

**“Influência da amoxicilina na virulência do
Helicobacter pylori”**

Orientada: Fabiana Cristina Donofrio

Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Co-orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

ARARAQUARA

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

Fabiana Cristina Donofrio

**“Influência da amoxicilina na virulência do
Helicobacter pylori”**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara, para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Co-orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

ARARAQUARA

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Donofrio, Fabiana Cristina

D674i Influência da amoxicilina na virulência do *Helicobacter pylori* / Fabiana
Cristina Donofrio. – Araraquara, 2012
128 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Maria Stella Gonçalves Raddi

Coorientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. *Helicobacter pylori*. 2. Concentrações subinibitórias. 3. Amoxicilina.
4. Óxido nítrico. 5. Citocinas. 6. Apoptose. 7. Macrófagos. 8. Proteômica. I.
Raddi, Maria Stella Gonçalves, orient. II. Carlos, Iracilda Zeppone, coorient.
III. Título.

FABIANA CRISTINA DONOFRIO

**“Influência da amoxicilina na virulência do
Helicobacter pylori”**

A Comissão examinadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27/04/2012, considerou a candidata: (**X**) **Aprovada** () **Reprovada**

**Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi
(Orientadora e Presidente)**

**Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite
(Membro Titular)**

**Prof. Dr. Emanuel Carrilho
(Membro Titular)**

**Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
(Membro Titular)**

**Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
(Membro Titular)**

“Não percas a tua fé entre as sombras do mundo. Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo. Crê e trabalha. Esforça-te no bem e espera com paciência. Tudo passa e tudo se renova na terra, mas o que vem do céu permanecerá. De todos os infelizes os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmo, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo. Eleva, pois, o teu olhar e caminha. Luta e serve. Aprende e adianta-te. Brilha a alvorada além da noite. Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte. Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.”

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Antonio Carlos Donofrio e Maria de Lourdes M. T. Donofrio, por todo amor, carinho, ajuda, compreensão e incentivo em cada passo da minha vida profissional.

Ao meu filho Giovanni, meu bem maior, por toda alegria proporcionada em todos os momentos difíceis, Gigio você fez parte integral desta tese, nasceu e conviveu junto com a mamãe em todos os momentos....você é minha vida.

Ao meu marido Vinicius, por todo amor, atenção, ajuda e paciência em todos os meus momentos de “neura”.

Ao meu querido irmão Marcelo, cunhada Thaís e afilhado Thales Eduardo pelo amor, amizade, e incentivo.

Aos amigos, pelos “ombros” fornecidos nos momentos mais difíceis, carinho, atenção e compreensão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Maria Stella Gonçalves Raddi pela ajuda no momento que mais precisei, orientação, apoio nas dificuldades e confiança sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

À minha amiga Juliana Cristina da Silva pelo ombro fornecido em todos os momentos de dificuldade, ajuda, amizade, carinho e incentivo.

À minha amiga Elaine Miranda Toscano por toda ajuda, amizade, alegria, carinho, incentivo, atenção e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À minha amiga Danielle Maia por toda ajuda, amizade, alegria, atenção, incentivo, desabafos e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À minha amiga Cibele Bonacorsi, por toda ajuda, amizade, consolo nos momentos difíceis, desabafos e dicas para a realização deste trabalho.

À Regiane Traversolo Sacomano por toda ajuda, paciência em me ouvir, amizade presente em todos os nossos momentos difíceis e novas conquistas e realizações.

À minha amiga Michelle Rocha Parise por toda ajuda, amizade, atenção e incentivo.

À amiga Lillian Cristiane Baeza por toda ajuda, amizade e carinho.

À amiga Karina Ponsoni por toda ajuda, amizade e carinho.

À Jennifer Ferrezini por toda ajuda na realização da eletroforese bidimensional e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Thiago Mazzu e Thiago Segatto por todo consolo e ombro amigo nos momentos mais difíceis e alegrias pela nossa nova conquista.

Á Mariana Fioramonte pela atenção e ajuda na identificação das proteínas.

A Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos pela colaboração e ajuda em todos os momentos difíceis e disponibilidade do laboratório para a realização dos ensaios com citocinas.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho pela grande colaboração, ajuda em todos os momentos difíceis e disponibilidade do laboratório para a realização da eletroforese bidimensional.

Ao Prof. Dr. Fábio Gozzo pela grande colaboração e disponibilidade do laboratório para a identificação das proteínas.

Aos amigos do Laboratório de Bioanalítica, Microfabricação e Separações da USP – São Carlos: Adriano Aquino, Fayene Souza, Juliana Alberice, Karina Fraige, Maribel Funnes, Juliana e Rubiane Borba, Flávio Picheli, Sheila Guterres, Julia Postigo, Guilherme Mizziara, Patrícia Eugênio, Alessandra Maffei, Esmeraldo Cappelaro por toda ajuda e convivência, além de ensinamento e amizade.

Aos amigos da Imunologia Clínica: Djamile Matos, Aline Tansini, Marisinha por toda ajuda e pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos amigos da Citologia Clínica: Felipe e Bel por toda ajuda e pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus alunos da Biomedicina Unicep – São Carlos por toda alegria, amizade e carinho.

Às amigas professoras Daniela Neo e Cristiane Ferino pela amizade e carinho.

Aos docentes pelos ensinamentos, ajuda e carinho.

À Eliana Cainelli Godoy pela ajuda e atenção.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação e Biblioteca, pela amizade, ajuda e atenção.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

A todos que estiveram comigo em todos os momentos, agradeço de coração.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.

Recebeu apoio financeiro do PADC (Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior).

CAPÍTULO 1

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. Introdução.....	25
2. Objetivos.....	36
2.1. Objetivos gerais.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. Materiais e Métodos.....	37
3.1. Microrganismo.....	37
3.2. Antimicrobiano.....	37
3.3. Linhagem Celular.....	37
3.4. Determinação da atividade antibacteriana.....	38
3.5. Preparo do inóculo.....	39
3.6. Ensaio em macrófagos.....	40
3.6.1. Manutenção.....	40
3.6.2. Infecção celular.....	40
3.6.3. Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO).....	41
3.6.4. Determinação dos níveis de citocinas.....	42

3.6.5. Avaliação da viabilidade.....	43
3.6.6. Morte de macrófagos infectados com <i>H. pylori</i> avaliados por citometria de fluxo (Anexina V).....	44
3.7. Análise proteômica.....	46
3.7.1. Extração proteica.....	46
3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	47
3.7.2.1. Coloração dos géis pelo nitrato de prata.....	48
3.7.3. Análise proteica por eletroforese bidimensional.....	49
3.7.4. Tripsinização de proteínas de <i>H. pylori</i> e análise por espectrometria de massas Synapt HDMS.....	50
3.8. Análise estatística.....	51
4. Resultados.....	52
4.1. Atividade anti - <i>Helicobacter pylori</i>	52
4.2. Indução da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos por <i>H. pylori</i>	53
4.3. Indução das citocinas por macrófagos infectados com <i>H. pylori</i>	55
4.3.1. Interleucina - 1 β e interleucina - 12.....	55
4.3.2. Interleucina - 6.....	56
4.3.3. Fator de Necrose Tumoral - α	58
4.3.4. Fator transformador de crescimento - β	60
4.3.5. Interleucina - 10.....	62
4.4. Viabilidade celular após infecção com <i>H. pylori</i> através da	

técnica de MTT.....	63
4.5. Morte de macrófagos infectados com <i>H. pylori</i> avaliados por citometria de fluxo.....	65
4.6. Perfil eletroforético dos extratos de <i>Helicobacter pylori</i>	68
4.7. Análise protéica por eletroforese bidimensional de extratos de <i>H. pylori</i>	70
5. Discussão.....	78
6. Considerações finais.....	86
7. Referências.....	87

RESUMO

Helicobacter pylori é o principal agente etiológico causador da gastrite crônica, úlcera péptica, adenocarcinoma e linfoma gástrico. Concentrações subinibitórias de antimicrobianos podem modificar os fatores de virulência da bactéria e, conseqüentemente, a relação micro-organismo/hospedeiro, podendo alterar a progressão da infecção. Este estudo avaliou fatores de virulência de *H. pylori* cultivados em $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da concentração inibitória mínima de amoxicilina que poderiam alterar a liberação de citocinas, indução de óxido nítrico e apoptose em macrófagos RAW 264.7 infectados. A análise proteômica foi realizada por eletroforese bidimensional e a identificação das proteínas diferencialmente expressas através da digestão por tripsina e espectrometria de massas. A indução de óxido nítrico foi analisada através do reagente de Griess, as citocinas (interleucina - 1 beta, interleucina - 6, interleucina - 10, interleucina - 12, fator de necrose tumoral alfa e fator transformador de crescimento - beta) por ensaio imunoenzimático e apoptose por citometria, após 24 horas de infecção. Nossos resultados demonstraram que *H. pylori* previamente mantidos em sub-CIMs de amoxicilina apresentaram maior expressão de proteínas de choque térmico, enolase, argininosuccinato sintase, superóxido dismutase, ATP alfa sintase e proteína ativadora de neutrófilo, proteínas capazes de aumentar a indução de NO, IL - 1 β e IL - 12 e apoptose em relação à macrófagos infectados com *H. pylori* sem tratamento. Estes resultados sugerem que a amoxicilina em concentrações subinibitórias pode estimular a resposta imune no hospedeiro através da indução de alguns fatores de virulência e determinados mediadores inflamatórios por *H. pylori*.

Palavras – chave: *Helicobacter pylori*, concentrações subinibitórias, amoxicilina, óxido nítrico, citocinas, apoptose, macrófagos, proteômica.

ABSTRACT

The infection caused by *Helicobacter pylori* is considered a major etiology agent in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric carcinoma and gastric lymphomas. Sub-inhibitory concentrations of antibiotics have been shown to change virulent expression of microorganisms, which may change the progression of infection. This study assessed virulence factors of *H. pylori* after contact with $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ the minimal inhibitory concentration of amoxicillin sub-inhibitory concentrations of amoxicillin that could modify the induction of cytokines, nitric oxide and apoptosis by infect RAW 264.7 macrophage-like cells. The proteomic analysis was realized by two dimensional electrophoresis and proteins differential expressions were characterized by tryptic digestion and mass spectroscopy. The induction of nitric oxide was assayed by Griess reagent, cytokines (interleukin – 1 beta, interleukin - 6, interleukin - 10, interleukin – 12, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor - beta) by Enzyme-Liked Immunoabsorbent Assay and apoptosis by annexin V - fluorescein isothiocyanate after 24 hours. Our results demonstrated that *H. pylori* previously maintained in sub - MICs of amoxicillin showed higher expression of virulence factors such as heat shock proteins, enolase, argininosuccinate synthetase, superoxide dismutase, ATP synthase alpha and neutrophil-activating protein inducing more oxide nitric, interleukin - 1 β and interleukin – 12 and increased apoptosis than macrophages infected with *H. pylori* without treatment. These results suggest that amoxicillin, at sub-inhibitory concentrations, could contribute to the stimulation of immune response in the

host by inducing over-expression of virulence factors of *H. pylori* and specific inflammatory mediators.

Key Words: *Helicobacter pylori*; sub-inhibitory concentration, amoxicillin, nitric oxide, cytokines, apoptosis, macrophages, proteomics.

