. Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 3, p. 559-562, 1996.

EL MASSRY et al. Antioxidante activity and volatile components of *egyptian artemisia judaica l*. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 331-336, 2002.

FEALA, J. D. et al. Systems approaches and algorithms for discovery of combinatorial therapies. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 181–193, 2010.

GIROTTI, S. et al. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, p. 685-692, 2000.

HOLETZ, F. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HU, C. T. et al. Analysis of Resistance to Clarithromycin and Virulence Markers in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates from Eastern Taiwan. **Tzu Chi Medical Journal**,

v. 21, n. 2, p. 123–128, 2009.

ISRAEL, D. A.; PEEK, R. M. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation. **Aliments Pharmacology Therapy**, v. 15, p.1271-290, 2001.

MALFERTHEINER P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht IV / Florence Consensus Report. **Gut**, v. 61, p. 646-664, 2012.

MCCALLION, W. A. et al. *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. **Gut**, v. 39, n. 1, p. 18–21, 1996.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n.3, p. 277-281, 2008

SHARMA, S. A. et al. Interleukin-8 Response of Gastric Epithelial Cell Lines to *Helicobacter pylori* Stimulation *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1681–1687, 1995.

SIMÕES C. et al. Produtos naturais de origem marinha e o desenvolvimento de fármacos e medicamentos. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 28.

SIQUEIRA V. L. D. et al. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3957-3967, 2014.

WU, T. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v.30, p. 167-172, 2014.

YIN, N. et al. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. **Plos one**, v. 9, n. 4, 2014.

5 CONCLUSÃO

O extrato da esponja marinha *Dysidea avara* demonstrou seu efeito antimicrobiano frente à bactéria *Helicobacter pylori*.

Foi comprovado a ação bacteriostática do extrato e que este induziu alterações morfológicas como o arredondamento, o enrugamento e a desintegração da parede celular, fatos que indicam que o extrato possa atuar na superfície celular da bactéria.

O efeito sinérgico entre a claritromicina e a esponja *D. avara*, fazem com que haja a redução da concentração das duas substâncias, que conseqüentemente leva a menores efeitos colaterais. Além disso, a boa atividade antioxidante demonstrada, poderá auxiliar na inflamação da mucosa gástrica.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a esponja marinha *D. avara* apresenta uma atividade *in vitro* contra *H. pylori* abrindo perspectivas para estudos *in vivo* contra essa bactéria, dando novas alternativas de tratamento à essa infecção.

REFERÊNCIAS

- AGHDAM, S. M. et al. Investigation of association between oipA and iceA1/iceA2 genotypes of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 19, p. 8295–8299, 2014.
- AGUILAR, G. R.; AYALA, G.; FIERROS-ZÁRATE, G. *Helicobacter pylori*: recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. **Salud Pública de México**, v. 43, n. 3, p. 237–247, 2001.
- AKOPYANTS, N. S. et al. Analysis of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 37–53, 1998.
- AKTAS, N. et al. Avarone and avarol from the marine sponge dysidea avara schmidt from aegean coast of Turkey. **Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 3, p. 119–123, 2010.
- ATHERTON, J. C. et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin allelis of *Helicobacter pylori*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17771-77, 1995.
- ATHERTON, J. C. et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 112, n. 1, p. 92–99, 1997.
- AZIZ R. K.; KHALIFA M. M.; SHARAF R. R. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: a review. **Journal of Advanced Research**. v. 6, p. 539-547, 2015.
- BLASER, M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **The Journal of clinical investigation**. v. 107, n. 7, p. 767–73, 2001.
- BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 22, n. 2, p. 283–297, 2000.
- CAMMAROTA G. et al. High efficacy of 1 week doxycycline and amoxicillin based quadruple regimen in a culture guided third line treatment approach for *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther**, vol.19, p.789-795 Feb 2004.
- CARIELLO, L.; ZANETTI, L. Antimicrobial activity of avarol, a sesquiterpenoid hydroquinone from the marine sponge, *Dysidea avara*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 2, p. 281–283, 1982.
- CARREIRA DE PAULA, J. et al. Trypanocidal activity of organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 651–656, 2015.
- CENSINI, S. et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. 25, p. 14648–53, 1996.

CHUAH S. et al. A new look at anti-helicobacter pylori therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 17, p. 3971-75, 2011.

COVER, T. L.; BLANKE, S. R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 320–332, 2005.

CRABTREE, J. E. et al. Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. **J Clin Pathol**, v. 52, n. 9, p. 653–657, 1999.

DAVIES G. R. et al. *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. **Gut**, v. 35, p. 179-185, 1994.

DE CARALT, S. et al. In situ aquaculture methods for *Dysidea avara* (demospongiae, porifera) in the Northwestern Mediterranean. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1731–1742, 2010.

DRAKE, I. M. et al. Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 3, p. 559-562, 1996.

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

FLACH C-F et al. A truncated form of HpaA is a promising antigen for use in a vaccine against *Helicobacter pylori*. **Vaccine**. v. 29, p. 1235-241, 2011.

FONG Y. H. et al. Assembly of preactivation complex for urease maturation in *Helicobacter pylori*. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 286, n. 50, p. 43241-249, 2011.

GARZA-GONZÁLEZ E. et al. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 20, n. 6, p. 1438-449, 2014.

GERHARD M. et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. **Medical Sciences**. v. 96, n. 22, p. 12778-783, 1999.

HSU P.I. et al. Quadruple rescue therapy for *Helicobacter pylori* infection after two treatment failures. **European Journal of Clinical Investigation**. v.38, n.6 p.404-409, 2008.