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
ACN	Acetonitrila
AMX	Amoxicilina
ATP	Adenosina trifosfato
ANEX	Anexina V
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
β	Beta
BabA	Antígeno de grupo sanguíneo
BHI	Infusão-cérebro-coração
CagA	Citotoxina associada ao gene A
cag-PAI	Marcador da ilha de patogenicidade <i>Cag</i>
Cl ⁻	Cloreto
CO ₂ .	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
h	Hora
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HP	<i>Helicobacter pylori</i>

Hsp	Proteína de choque térmico
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INF-γ	Interferon - gama
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molaridade
mg	Miligrama
μg	Micrograma
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
N	Normal
nm	Nanômetro
NAP	Proteína ativadora de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NF-κB	Fator <i>kappa</i> B nuclear
O₂	Oxigênio molecular
O₂⁻	Ânion superóxido
OH[·]	Radical hidroxil
¹O₂	Oxigênio singleto
OMPs	Proteínas da membrana externa
pg	Picograma
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com 0,1% de tween-20

PI	Iodeto de propídio
<i>pI</i>	Ponto isoelétrico
PMSF	Fenilmetilsufonil fluoreto
Q	Quadrante
RNA	Ácido ribonucléico
SBF	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
sub-CIMs	Concentrações subinibitórias
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UDO	Unidade de densidade óptica
UFC	Unidade formadora de colônia
VacA	Citotoxina vacuolizante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Helicobacter pylori</i> cepa ATCC 43504 (1000X) corada pelo método de Gram.....	37
Figura 2: Distribuição de fluorescência do tubo controle contendo apenas macrófagos pela técnica de citometria de fluxo: Anexina <i>versus</i> PI. Q1: células mortas (A-PI+); Q2: células em estágio de apoptose tardia/necrose (A+PI+); Q3: células viáveis (A-PI-); Q4: células em estágios iniciais de apoptose (A+PI-).....	45
Figura 3: Efeito dose-resposta de diferentes concentrações de amoxicilina no crescimento de <i>H. pylori</i> após 72 horas de incubação..	52
Figura 4: Indução de óxido nítrico em macrófagos após infecção com <i>H. pylori</i> por 6, 24 e 48 horas.....	53
Figura 5: Concentrações de IL – 1 β e IL - 12 liberadas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com <i>H. pylori</i>	55
Figura 6: Concentração de IL - 6 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com <i>H. pylori</i>	57
Figura 7: Concentração de TNF - α liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com <i>H. pylori</i>	59

Figura 8: Concentração de TGF - β liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com <i>H. pylori</i>	61
Figura 9: Viabilidade de macrófagos após 6, 24 e 48 horas de infecção com <i>H. pylori</i>	64
Figura 10: Apoptose de macrófagos após 6, 24 e 48 horas de infecção com <i>H. pylori</i> determinada por citometria de fluxo.....	67
Figura 11: SDS-PAGE dos extratos de <i>H. pylori</i> mantidos em diferentes concentrações de AMX por 24, 48 e 72 horas, corado pelo nitrato de prata.....	69
Figura 12: Géis obtidos por eletroforese bidimensional dos extratos proteicos de <i>H. pylori</i> mantido em 0,063 $\mu\text{g/mL}$ (A), 0,125 $\mu\text{g/mL}$ (B), 0,250 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina (C) e na ausência (D) por 24 horas, corados por Coomassie Blue R-250.....	71
Figura 13: Géis obtidos por eletroforese bidimensional dos extratos proteicos de <i>H. pylori</i> mantido em 0,063 $\mu\text{g/mL}$ (A), 0,125 $\mu\text{g/mL}$ (B), 0,250 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina (C) e na ausência (D) por 48 horas, corados por Coomassie Blue R-250.....	73
Figura 14: Seleção de proteínas/spots diferencialmente expressos (% volume) identificados por Waters Synapt HDMS.....	75
Figura 15: Seleção de proteínas/spots diferencialmente expressos (% volume) identificados por Waters Synapt HDMS.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de NO por macrófagos infectados com <i>H. pylori</i> mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 6, 24 e 48 horas de incubação.....	54
Tabela 2: Indução de IL - 1 β e IL - 12 em macrófagos por <i>H. pylori</i> mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação.....	56
Tabela 3: Indução de IL-6 em macrófagos por <i>H. pylori</i> mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação.....	58
Tabela 4: Indução de TNF- α em macrófagos por <i>H. pylori</i> mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação.....	60
Tabela 5: Indução de TGF - β em macrófagos por <i>H. pylori</i> mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação.....	62
Tabela 6: Viabilidade de macrófagos infectados com <i>H. pylori</i> mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 6, 24 e 48 horas.....	65
Tabela 7: Apoptose precoce e apoptose tardia/necrose em macrófagos infectados com <i>H. pylori</i> mantidos ou não em diferentes	

concentrações de AMX após 6, 24 e 48 horas de incubação.....	68
--	----

Tabela 8: Proteínas/spots diferencialmente expressas de <i>H. pylori</i> cultivado em concentrações subinibitórias de amoxicilina após 24 e 48 horas de incubação identificadas por Synapt HDMS.....	77
---	----

1. Introdução

A infecção causada pelo *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica é considerada uma das infecções crônicas bacterianas mais comum em seres humanos e está intimamente associada à úlcera péptica, adenocarcinoma e linfoma gástrico (CORREA et al., 2006; KUSTERS et al., 2006).

H. pylori é uma bactéria Gram negativa, espiralada, microaerófila, com 4 a 6 flagelos unipolares envolvidos por bainha (O'TOOLE et al., 2000) de 2 a 4 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura, mas que também pode ser encontrada na forma cocóide (KUSTERS et al., 1997). A morfologia espiralada caracteriza a forma viável ou ativa da bactéria e a reversão para a forma cocóide pode ser importante para a sua fisiopatologia e transmissão, entretanto, estes mecanismos ainda não estão bem esclarecidos (CITTERIO et al., 2004; AZEVEDO et al., 2007).

Embora a infecção por *H. pylori* ocorra mundialmente, em países desenvolvidos a porcentagem de indivíduos infectados oscila entre 25 % a 50 % e há indícios de que esteja diminuindo, enquanto que em países emergentes essa taxa é maior, podendo chegar a 90 % (PEREZ-PEREZ et al., 2004; MALATY, 2007). No entanto, somente 10 % a 20 % das pessoas infectadas apresentam manifestações clínicas que, geralmente, aparecem após anos da infecção (HOFMAN et al., 2004). Diversos estudos demonstram que o período de maior aquisição da infecção pelo *H. pylori* é na infância, nos cinco primeiros anos de vida (KODAIRA et al., 2002; BEDOYA et al., 2003).

O desenvolvimento de doenças decorrente da infecção por *H. pylori* é determinada pela interação complexa e dinâmica entre fatores do hospedeiro e

da bactéria e devem ser consideradas, além do fator etiológico (diversidade da sequência do DNA, ou seja, polimorfismo bacteriano), as características genéticas e imunológicas do hospedeiro e sua inserção ambiental (LU et al., 2005; CHIBA et al., 2006). Outros fatores que podem estar associados à alta prevalência da infecção incluem fumo, consumo de álcool, dieta, exposições ocupacionais, práticas de higiene, densidade populacional, fatores sociais e histórico familiar de doenças gástricas (ARSLAN et al., 2009; CHEN et al., 2009; GONZÁLEZ; LÓPEZ-CARRILLO, 2010; ZHANG et al., 2010).

Os principais fatores de virulência envolvidos na patogênese do *H. pylori* são importantes para o desenvolvimento e gravidade das doenças gastroduodenais, resposta inflamatória da mucosa e alteração da secreção ácida gástrica (FIGUEIREDO et al., 2005; ROMERO-ADRIÁN et al., 2009). Dentre os fatores de virulência temos a produção de urease, da citotoxina vacuolizante VacA e da proteína CagA (citotoxina associada ao gene A), entre outros (KIST et al., 2005).

A urease é uma enzima expressa por *H. pylori* podendo compor entre 10 % a 15 % das proteínas totais dessa bactéria. A urease nativa de *H. pylori* promove a hidrólise da ureia presente no suco gástrico, a amônia, com consequente aumento do pH, permitindo, assim, a sobrevivência do *H. pylori* no ambiente hostil do estômago, o que, sem este atributo biológico, não teria condições de colonizar a mucosa (SCOTT et al., 2002; KHAN et al., 2009).

Na fase inicial da colonização, *H. pylori* produz a enzima mucinase, que tem atividade endopeptidásica e capacidade de degradar a camada de muco que protege o epitélio gástrico, sendo este um dos mecanismos que favorece a progressão da infecção (JENKS; KUSTERS, 2000; FERNANDEZ, 2004). A

capacidade de mover-se facilmente, devido à morfologia em espiral e aos flagelos, estabelece íntimo contato com as células epiteliais (O'TOOLE et al., 2000). Outras enzimas, tais como superóxido dismutase, catalase e arginase conferem proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (GOBERT et al., 2001; CHATURVEDI et al., 2007; WILSON; CRABTREE, 2007) e, consequentemente, a sua sobrevivência na mucosa gástrica.

A adesão do *H. pylori* ao epitélio gástrico é realizada através de adesinas, sendo de grande importância para a colonização e patogênese, facilitando a liberação de produtos tóxicos produzidos pela bactéria, além de estimular a produção de citocinas pelas células epiteliais (MAHDAVI et al., 2002; ASPHOLM-HURTING et al., 2004). A adesina mais conhecida é a proteína BabA (antígeno de grupo sanguíneo), codificada pelo gene BabA, que permite a adesão da bactéria ao antígeno do grupo sanguíneo Lewis, presente nas células gástricas, facilitando a liberação de fatores de virulência (BACKSTROM et al., 2004; COLBECK et al., 2006). Outras adesinas foram descritas, sendo a maioria delas membros da família das proteínas de membrana externa (OMPs), tais como SabA e HopZ (MAHDAVI et al., 2002; SOLNICK et al., 2004; ASPHOLM et al., 2006). Todas as adesinas parecem utilizar lipídios, gangliosídeos e carboidratos como receptores nas células epiteliais (EVANS JR; EVANS, 2000).

Várias moléculas produzidas por *H. pylori* atuam nas células da mucosa gástrica, levando ao desenvolvimento de inflamação e formação de úlceras. Entre essas moléculas podemos destacar a VacA, uma toxina oligomérica, multifuncional, que forma poros na membrana celular, permitindo a saída de

ânions e ureia, levando a perda da homeostase e tonicidade celular, com consequente aumento da permeabilidade intercelular (COVER; BLANKE, 2005; IVIE et al., 2008). O aumento de permeabilidade celular proporciona uma maior quantidade de nutrientes para *H. pylori*, enquanto que ureia é importante na proteção da bactéria contra o pH ácido. A ligação de formas monoméricas de VacA à receptores na célula do hospedeiro pode desencadear alterações no citoesqueleto e desprendimento celular (FUJIKAWA et al., 2003). VacA também pode formar poros na membrana mitocondrial, permitindo a saída de citocromo C para o citoplasma, induzindo apoptose celular (COVER et al., 2003; MANENTE et al., 2008).

H. pylori também é capaz de produzir a proteína NAP (proteína ativadora de neutrófilos), fator quimiotático para neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção, que estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e indução da resposta inflamatória, ocasionando danos ao DNA celular da mucosa gástrica (POLENGHI et al., 2007; WANG et al., 2008).

Outra molécula importante para a patogenicidade de *H. pylori* é a proteína CagA (ODENBREIT et al., 2000). Dentro da célula hospedeira, CagA é fosforilada por Src quinases (KWOK et al., 2007), provocando várias alterações na morfologia, crescimento e proliferação celular, podendo levar à apoptose (ROBINSON et al., 2007). Essas alterações culminam na perda da integridade do epitélio, danificando a mucosa do estômago e levando ao desenvolvimento de diversas patologias, dentre elas o carcinoma gástrico (HATAKEYAMA; HIGASHI, 2005).

Cepas CagA positivas tendem a ser mais virulentas e induzem altos níveis de expressão de citocinas, tais como interleucina (IL) – 1 β e quimiocina

CXCL - 8 com predomínio de neutrófilos na mucosa gástrica (KIM et al., 2006; ROBINSON et al., 2007). Entretanto, cepas CagA negativas também induzem secreção de CXCL - 8 (QUEIROZ et al., 1998). O gene CagA é considerado marcador da ilha de patogenicidade *cag* (*cag-PAI*), que possui de 35 a 40 Kb, e comporta 31 genes, sendo encontrado em cerca de 60 % das cepas ocidentais (KONTUREK et al., 2009).

A combinação destes fatores de virulência durante a infecção desencadeia uma resposta imune no hospedeiro para eliminar o agente agressor sem comprometer a função do órgão envolvido. Entretanto, neste processo, ocorre predomínio de células T *helper* 1 que induzem a produção de altos níveis de citocinas e quimiocinas, tais como IL – 1 β , IL - 6, CXCL - 8, IL - 10, IL – 12, fator de necrose tumoral alfa (TNF - α) e fator transformador de crescimento beta (TGF - β), contribuindo para o aumento do processo inflamatório, com consequentes danos às células da mucosa (ERNST et al., 1997; AMEDEI et al., 2006; ANDO et al., 2006a; OBONYO et al., 2006).

A IL – 1 β é um importante fator de iniciação e amplificação da resposta inflamatória que, juntamente com TNF - α , atua como poderoso estimulador de CXCL - 8, além de inibir a secreção ácida (ANDO et al., 2006b). Estudos relatam que *H. pylori* também ativa o gene fator *kappa* B nuclear (NF - κ B) de células epiteliais da mucosa gástrica *in vivo* e *in vitro*, codificando um fator de transcrição que ativa a produção de interleucinas, com consequente aumento da expressão de CXCL - 8, que estimula a quimiotaxia e ativação de neutrófilos (NAITO; YOSHIKAWA, 2002).

Neutrófilos ativados, após a formação do fagolisossomo, liberam enzimas e proteínas bactericidas induzindo o *burst* oxidativo (LABRO, 2000). O

burst oxidativo ou respiratório envolve o aumento no consumo de oxigênio não mitocondrial, acompanhado por ativação do *shunt* da hexose monofosfato (via do fosfogliconato), e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (JANG et al., 1999). Os neutrófilos estimulados ativam a proteína quinase C que fosforila a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) de membrana (PARIJ et al., 1998). O complexo NADPH oxidase catalisa a transferência de elétrons de NADPH (originado do *shunt* da hexose monofosfato) para oxigênio molecular (O_2), gerando ânion superóxido (O_2^-) no ambiente extracelular e dentro das vesículas fagocíticas (BABIOR, 2000). O O_2^- gerado serve como material inicial para a produção de uma vasta coleção de oxidantes reativos, incluindo halogênios oxidados e radicais livres, como o radical hidroxil ($OH^\cdot$) e oxigênio singleto ($^1O_2$) (BABIOR, 1999), eficientes moléculas bactericidas. A maior parte do O_2^- é convertida em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 por dismutação espontânea ou pela ação da superóxido dismutase (SOD) (JANG et al., 1999). A mieloperoxidase (MPO), localizada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, na presença do H_2O_2 , catalisa a oxidação de cloreto (Cl^-) para formar o ácido hipocloroso (HOCl), também um potente agente bactericida. O HOCl danifica proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos nucléicos contribuindo para a morte bacteriana (BERGT et al., 2001).

Os radicais livres de oxigênio gerado no processo inflamatório reagem com o DNA e podem induzir alteração da expressão de proto-oncogenes, promovendo a carcinogênese gástrica ou apoptose celular (KATSURAHARA et al., 2009; SHIBATA et al., 2009). O mecanismo pelo qual *H. pylori* promove a apoptose ainda não está completamente esclarecido. Além das EROs, citocinas como TNF - α , interferon - gama (INF - γ), IL - 2 e IL - 1 β , amônia

gerada durante a quebra da ureia pela urease bacteriana e a redução do ascorbato, um antioxidante gástrico, podem ativar a apoptose (SUZUKI et al., 2003; WU et al., 2004). Ainda deve ser considerada a formação intracelular de intermediários reativos de nitrogênio, com nível aumentado de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela formação endógena de nitrito, compostos nitrosos (CHANG et al., 2004; LI; XU et al., 2005) e desaminação do DNA (PAKODI et al., 2000). Esses intermediários são derivados da síntese de óxido nítrico e induzidos por citocinas liberadas pelas células mononucleares da inflamação, contribuindo para o aumento de danos no DNA, mutagênese e desenvolvimento do carcinoma gástrico, além de apoptose (JAISWAL et al., 2001, CORREA; HOUGHTON, 2007).

Diversos agentes agressores, incluindo antimicrobianos, podem aumentar a produção intracelular de EROs em bactérias como resposta ao estresse a que estão sendo submetidas, intensificando a ação antibacteriana (BARNES et al., 2005; BECERRA et al., 2003). Essas alterações do metabolismo oxidativo com aumento de EROs podem ter um importante efeito no mecanismo de ação de diferentes antimicrobianos (ALBESA et al., 2004).

A abordagem proteômica é entendida como a análise em larga escala da expressão protéica, sendo atualmente considerada uma das áreas centrais da genômica funcional. Os avanços técnicos permitiram identificar centenas ou até milhares de proteínas a partir de extratos protéicos complexos, por separação eletroforética ou cromatografia aliada à espectrometria de massas, possibilitando assim a aquisição de um repertório de proteínas envolvidas diretamente com diferentes situações metabólicas e fisiológicas de um dado microrganismo e detectar modificações pós-traducionais (ANDERSON;

SEILHAMER, 1997). O grande número de sequências, disponibilizadas pelos projetos de sequenciamento de genomas, tem favorecido o interesse em análises de proteomas definindo proteínas codificadas num genoma, que é de fundamental importância no processo de identificação e regulação da expressão proteica (JUNGBLUT; WITTMANN-LIEBOLD, 1995).

Projetos de caracterização proteômica estão sendo desenvolvidos com vários microrganismos procarióticos e eucarióticos, dentre eles *Saccharomyces cerevisiae* (SZOPINSKA; MORSOMME, 2010), *Paracoccidioides brasiliensis* (DONOFRIO et al., 2009), *Escherichia coli* (HAN et al., 2011), *Haemophilus influenzae* (QU et al., 2010), *Mycobacterium tuberculosis* (ZHANG et al., 2012) e *Salmonella enterica* (HANEDA et al., 2010). A análise por eletroforese bidimensional vem sendo muito utilizada no estudo das bactérias para a identificação de proteínas induzidas como respostas adaptativas devido a variações ambientais, principalmente temperatura e estresse (ARAI et al., 2003; EYMAN et al., 2004; LOPEZ et al., 2005).

O estudo de proteômica em *H. pylori* visa esclarecer a participação de diferentes proteínas na patogênese da bactéria. Em estudos realizados por BUMANN et al. (2002) foram identificadas 18 das 26 proteínas secretadas por *H. pylori* podem estar envolvidas na interação hospedeiro-patógeno. A análise proteômica de *H. pylori* ATCC 26695, após tratamento com subcitrato de bismuto coloidal, com eficácia comparável à dos bloqueadores dos receptores H_2 no tratamento da doença péptica, demonstrou que a bactéria expressava diferencialmente 8 proteínas da parede celular na presença deste inibidor quando comparada a cepa não tratada (RUIGUANG et al., 2007).

Os esquemas terapêuticos mais comumente empregados no tratamento de erradicação de *H. pylori* consistem na combinação de dois antimicrobianos (usualmente metronidazol, claritromicina, amoxicilina, tetraciclina ou furazolidona), juntamente com um inibidor de bomba de prótons (omeprazol, lansoprazol ou pantoprazol) (GERRITS et al., 2006; ABBLES et al., 2007).

A falência terapêutica dos esquemas propostos ocorre em aproximadamente 10 – 20 % dos pacientes e o aparecimento de cepas resistentes à terapia antimicrobiana é um dos fatores responsáveis pelas falhas no tratamento (MENDONÇA et al., 2000; ECCLISSATO et al., 2002). Outras causas tais como concentração não efetiva dos antibióticos na mucosa gástrica e a inativação do fármaco no pH baixo do estômago também pode contribuir com a falha na erradicação bacteriana (ALARCON et al., 1999; VAN DOORN et al., 2000). Resistência ao metronidazol foi verificada em 42 % das cepas isoladas no Brasil, em 29 % para amoxicilina, 7 % para claritromicina e tetraciclina e 4 % para furazolidona (MENDONÇA et al., 2000). Entretanto, a eficácia clínica de um antimicrobiano é reconhecida não apenas pela atividade bactericida/bacteriostática e farmacocinética como também pela ação que esse fármaco exerce sobre fatores de virulência do microrganismo, especialmente quando em concentrações abaixo das consideradas terapêuticas (DAL SASSO et al., 2003). Alguns antimicrobianos podem modular adesinas específicas ou fatores de virulência secretados por *Staphylococcus aureus* (LI et al., 2005).

Vários estudos demonstram que as concentrações inibitórias de antimicrobianos (CIM) (HELD et al., 1995) ou concentrações subinibitórias (sub-CIMs) podem alterar os fatores de virulência da bactéria e, conseqüentemente, a relação micro-organismo / hospedeiro (DI MARTINO et

al., 2001; KADRY et al., 1999). Sub-CIMs de antimicrobianos acarretam modificações nas células bacterianas, podendo intervir nos fatores de virulência, potencializando ou não a ação farmacológica do antimicrobiano, quando em concentração abaixo da considerada terapêutica (WORLITZSCH et al., 2001). Portanto, sub-CIMs de antimicrobianos são capazes de alterar a morfologia e taxa de crescimento do microrganismo, produção e/ou liberação de enzimas e toxinas, bem como outros fatores envolvidos na virulência bacteriana (BRAGA et al., 2000; BERNARDO et al., 2004). Tais alterações podem afetar diretamente as interações entre bactérias e hospedeiro, nos fenômenos de adesão, fagocitose e resposta inflamatória após exposição bacteriana (GREENWOOD, 1979; ATKINSON; AMARAL, 1982; GEMMEL; FORD, 2002; DAL SASSO et al., 2003).

A amoxicilina é um β - lactâmico semi-sintético da classe das penicilinas, apresentando um núcleo básico 6 – aminopenicilâmico, que consiste em um anel tiazolidínico vinculado a um anel beta lactâmico que comporta um grupamento amino secundário. As penicilinas, de modo geral, interferem na síntese do peptidoglicano da parede celular, que é essencial para o crescimento bacteriano (SWEETMAN, 2002). A resistência de *H. pylori* à amoxicilina é considerada rara na maioria dos países, no entanto trata-se do antibiótico mais prescrito para crianças no Brasil e há relatos de que até 38% das cepas sejam resistentes a esse antibiótico, refletindo altos índices de resistência pelo seu uso indiscriminado (GODOY et al., 2003).

Em decorrência das terapias para a erradicação do *H. pylori* nem sempre eficazes e pela amoxicilina estar incluída como uma das opções nos esquemas de tratamento, esse estudo visou avaliar o efeito de concentrações

subinibitórias desse antimicrobiano na expressão de alguns fatores relacionados à virulência do microrganismo.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar a influência de diferentes concentrações de amoxicilina na expressão de alguns fatores relacionados à virulência do *Helicobacter pylori*.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito e tempo de exposição de diferentes concentrações de amoxicilina na:

- Expressão diferencial de proteínas de *Helicobacter pylori*;
- Indução de citocinas (IL – 1 β , IL - 6, IL – 12, IL - 10, TGF - β e TNF – α) e óxido nítrico após infecção *in vitro* de macrófagos da linhagem RAW 264.7;
- Viabilidade e tipo de morte celular (apoptose precoce e tardia/necrose).

3. Materiais e Métodos

3.1. Microrganismo

Helicobacter pylori cepa ATCC 43504 (amoxicilina sensível e metronidazol resistente) isolado do antro gástrico humano (Figura 1).

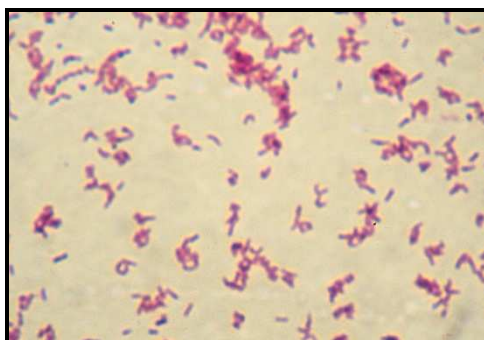


Figura 1: *Helicobacter pylori* cepa ATCC 43504 (1000X) corada pelo método de Gram.

3.2. Antimicrobiano

Amoxicilina triidratada (AMX) (P. Nostra, Lote: 080616478, Validade: 02/2012), diluída em água destilada, na concentração de 1 mg/mL.

3.3. Linhagem Celular

RAW 264.7, macrófago murino (ATCC TIB-71), foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

3.4. Determinação da atividade antibacteriana

A atividade da amoxicilina sobre o crescimento bacteriano foi determinada através do método da microdiluição em placa (NCCLS, 2003). O microrganismo foi, inicialmente, cultivado em placas contendo ágar Columbia adicionado de 10 % de soro fetal bovino (SBF) e incubado por 72 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 10 % de CO₂. Posteriormente, colônias foram repicadas para caldo infusão-cérebro-coração (BHI) suplementado com 10 % de SBF até obtenção de uma suspensão correspondente a 10⁶ UFC/mL (UDO₆₂₀ 0,10). Orifícios de microplacas (96 orifícios com fundo chato) foram preenchidos com 100 µL de caldo BHI suplementado com 10 % de BSF contendo concentrações de amoxicilina variando de 0,0078 a 1,0 µg/mL e mesmo volume da suspensão bacteriana. A inibição do crescimento, induzida pelo antimicrobiano, foi determinada através da diferença de absorvância em 620 nm (espectrofotômetro multicanal Spectra (Shell) & Rainbow (Shell) Readers da Tecan Austria GesmbH) obtida antes e após incubação por 72 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 10 % de CO₂. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos por três vezes. Para o controle do crescimento, 100 µL da mesma suspensão bacteriana foram adicionados a 100 µL do caldo BHI suplementado com 10 % SBF. A curva dose-resposta foi empregada para a determinação das concentrações de amoxicilina a serem utilizadas nos ensaios.