HU, C. T. et al. Analysis of Resistance to Clarithromycin and Virulence Markers in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates from Eastern Taiwan. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 21, n. 2, p. 123–128, 2009.

ILVER, D. et al. *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 167–174, 2004.

KAO, C. Y.; SHEU, B. S.; WU, J. J. CsrA regulates *Helicobacter pylori* J99 motility and adhesion by controlling flagella formation. **Helicobacter**, v. 19, n. 6, p. 443–454, 2014.

KIM, I. J.; BLANKE, S. R. Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 27, p. 1–18, 2012.

KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A. M. D. U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 356–369, 2002.

KRAKOWKA, S. et al. Gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 681–685, 1991.

MADIGAN, M. T., Doenças Microbianas de transmissão interpessoal, **Microbiologia de Brock**, São Paulo, SP: Artmed, 2010. um.9, cap. 34, p.982-984.

MAHDAVI J. et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation, **Science**, v. 297, n. 573, p. 572-578, 2002.

MAJUMDAR D., BEBB J., ATHERTON J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 39, n. 3, p. 154-161, 2011.

MALFERTHEINER P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht IV / Florence Consensus Report. **Gut**, v. 61, p. 646-664, 2012.

MARKOVSKA R. et al. *Helicobacter pylori* oipA genetic diversity and its associations with both disease and cagA, vacA, s, m, and i alleles among Bulgarian patients. **Diagnostic Microbiology and Infections disease**. v. 71, p. 335-340, 2011.

MARSHALL B. J; WARREN J. B. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, p. 1311-15, 1984.

MARSHALL, B. *Helicobacter pylori*. 20 years on. **Clin Med JRCPL**, v. 2, n. 2, p. 147–152, 2002.

MCCALLION, W. A. et al. *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. **Gut**, v. 39, n. 1, p. 18–21, 1996.

MEHBUB, M. F. et al. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. **Marine Drugs**, v. 12, n. 8, p. 4539–4577, 2014.

MIZUSHIMA, T. et al. Clinical Relevance of the babA2 Genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 1–4, 2001.

MURRAY P.R.; ROSENTHAL K. S.; PFALLER M. A. Bacteriologia: *Campylobacter e*

Helicobacter. **Microbiologia Médica**, Rio de Janeiro, RJ: Elsevier. 2011. Seção 5, cap. 32, p. 321-328.

NAKAMURA, H. et al. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 10, p. 4832–4837, 1998.

NDIP, R. N. et al. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 36, n. 5, p. 616–622, 2003.

ODENBREIT, S. et al. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1537–1548, 1999.

ODENBREIT, S. Adherence properties of *Helicobacter pylori*: Impact on pathogenesis and adaptation to the host. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 5, p. 317–324, 2005.

OPPONG, P. et al. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 43, n. 4, p. 215–222, 2015.

PARK, J. B.; KOO, J. S. *Helicobacter pylori* infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 11, p. 2751–2759, 2014.

PARSONNET, J. et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v. 40, p. 297–301, 1997.

PECK B. et al. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 16, p. 3325–3333, 1999.

PRINZ, C. et al. Key Importance of the *Helicobacter pylori* Adherence Factor Blood Group Antigen Binding Adhesin during Chronic Gastric Inflammation. **Cancer Research**, v. 61, p. 1903–1909, 2001.

RAMOS, A. R.; SÁNCHEZ, R. S. Contribución de Latinoamérica al estudio del *Helicobacter pylori*. **Acta Gastroenterológica Latinoamerica**. v. 39, n. 3, p. 197–218, 2009.

SALVADORI, D. M. F.; LADEIRA, M. S. P.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 4, p. 335–342, 2003.

SANTOS, J. C.; RIBEIRO, M. L. Epigenetic regulation of DNA repair machinery in *Helicobacter pylori* induced gastric carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 30, p. 9021–9037, 2015.

SAVARINO V. et al. The impact of antibiotic resistance on the efficacy of three 7 day

regimens against *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14, n. 7, p. 893-900, 2000.

SHARMA, S. A. et al. Interleukin-8 Response of Gastric Epithelial Cell Lines to *Helicobacter pylori* Stimulation *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1681–1687, 1995.

SIMÕES C. et al. Produtos naturais de origem marinha e o desenvolvimento de fármacos e medicamentos. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 28.

SOZZI, M. et al. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 5, p. 262–270, 2005.

TANIH, N. F. et al. An overview of pathogenesis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6, p. 426–436, 2010.

TOMBOLA, F. et al. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 6, p. 929–937, 2001.

TONKIC, A. et al. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2012.

TRABULSI L. R., ALTHERTUM F. Microbiologia. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

TREIBER G. et al. Impact of furazolidone based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* after previous treatment failures. **Helicobacter**, v. 7, n. 4, p. 225-231, 2002.

TURK, T. et al. Biological activities of ethanolic extracts from deep-sea antarctic marine sponges. **Marine Drugs**, v. 11, n. 4, p. 1126–1139, 2013.

UNEMO, M. et al. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 15390–397, 2005.

WATARI, J. et al. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n.18, p. 5461-473, 2014.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1249–1259, 2001.

WEN, S.; MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 282, p. 1-8, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **National Cancer Control Programmes**, 2 ed.,

2002.

WOTHERSPOON A. C. et al. *Helicobacter pylori* associated gastritis and primary B-cell gastric. **The Lancet**, v. 338, p. 1175-1176, 1991.

WU, T. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v.30, p. 167-172, 2014.

ZENG M. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v.383, n. 10002, p.1457-464, 2015.