3.5. Preparo do inóculo

Suspensão de *H. pylori* cultivado em caldo BHI suplementado com 10 % de SBF na concentração de 10^9 UFC/mL (equivalente ao padrão 4 da escala de McFarland, UDO_{620} 0,40) acrescido de diferentes concentrações de amoxicilina (0,063 μ g/mL, 0,125 μ g/mL e 0,250 μ g/mL e controles (sem antibiótico) foi incubada a 37 °C, em atmosfera contendo 10 % de CO_2 , por 24 e 48 horas. Em seguida, as células bacterianas foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada de fosfatos (PBS) 0.05 M estéril, pH 7,2, a 4 °C na presença de 1 mM de fenilmetilsufonil fluoreto (PMSF) para o item 3.7.1 e na sua ausência para os demais ensaios, centrifugadas a 6000 g por 10 minutos para remoção do antimicrobiano. As células bacterianas foram ressuspensas em água ultra-pura estéril gelada para o item 3.7.1 e em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (DULBECCO; FREEMAN, 1959) para os ensaios do item 3.6 na concentração final de 10^9 UFC/mL (UDO_{620} 0,40).

De acordo com as condições de crescimento, as seguintes terminologias foram utilizadas: pré-AMX 24 h e pré-AMX 48 h para *H. pylori* incubados em BHI contendo as diferentes concentrações de AMX por 24 e 48 horas, respectivamente; Hp 24 h e Hp 48 h para *H. pylori* crescidos em BHI na ausência de AMX por 24 e 48 horas (controle); AMX para *H. pylori* ressuspensado no momento do ensaio em meio DMEM contendo as diferentes concentrações do antimicrobiano. Os inóculos pré-AMX foram submetidos à lavagem para remoção do antimicrobiano presente no meio de crescimento.

3.6. Ensaios em macrófagos

3.6.1. Manutenção

Linhagem RAW 264.7 foi mantida em garrafas de plástico estéreis conforme descrito por WASLEY (1969), em meio DMEM suplementado com 10 % de SBF a 36,5 °C, em atmosfera contendo 5 % de CO₂. Decorridos 3 - 4 dias, as células foram removidas com o auxílio de *scrapers*, homogeneizadas em meio DMEM acrescido de 10 % de SBF e transferidas para outras garrafas.

3.6.2. Infecção celular

Suspensão celular (500 µL) contendo 10⁶ células/mL em meio DMEM foi colocada em orifícios de placas contendo ou não lamínulas no seu interior para a realização dos ensaios. Após 24 horas de incubação, o meio foi desprezado e as células lavadas por três vezes com 1 mL de PBS, pH 7.2 estéril e recobertas com 500 µL das suspensões de *H. pylori* previamente mantidos nas diferentes concentrações de amoxicilina (0,063 µg/mL, 0,125 µg/mL e 0,250 µg/mL) por 24 e 48 horas e 500 µL de meio DMEM. As placas foram incubadas por 6, 24 e 48 horas a 36.5 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂. Suspensão de *H. pylori* em meio DMEM acrescida das concentrações do antimicrobiano no momento do ensaio também foi utilizada e incubada nas mesmas condições. Como controles foram empregados macrófagos infectados com *H. pylori*

crescidos nas mesmas condições na ausência do antimicrobiano e sem infecção.

3.6.3. Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células através da reação de diazotação com o reagente de Griess (1 g de sulfanilamida, 0,1 g de N-1-dihidrocloreto de naftiletilenodiamina, 2,5 mL de ácido ortofosfórico e água deionizada q.s.p. 100 mL), conforme descrito por Green et al. (1982). Alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados ou não com *H. pylori*, conforme descrito no item 3.6.2, foram incubadas em placas de fundo chato (96 orifícios) com 50 µL de reagente de Griess e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de NO nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio, sendo os valores expressos em µMoles de nitrito/mL. Como estímulo de indução de NO (controle da reação), foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 10 µg/mL.

3.6.4. Determinação dos níveis de citocinas

Os sobrenadantes de culturas dos macrófagos infectados e controles descritos nos itens 3.6.1 e 3.6.2 foram submetidos à técnica imunoenzimática de ELISA de captura e as citocinas IL – 1 β , IL - 6, IL - 10, IL - 12, TGF - β e TNF - α quantificadas, utilizando-se o *Kit BD OptEIA* (BD Pharmigen). Os orifícios de placas (96) foram sensibilizados com 100 μ L de anticorpos monoclonais de captura (anti-citocina) de camundongo em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,5 (IL – 1 β , IL - 6, IL - 10, IL - 12) ou carbonato de sódio pH 9,6 (TNF - α , TGF - β) na concentração adequada para cada citocina (de acordo com as instruções do fabricante) e as placas incubadas *overnight* à temperatura de 4 °C. A seguir, foram lavadas quatro vezes com 300 μ L de PBS-Tween 20 0,05 % e a reação bloqueada com 200 μ L/orifício de PBS contendo 10 % de SBF e novamente incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Após lavagens, foram adicionados em cada orifício 100 μ L do padrão da citocina e o sobrenadante da cultura de macrófagos a ser testado. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e, após lavagens, foram adicionados 100 μ L/orifício de anticorpo monoclonal anti-citocina de camundongo marcado com biotina e estreptavidina-HRP, diluído em PBS contendo 10 % BSF na concentração adequada para cada citocina. As placas foram mantidas por 1 hora à temperatura ambiente, lavadas, adicionados 100 μ L/orifício do substrato tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (BD Pharmigen™ Substrato Reagente TMB) e mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L/orifício de ácido sulfúrico 2 N. A densidade ótica foi medida em leitor de

ELISA a 450nm (Multiskan Ascent, Labsystems). A concentração de cada citocina foi determinada através de uma curva padrão, com quantidades conhecidas das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL. Como controle positivo, as células foram tratadas com LPS na concentração de 10 µg/mL.

3.6.5. Avaliação da viabilidade

Suspensão de macrófagos (200 µL) contendo 10^6 células/mL foi colocada em orifícios de placas de fundo chato (96) e, após 24 horas de incubação, o meio foi desprezado e as células lavadas por três vezes com 1 mL de PBS 0.05 M, pH 7.2 estéril. A seguir, 200 µL da suspensão de *H. pylori* preparada conforme descrita no item 3.6.2 foram adicionados e as placas incubadas por 6, 24 e 48 horas a 36.5 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂. Após incubação, os sobrenadantes das culturas foram desprezados e as células aderentes foram tratadas com 100 µL de uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), (Across Organics) a 0,5 mg/mL em DMEM. As placas foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições, os sobrenadantes descartados e as células tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Spectra (Shell) & Rainbow (Shell) Readers da Tecan Austria GesmbH) a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de viabilidade celular considerando o controle negativo como 100 % (células sem

infecção e antibiótico) nos tempos de 6, 24 e 48 horas, obtidos a partir da média e desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em triplicata. Como controles foram empregados macrófagos infectados com *H. pylori* crescidos nas mesmas condições na ausência do antimicrobiano e sem infecção.

3.6.6. Morte de macrófagos infectados com *H.pylori* avaliados por citometria de fluxo

A citometria de fluxo (Fluorescence Activated Cell Sorting – FACS) é uma técnica que realiza a contagem e separação de subpopulações celulares, permitindo uma análise multiparamétrica simultânea das características físicas e químicas de uma única célula em suspensão, baseada no espalhamento de luz e fluorescência. Assim morte por apoptose de macrófagos infectados por *H. pylori* foi avaliada pela técnica da anexina V por citometria de fluxo, utilizando o kit de Anexina V (BD Pharmigen, cat. nº 556454) e iodeto de propídio (PI) (BD Pharmigen, cat. nº 556463). A membrana de células em apoptose se mantém intacta, enquanto que quando em necrose ocorre perda da integridade, tornando-se permeável, permitindo a reação entre o PI e o DNA nuclear. Através do uso do citômetro de fluxo foi possível avaliar simultaneamente as diferentes populações: a) fluorescência verde: células coradas com Anexina V (ANEX) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), b) fluorescência vermelha: células coradas com PI. Através desta metodologia foram identificadas quatro populações celulares distintas: células não viáveis (ANEX

V - / PI + = Q1), células em estágio de apoptose tardia ou necróticas (ANEX V + / PI + = Q2), células viáveis (ANEX V - / PI - = Q3) e células em estágios iniciais de apoptose (ANEX V + / PI - = Q4) como demonstrado na Figura 2 abaixo.

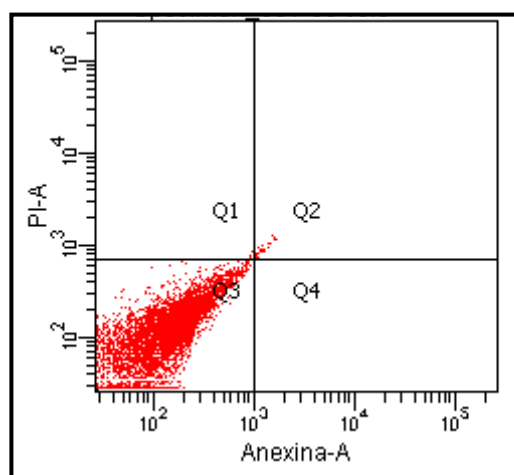


Figura 2: Distribuição de fluorescência do tubo controle contendo apenas macrófagos pela técnica de citometria de fluxo: Anexina *versus* PI. Q1: células mortas (A – PI +); Q2: células em estágio de apoptose tardia/necrose (A + PI +); Q3: células viáveis (A - PI -); Q4: células em estágios iniciais de apoptose (A + PI -).

Nesta técnica, macrófagos (1×10^6 células/orifício) foram cultivados em placas de 6 orifícios por 24 horas e, posteriormente, inoculados com *H.pylori* conforme itens 3.5 e 3.6.2. Após incubação por 6, 24 e 48 horas a 36.5°C em atmosfera contendo 5 % de CO_2 , as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril, raspadas com o auxílio de scrapers, transferidas para tubos e centrifugadas a 800 g durante 5 minutos. A seguir, as células foram lavadas e ressuspensas em 500 μL de tampão de ligação contendo 5 μL de anexina V conjugada com FITC e 5 μL de PI e incubadas por 10 minutos, a temperatura

ambiente no escuro. Como controle de morte celular foram utilizado LPS (10 µg/mL) e como controle negativo células sem nenhum tratamento ou infecção.

A intensidade de fluorescência (FITC e PI) foi avaliada utilizando o equipamento FACSCanto (Bencton Dickinson, USA). O tipo de morte celular, apoptose precoce ou apoptose tardia/necrose, foi expresso em porcentagem em relação ao controle negativo.

3.7. Análise proteômica

3.7.1. Extração proteica

O preparo dos extratos de *H. pylori* foi realizado como descrito no item 3.6 na presença de inibidores de proteases (PMSF). Em seguida, as bactérias foram submetidas à sonicação (6 pulsos / 1 minuto / 20 % de amplitude), com intervalo de 30 segundos para lise celular, e o lisado centrifugado a 6000 *g* por 10 minutos. Os *pellets* e sobrenadantes foram separados, alíquotados e armazenados a -80 °C. A concentração proteica dos extratos foi quantificada pelo método de Bradford (1976).

3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os extratos protéicos foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema tampão descontínuo de Laemmli (1970) e Studier (1973). A separação dos componentes foi efetuada em gel de corrida a 10 % e em gel de empilhamento a 5 % de poliacrilamida. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque contendo 30 % por peso de acrilamida e 0,8 % por peso de bis-acrilamida. No gel de separação a polimerização foi feita em solução contendo 1,5 M de Tris - ácido clorídrico (HCl), pH 8.8 e 0,4 % de SDS, em presença de 0,1 % v/v de N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) e 0,1 % de persulfato de amônio (APS). O gel de empilhamento foi polimerizado na presença de 0,5 M de Tris - HCl pH 6.8 e 0,4 % de SDS, 0,1 % de persulfato de amônio e 0,05 % v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foram utilizados 64 µL de antígeno diluído em tampão de amostra (1:5), que consistiu de 62,5 mM de Tris - HCl [tris (hidroximetil) aminometano] pH 6.8, 2 % de SDS, 10 % de glicerol, 0,5 M de ditioneitol e 0,002 % de azul de bromofenol. As proteínas foram dissociadas pelo aquecimento da amostra em água fervente por 3 minutos. Paralelamente a amostra, em cada corrida eletroforética, uma mistura de proteínas de peso molecular conhecido foi utilizada, como fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e lacto-albumina (14 kDa). A partir da análise da migração destes padrões, os pesos moleculares das proteínas antigênicas foram

calculados. A corrida eletroforética foi realizada a 10 mA (80 V) até que o corante penetrasse no gel de separação e, a 20 mA (120 V) até que atingisse o fim do gel. O tampão de corrida foi constituído de Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1 %, pH 8.3.

3.7.2.1. Coloração dos géis pelo nitrato de prata

Esta coloração foi realizada segundo o método descrito por Nielsen e Brown (1984). Após a corrida eletroforética uma solução de ácido tricloroacético a 10 % por 30 minutos a 4 °C foi utilizada para a fixação do gel. A seguir, foram feitas três lavagens de 10 minutos com solução de 10 % de etanol mais 5 % de ácido acético. Solução oxidante de 0,0034 M de dicromato de potássio e 0,0032 N de ácido cítrico foram adicionadas e mantidas por 5 minutos. A seguir esta solução foi retirada e o gel lavado duas vezes, por cinco minutos, com água ultra-pura. Em seguida, solução de nitrato de prata 0,012 M foi adicionada sobre o gel e incubado por 20 minutos no escuro. Após incubação, nova lavagem foi realizada com água ultra-pura, por 1 minuto, e solução redutora consistindo de 0,28 M de carbonato de sódio e 0,0185 % de formaldeído foi adicionada. Após o desenvolvimento da cor, a reação foi bloqueada com solução de ácido acético a 5 % e o gel mantido nessa solução até a documentação.

3.7.3. Análise proteica por eletroforese bidimensional

Os extratos proteicos da cepa de *H.pylori* crescida na presença e na ausência da $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ CIM de amoxicilina, foram submetidos à focalização isoelétrica para a separação das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), como descrito por O'Farrel (1975), utilizando o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) do Instituto de Química de São Carlos – SP, USP sob supervisão do Prof. Dr. Emanuel Carrilho. A segunda dimensão foi realizada para a separação das proteínas de acordo com a massa molecular em gel de poliacrilamida 12.5 % (LAEMMLI, 1970). Os géis foram corados utilizando-se azul de Comassie brilhante G 250 (Bio-rad) (NEUHOF et al.,1988).

As imagens dos géis foram digitalizadas por um *scanner* e analisadas pelo *software* ImageMaster 2D V 3.01 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Triplicata dos géis foram feitas para todas as condições experimentais. Os valores dos pesos moleculares (PM) e pontos Isoelétricos (pI) foram obtidos a partir de proteínas padrões migradas em conjunto no gel bidimensional e foram plotados em coordenadas y (ordenada) e x (abscissa) dos géis através do *software* ImageMaster 2D V 3.01 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Os *spots* foram detectados e quantificados em unidades de volume (área *versus* intensidade) representando uma porcentagem do volume total e os diferencialmente expressos foram analisados no espectrômetro de massas.

3.7.4. Tripsinização de proteínas de *H. pylori* e análise por espectrômetro de massas Synapt HDMS

Os *spots* das proteínas selecionadas foram excisados do gel manualmente, descorados com uma solução contendo metanol 50 %, ácido acético 2,5 % em água ultra-pura por 2 horas a temperatura ambiente. Após descoloração, os *spots* foram desidratados com 200 μ L de acetonitrila (ACN) 100 % por 5 minutos, removidos e os tubos centrifugados em *Speed Vac* (Eppendorf) para evaporar toda a acetonitrila. Uma vez desidratados, os *spots* foram reidratados com bicarbonato de amônio a 100 mM por 10 minutos, e foram submetidos a nova desidratação com 200 μ L de ACN 100 % por 5 minutos, removidos e os tubos centrifugados em *Speed Vac* (Eppendorf) para evaporar toda a acetonitrila. Em seguida, os *spots* foram hidratados com 30 a 50 μ L de solução de tripsina (20 ng/ μ L) (Sigma) contendo uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM e incubados por 16 - 24 horas a 37 °C. Após, aos *spots* foram acrescentados 10 μ L da primeira solução de extração de peptídeos (ácido fórmico 5 % em água ultra-pura), incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugados a 6000 *g* por 1 minuto e os sobrenadantes transferidos para outro tubo. Este procedimento foi repetido utilizando uma segunda solução de extração de peptídeos (ácido fórmico 5 %, acetonitrila 50 % em água ultra-pura) e os sobrenadantes transferidos para o tubo anteriormente utilizado. Este segundo procedimento foi repetido mais uma vez, e as amostras foram concentradas em *Speed Vac* (Eppendorf) até a obtenção de um volume final de 10 μ L.

Os produtos obtidos após tripsinização foram enviados para análise em espectrômetro de massa do tipo Waters Synapt HDMS (Waters Corp., Manchester, UK), módulo que permite tanto a obtenção de espectros de massa quanto o sequenciamento de peptídeos, realizado com a colaboração do Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

O padrão de massas obtido foi comparado com o padrão de massas de proteínas depositadas em bancos de dados e para isso foi utilizado o programa *Mascot* (www.matrixscience.com) e o banco de dados *Swiss Prot* e do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para identificação das proteínas.

3.8. Análise estatística

A análise estatística intra - grupo das diferentes concentrações de AMX em relação ao controle foi realizada pelo teste *t* de *student* (paramétrico) e o valor para $p < 0,05$ considerado significativo. Os resultados obtidos para os diferentes grupos testados em relação às diferentes concentrações de AMX (intergrupos) foram analisados por ANOVA seguido de múltiplas comparações de acordo com teste de TUKEY, através do programa Graph Pad Instat.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade anti-*Helicobacter pylori*

O efeito da amoxicilina sobre o crescimento de *Helicobacter pylori* é apresentado na Figura 3. A manutenção da absorbância, após declínio brusco da mesma, possibilitou a determinação da concentração inibitória (0,250 µg/mL). A partir desse resultado, as concentrações de 0,063 µg/mL, 0,125 µg/mL e 0,250 µg/mL foram utilizadas nos ensaios.

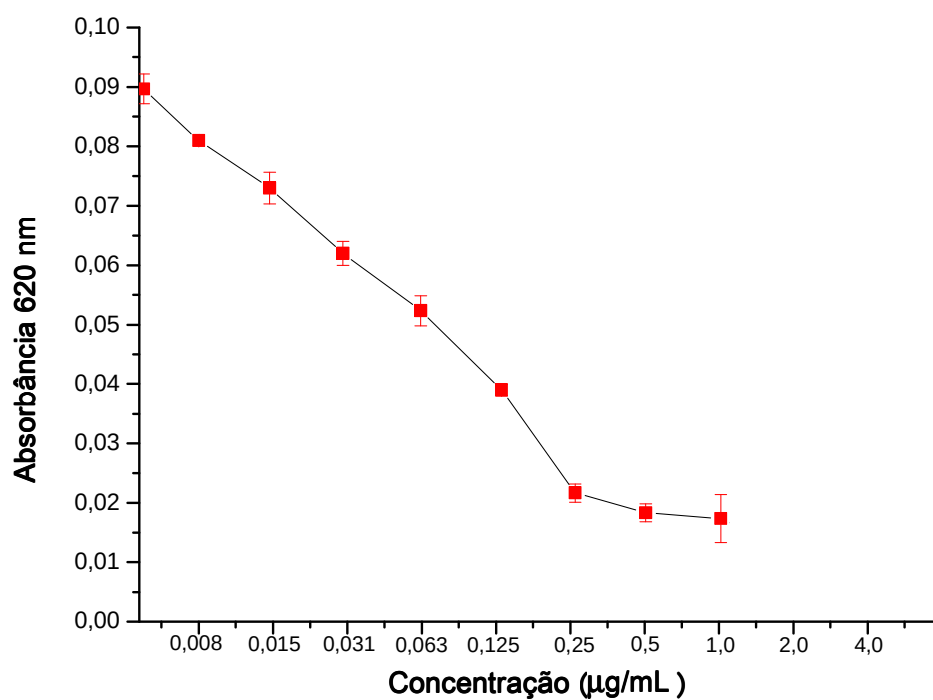


Figura 3: Efeito dose-resposta de diferentes concentrações de amoxicilina no crescimento de *H. pylori* após 72 horas de incubação.

4.2. Indução da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos por *H. pylori*

H. pylori previamente mantido ou tratado com as diferentes concentrações de AMX induziram aumento significativo de NO em macrófagos ($p < 0,05$) em relação à observada por os respectivos controles após 6, 24 e 48 horas de incubação. Maior indução desse reativo de nitrogênio foi observada quando a cepa foi mantida na menor concentração de AMX (Figura 4 – Tabela 1).

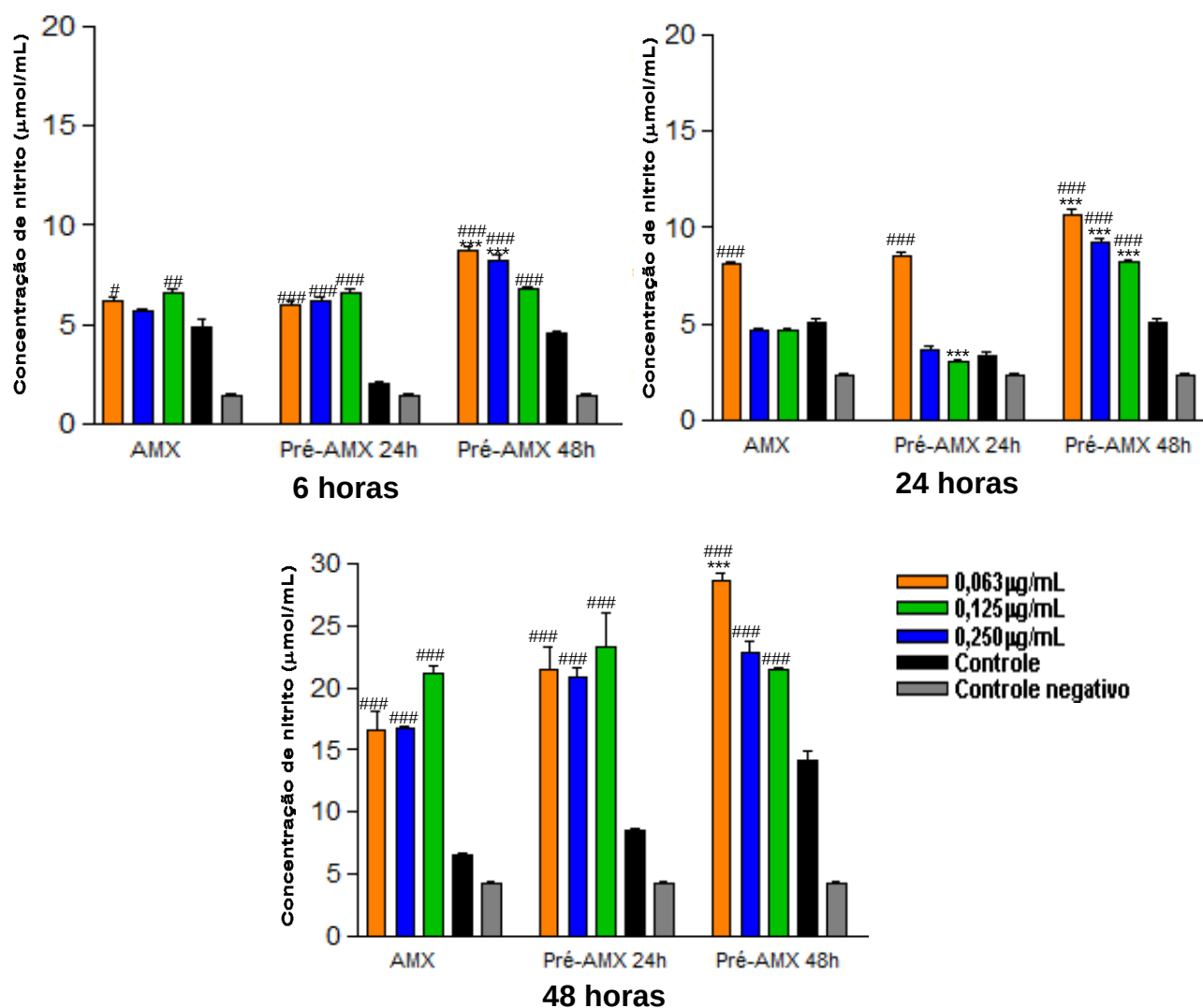


Figura 4: Indução de óxido nítrico em macrófagos após infecção com *H. pylori* por 6, 24 e 48 horas. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo as diferentes concentrações de AMX no

momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença do antimicrobiano, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção. Diferença estatística intra-grupo em relação ao controle # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; diferença estatística intergrupos em relação às diferentes concentrações de AMX * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 1: Produção de NO por macrófagos infectados com *H. pylori* mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 6, 24 e 48 horas de incubação

TEMPO DE INFECÇÃO (h)	NO ($\mu\text{mol/mL}$)*			
	Amoxicilina ($\mu\text{g/mL}$)	AMX	Pré-AMX 24h	Pré-AMX 48h
6h	0,063	6.22 $\pm$ 0.30	5.96 $\pm$ 0.30	8.76 $\pm$ 0.30
	0,125	5.69 $\pm$ 0.20	6.22 $\pm$ 0.23	8.22 $\pm$ 0.46
	0,250	6.62 $\pm$ 0.23	6.62 $\pm$ 0.30	6.76 $\pm$ 0.23
	Controle	4.99 $\pm$ 0.66	2.04 $\pm$ 0.10	4.54 $\pm$ 0.10
	LPS	2.29 $\pm$ 1.47	2.29 $\pm$ 1.47	4.29 $\pm$ 0.72
	Controle negativo	1.29 $\pm$ 0.28	1.29 $\pm$ 0.28	1.29 $\pm$ 0.28
24h	0,063	8.16 $\pm$ 0.11	8.56 $\pm$ 0.30	10.62 $\pm$ 0.64
	0,125	4.62 $\pm$ 0.30	3.62 $\pm$ 0.30	9.22 $\pm$ 0.30
	0,250	9.69 $\pm$ 0.34	3.02 $\pm$ 0.23	8.22 $\pm$ 0.11
	Controle	5.02 $\pm$ 0.41	3.29 $\pm$ 0.40	5.02 $\pm$ 0.41
	LPS	4.15 $\pm$ 0.64	4.15 $\pm$ 0.64	8.55 $\pm$ 2.41
	Controle negativo	2.29 $\pm$ 0.20	2.29 $\pm$ 0.20	2.29 $\pm$ 0.20
48h	0,063	16.56 $\pm$ 2.75	21.41 $\pm$ 3.32	28.56 $\pm$ 1.17
	0,125	16.76 $\pm$ 0.23	20.89 $\pm$ 1.21	22.82 $\pm$ 1.70
	0,250	21.09 $\pm$ 1.05	23.29 $\pm$ 4.68	21.42 $\pm$ 0.23
	Controle	6.49 $\pm$ 0.34	8.49 $\pm$ 0.40	14.09 $\pm$ 1.51
	LPS	9.35 $\pm$ 0.23	9.35 $\pm$ 0.23	19.19 $\pm$ 1.37
	Controle negativo	4.29 $\pm$ 0.20	4.29 $\pm$ 0.20	4.29 $\pm$ 0.20

* μmol de nitrito em relação a induzida por macrófagos sem infecção e tratamento, apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo as diferentes concentrações de AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença do antimicrobiano, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção.

4.3. Indução das citocinas por macrófagos infectados com *H. pylori*

4.3.1. Interleucina – 1 β e interleucina - 12

O sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *H. pylori* previamente mantido nas concentrações de 0,063 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina, por 24 e 48 horas, apresentou maior concentração de IL – 1 β e IL - 12 ($p < 0,05$) quando comparada à infectada com *H. pylori* tratado nas diferentes concentrações do antimicrobiano no momento do ensaio e em relação à induzida por bactérias não exposta ao antimicrobiano (controle) (Figura 5 – Tabela 2).

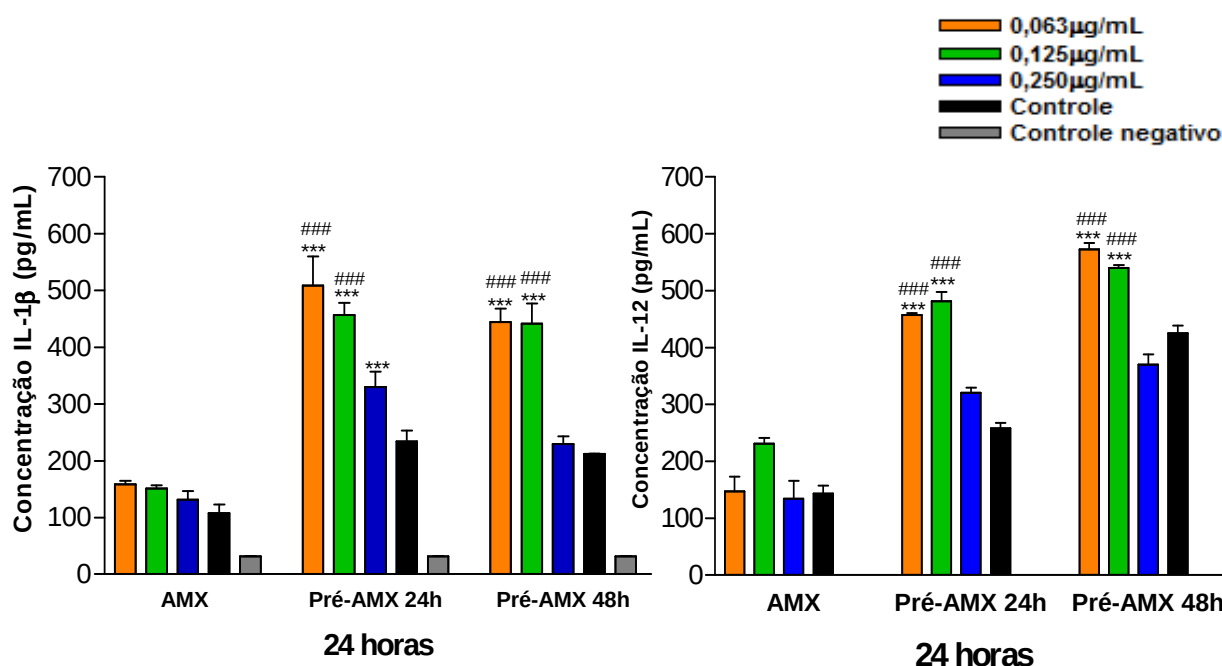


Figura 5: Concentrações de IL – 1 β e IL - 12 liberadas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com *H. pylori*. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção. Diferença estatística intra-grupo em relação ao controle # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; diferença estatística intergrupos em relação às diferentes concentrações de AMX * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 2: Indução de IL - 1 β e IL - 12 em macrófagos por *H. pylori* mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação

SUSPENSÕES DE <i>H. pylori</i>		IL - 1 β (pg/mL)*	IL - 12 (pg/mL)*
		24h	24h
0,063 μ g/mL de AMX	AMX	158.48 $\pm$ 11.36	160.67 $\pm$ 9.73
	Pré-AMX 24h	508.43 $\pm$ 72.56	457.16 $\pm$ 5.10
	Pré-AMX 48h	444.35 $\pm$ 33.43	572.28 $\pm$ 16.27
0,125 μ g/mL de AMX	AMX	150.95 $\pm$ 8.16	187.70 $\pm$ 46.66
	Pré-AMX 24h	456.25 $\pm$ 30.75	481.45 $\pm$ 23.26
	Pré-AMX 48h	441.00 $\pm$ 50.91	540.00 $\pm$ 7.07
0,250 μ g/mL de AMX	AMX	131.34 $\pm$ 21.34	157.17 $\pm$ 16.27
	Pré-AMX 24h	330.13 $\pm$ 37.20	320.61 $\pm$ 11.86
	Pré-AMX 48h	229.35 $\pm$ 23.14	370.00 $\pm$ 25.45
CONTROLES	Hp	107.52 $\pm$ 21.94	157.00 $\pm$ 8.48
	Hp 24h	234.50 $\pm$ 25.94	258.33 $\pm$ 16.07
	Hp 48h	211.93 $\pm$ 0.75	425.12 $\pm$ 22.48
	LPS	68.29 $\pm$ 7.83	68.29 $\pm$ 7.83
	Controle negativo	31.59 $\pm$ 1.09	0

* pg/mL em relação à liberação de IL-1 β e IL -12 por macrófagos sem infecção e tratamento, apresentados como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção.

4.3.2. Interleucina - 6

A indução de IL - 6 em macrófagos por *H. pylori*, mantidos ou tratados com AMX após 24 horas de incubação, é apresentada na Figura 6 e Tabela 3. Independente da concentração do antimicrobiano na manutenção da cepa, a concentração de IL - 6 no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com *H. pylori* não sofreu alteração. Observou-se analogia na resposta para essa citocina intergrupos, independente do tempo de incubação.

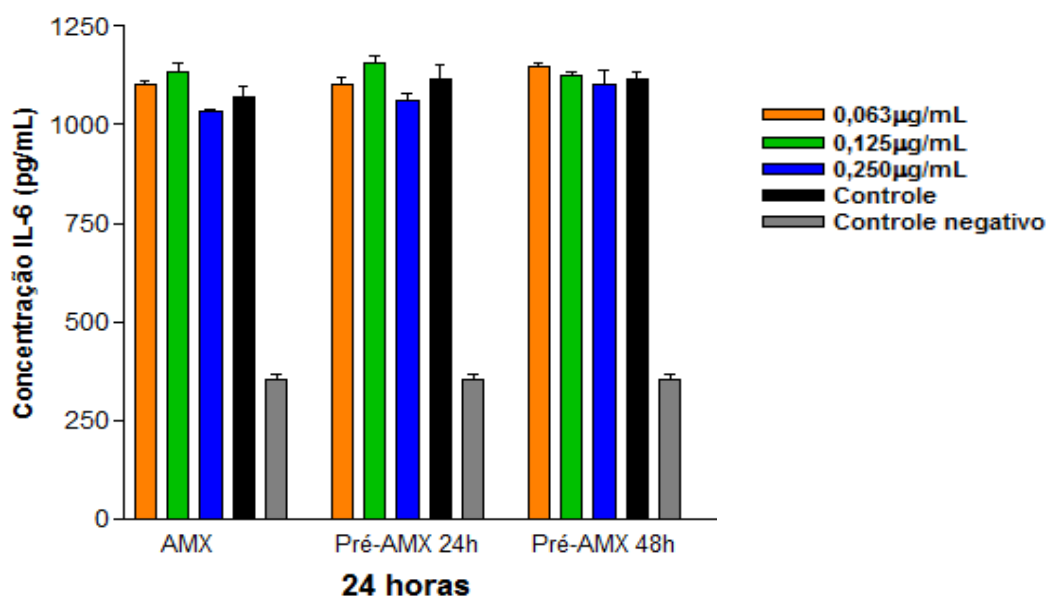


Figura 6: Concentração de IL - 6 liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com *H. pylori*. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção. Diferença estatística intra-grupo em relação ao controle # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; diferença estatística intergrupos em relação às diferentes concentrações de AMX * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 3: Indução de IL-6 em macrófagos por *H. pylori* mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação

SUSPENSÕES DE <i>H. pylori</i>		IL – 6 (pg/mL)*
		24h
0,063 µg/mL de AMX	AMX	1099.6±22.55
	Pré-AMX 24h	1101.1±33.47
	Pré-AMX 48h	1147.2±13.28
0,125 µg/mL de AMX	AMX	1134.4±40.29
	Pré-AMX 24h	1321.8±190.13
	Pré-AMX 48h	1123.9±19.22
0,250 µg/mL de AMX	AMX	1031.8±15.15
	Pré-AMX 24h	1060.6±30.64
	Pré-AMX 48h	1103.1±61.96
CONTROLES	Hp	946.80±252.58
	Hp 24h	1116.0±52.96
	Hp 48h	1115.8±30.00
	LPS	1184.5±69.71
	Controle negativo	351.25±27.16

* pg/mL em relação à liberação de IL-6 por macrófagos sem infecção e tratamento, apresentados como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção.

4.3.3. Fator de Necrose Tumoral - α

Em relação à indução de TNF - α em macrófagos por *H. pylori*, a Figura 7 e Tabela 4 apresentam os níveis dessa citocina no sobrenadante da cultura após 24 horas de incubação. *H. pylori* previamente mantido nas diferentes concentrações de AMX por 24 e 48 horas induziram maior produção de TNF - α ($p < 0,05$) em relação a cepa tratada no momento do ensaio. Entretanto, não

houve diferença na concentração de TNF - α no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com *H. pylori* quando comparado aos controles.

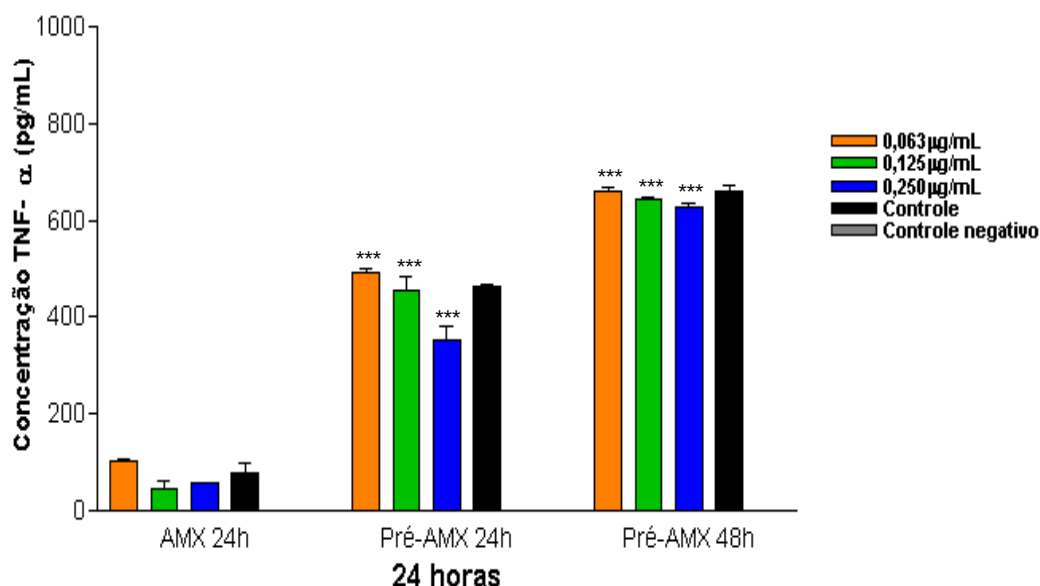


Figura 7: Concentração de TNF - α liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com *H. pylori*. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção. Diferença estatística intra-grupo em relação ao controle # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; diferença estatística intergrupos em relação às diferentes concentrações de AMX * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 4: Indução de TNF- α em macrófagos por *H. pylori* mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação

SUSPENSÕES DE <i>H. pylori</i>		TNF - α (pg/mL)*
		24h
0,063 μ g/mL de AMX	AMX	103.74 $\pm$ 0.74
	Pré-AMX 24h	491.13 $\pm$ 11.67
	Pré-AMX 48h	660.20 $\pm$ 7.94
0,125 μ g/mL de AMX	AMX	44.450 $\pm$ 26.02
	Pré-AMX 24h	455.61 $\pm$ 39.75
	Pré-AMX 48h	645.08 $\pm$ 5.11
0,250 μ g/mL de AMX	AMX	55.100 $\pm$ 2.48
	Pré-AMX 24h	352.14 $\pm$ 41.74
	Pré-AMX 48h	627.59 $\pm$ 10.82
CONTROLES	Hp	79.100 $\pm$ 26.87
	Hp 24h	461.47 $\pm$ 7.46
	Hp 48h	660.05 $\pm$ 15.77
	LPS	68.29 $\pm$ 7.83
	Controle negativo	0

* pg/mL em relação à liberação de TNF- α por macrófagos sem infecção e tratamento, apresentados como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção.

4.3.4. Fator transformador de crescimento – β

H. pylori previamente mantidos nas diferentes concentrações de AMX por 48 horas induziram maior produção de TGF - β no sobrenadante das culturas ($p < 0,05$) em relação à cepa tratada no momento do ensaio, não havendo alteração na indução deste fator quando comparada à induzida por bactérias não expostas ao antimicrobiano (controle) (Figure 8 e Tabela 5).

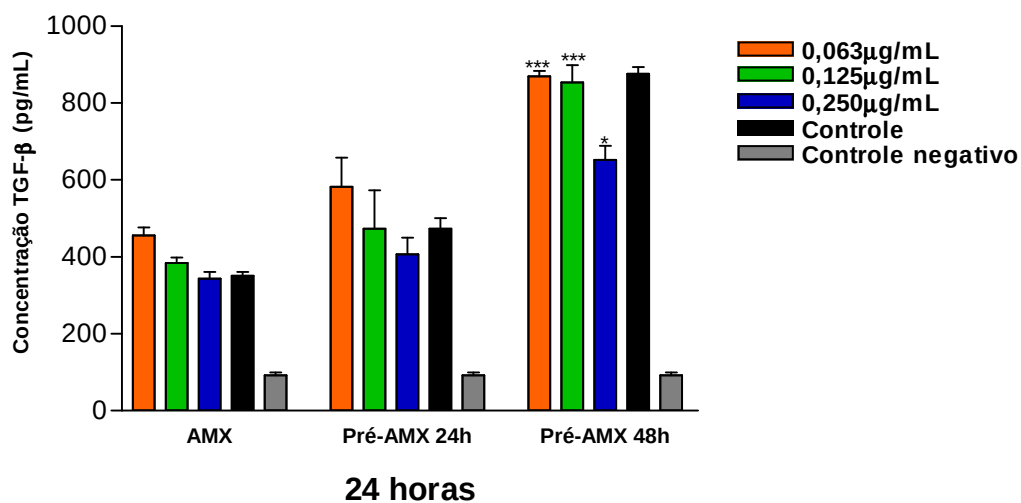


Figura 8: Concentração de TGF- β liberada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após 24 horas de infecção com *H. pylori*. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção. Diferença estatística intra-grupo em relação ao controle # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; diferença estatística intergrupos em relação às diferentes concentrações de AMX * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 5: Indução de TGF - β em macrófagos por *H. pylori* mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 24 horas de incubação

SUSPENSÕES DE <i>H. pylori</i>		TGF - β (pg/mL)*
		24h
0,063 μ g/mL de AMX	AMX	455.00 $\pm$ 36.38
	Pré-AMX 24h	581.67 $\pm$ 132.54
	Pré-AMX 48h	869.33 $\pm$ 25.38
0,125 μ g/mL de AMX	AMX	384.33 $\pm$ 24.82
	Pré-AMX 24h	472.67 $\pm$ 174.28
	Pré-AMX 48h	854.00 $\pm$ 63.64
0,250 μ g/mL de AMX	AMX	344.00 $\pm$ 24.04
	Pré-AMX 24h	407.00 $\pm$ 74.32
	Pré-AMX 48h	652.00 $\pm$ 63.69
CONTROLES	Hp	351.00 $\pm$ 14.14
	Hp 24h	472.50 $\pm$ 38.89
	Hp 48h	876.50 $\pm$ 24.74
	LPS	68.29 $\pm$ 7.83
	Controle negativo	91.950 $\pm$ 11.24

* pg/mL em relação à liberação de TGF- β por macrófagos sem infecção e tratamento, apresentados como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas em diferentes concentrações de AMX, após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. **Controle negativo:** Macrófagos sem tratamento e infecção.

4.3.5. Interleucina - 10

A manutenção ou tratamento com AMX não alterou a produção dessa interleucina por macrófagos (dados não apresentados).

4.4. Viabilidade de macrófagos após infecção com *H.pylori* através da técnica de MTT

Macrófagos infectados com *H. pylori* tratados com as diferentes concentrações de AMX no momento do ensaio e incubados por 6, 24 e 48 horas (AMX) não apresentaram variação significativa na viabilidade independente da concentração do antimicrobiano, sendo maior que a observada para os grupos controles. Entretanto, macrófagos infectados com *H. pylori* previamente mantidos em 0,063, 0,125 e 0,250 µg/mL de AMX por 24 e 48 horas apresentaram diminuição significativa de viabilidade ($p < 0,05$) em relação aos respectivos controles após 6, 24 e 48 horas de incubação. Contudo, a análise intergrupos demonstrou diminuição significativa na viabilidade de macrófagos infectados com *H. pylori* previamente mantido por 24 e 48 horas nas diferentes concentrações de AMX ($p < 0,05$) quando comparada à do grupo tratado no momento do ensaio (Figura 9 e Tabela 6).

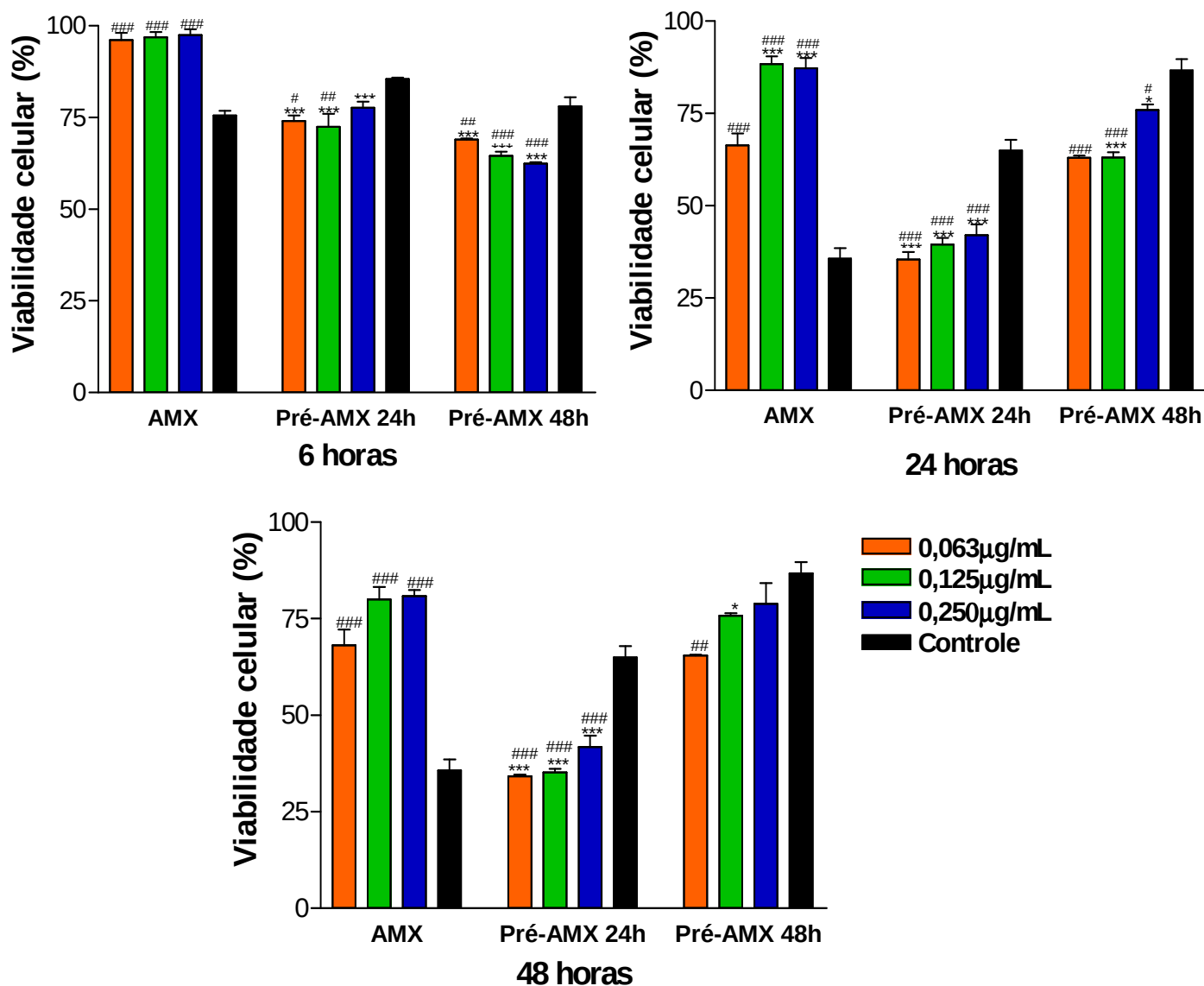


Figura 9: Viabilidade de macrófagos após 6, 24 e 48 horas de infecção com *H. pylori*. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo as diferentes concentrações de AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença do antimicrobiano após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas. Diferença estatística intra-grupo em relação ao controle # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001; diferença estatística intergrupos em relação às diferentes concentrações de AMX * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Tabela 6: Viabilidade de macrófagos infectados com *H. pylori* mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 6, 24 e 48 horas

TEMPO DE INFECÇÃO (h)	Viabilidade Celular (%)*			
	Amoxicilina (µg/mL)	AMX	Pré-AMX 24h	Pré-AMX 48h
6h	0,063	96.17±3.26	74.05±2.64	68.92±0.617
	0,125	96.90±2.42	72.46±6.07	64.53±1.97
	0,250	97.44±2.73	77.66±2.80	62.44±0.675
	Controle	75,55±2,21	85,47±0,62	78,03±4,37
24h	0,063	66.33±5.69	35.42±3.50	63.06±0.94
	0,125	88.38±3.58	39.54±2.96	63.13±2.41
	0,250	87.25±4.76	42.00±5.16	75.93±2.60
	Controle	35,66±5,00	64,96±5,10	86,70±5,26
48h	0,063	68.16±6.97	34.22±0.75	65.42±0.49
	0,125	80.05±5.50	35.16±1.69	75.76±1.21
	0,250	80.88±2.74	41.81±5.07	78.90±9.21
	Controle	35,66±5,00	64,96±5,10	86,70±5,26

* Porcentagem em relação à viabilidade de macrófagos sem infecção e tratamento, apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo as diferentes concentrações de AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas, respectivamente, na presença do antimicrobiano após lavagens com PBS estéril. **Controle:** *H. pylori* preparado no momento do ensaio e *H. pylori* cultivado por 24 e 48 horas.

4.5. Morte de macrófagos infectados com *H.pylori* avaliados por citometria de fluxo

A Figura 10 e Tabela 7 apresenta o tipo de morte induzida por *H. pylori* em macrófagos após 6, 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. A análise intra - grupo após 6 horas de incubação, demonstrou que macrófagos infectados com *H. pylori* tratado no momento do ensaio e na ausência de AMX (controle) apresentaram maior índice de apoptose em relação à infecção com *H. pylori* previamente mantidos por 24 e 48 horas nas diferentes concentrações

de AMX ($p < 0,001$). Macrófagos infectados com *H. pylori* previamente mantidos por 24 e 48 horas apresentaram maior índice de apoptose em relação aos respectivos controles ($p < 0,001$) quando incubados por 24 e 48 horas.

A análise intergrupos evidenciou maior índice de apoptose precoce e tardia em macrófagos infectados com *H. pylori* previamente mantidos por 24 e 48 horas na concentração de 0,063 $\mu\text{g/mL}$ de AMX ($p < 0,001$) em comparação ao induzido por *H. pylori* tratado no momento do ensaio nas mesmas condições.

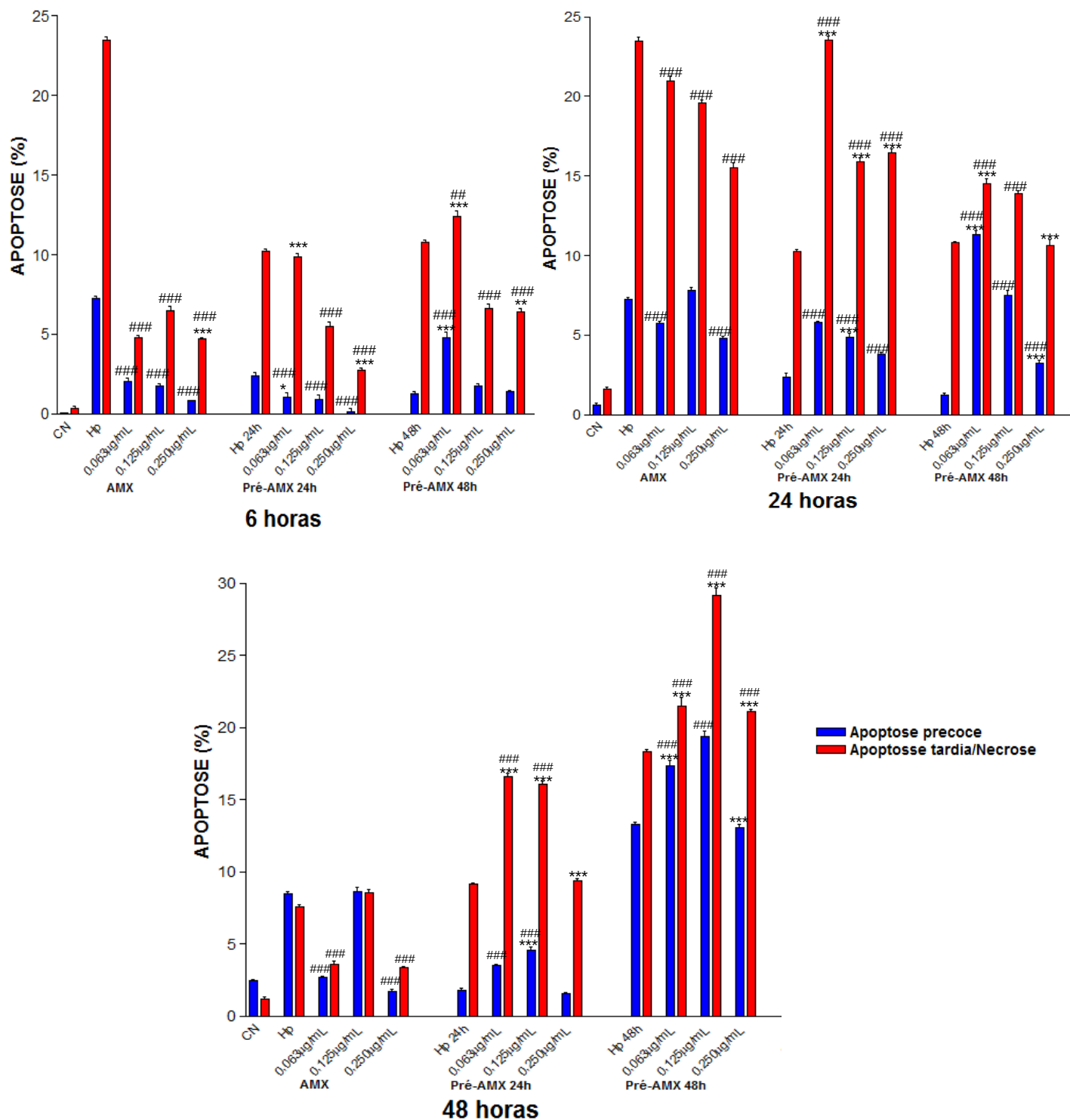


Figura 10: Apoptose de macrófagos após 6, 24 e 48 horas de infecção com *H. pylori* determinada por citometria de fluxo. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo diferentes concentrações de AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantido por 24 e 48 horas em AMX, após lavagens com PBS estéril. **CN:** Macrófagos sem tratamento e infecção. **Hp:** *H. pylori* no momento do ensaio. **Hp 24h/48h:** *H. pylori* cultivados por 24 e 48 horas. Diferença estatística intra - grupo em relação ao controle # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; diferença estatística intergrupos em relação às diferentes concentrações de AMX * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 7: Apoptose precoce e apoptose tardia/necrose em macrófagos infectados com *H. pylori* mantidos ou não em diferentes concentrações de AMX após 6, 24 e 48 horas de incubação

TEMPO DE INFECÇÃO (h)	MORTE CELULAR (%)*						
	Amoxicilina (µg/mL)	AMX		Pré-AMX 24h		Pré-AMX 48h	
		Apoptose precoce	Apoptose tardia/necrose	Apoptose precoce	Apoptose tardia/necrose	Apoptose precoce	Apoptose tardia/necrose
6h	0,063	2.07±0.3	4.80±0.3	1.03±0.5	9.90±0.4	4.80±0.5	12.43±0.6
	0,125	1.77±0.3	6.50±0.5	0.90±0.5	5.46±0.5	1.76±0.3	6.60±0.5
	0,250	0.80±0.1	4.70±0.2	0.33±0.2	2.73±0.2	1.36±0.2	6.43±0.3
	Controle	7.23±0.3	23.46±0.5	2.40±0.2	10.23±0.3	1.23±0.3	10.80±0.2
	LPS	2.40±0.4	12.50±0.5	2.40±0.5	12.50±0.5	4.46±0.4	16.20±0.3
	Controle Negativo	0.03±0.1	0.36±0.2	0.03±0.1	0.36±0.2	0.03±0.1	0.36±0.2
24h	0,063	5.76±0.2	20.96±0.5	5.80±0.1	23.53±0.5	11.30±0.4	14.53±0.5
	0,125	7.83±0.4	19.56±0.4	4.90±0.4	15.88±0.4	7.50±0.5	13.90±0.4
	0,250	4.80±0.3	15.53±0.5	3.83±0.2	16.46±0.5	3.26±0.3	10.66±0.6
	Controle	7.23±0.3	23.46±0.5	2.40±0.4	10.23±0.3	1.23±0.3	10.80±0.2
	LPS	3.56±0.3	11.70±0.4	3.56±0.3	11.70±0.4	2.13±0.3	12.46±0.5
	Controle Negativo	0.63±0.2	1.63±0.2	0.63±0.2	1.63±0.2	0.63±0.2	1.63±0.2
48h	0,063	2.66±0.2	3.60±0.4	3.50±0.1	16.56±0.4	17.33±0.7	21.46±1.1
	0,125	8.66±0.4	8.53±0.5	4.56±0.4	16.10±0.4	19.40±0.7	29.16±0.8
	0,250	1.73±0.2	3.33±0.2	1.56±0.2	9.40±0.2	13.10±0.4	21.10±0.3
	Controle	8.46±0.3	7.60±0.2	1.76±0.3	9.13±0.2	13.26±0.3	18.30±0.3
	LPS	5.43±0.2	13.46±0.4	5.43±0.2	13.46±0.4	11.50±0.5	29.40±0.5
	Controle Negativo	2.43±0.2	1.20±0.2	2.43±0.2	1.20±0.2	2.43±0.2	1.20±0.2

* Porcentagem em relação ao tipo de morte celular de macrófagos sem infecção e tratamento, apresentados como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. **AMX:** *H. pylori* em meio DMEM contendo diferentes concentrações de AMX no momento do ensaio. **Pré-AMX 24h/48h:** *H. pylori* mantido por 24 e 48 horas em AMX, após lavagens com PBS estéril. **CN:** Macrófagos sem tratamento e infecção. **Hp:** *H. pylori* no momento do ensaio. **Hp 24h/48h:** *H. pylori* cultivados por 24 e 48 horas.

4.6. Perfil eletroforético dos extratos de *Helicobacter pylori*

Os extratos proteicos foram obtidos da cepa ATCC 43504 de *H. pylori* mantida em diferentes concentrações de AMX e na ausência (controle) por 24, 48 e 72 horas. Nos extratos de *H. pylori* mantidos nas diferentes concentrações

de AMX, as bandas mais evidentes foram de 84, 67, 62, 60, 58, 56, 48, 45, 42, 38, 34, 32, 30, 29, 27, 24, 22, 20, 18 e 15 kDa (Figura 11) e na ausência de amoxicilina as bandas mais evidentes foram de 86, 78, 76, 67, 60, 58, 52, 38, 34, 30, 20, 18, 17, 16, 15, 14 e 11 kDa.

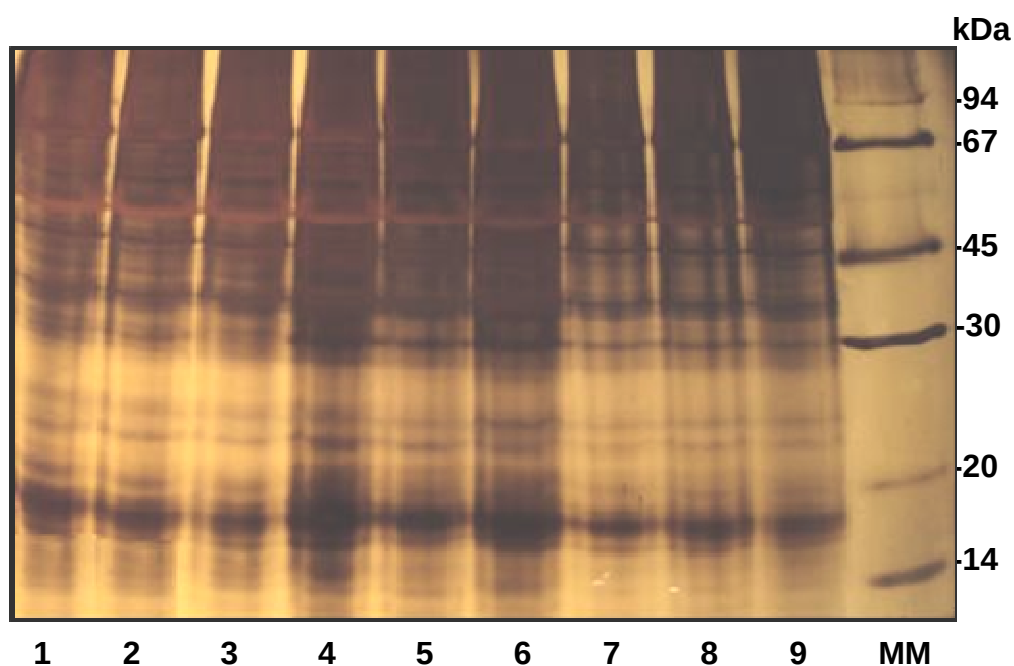


Figura 11: SDS-PAGE dos extratos de *H. pylori* mantidos em diferentes concentrações de AMX por 24, 48 e 72 horas, corado pelo nitrato de prata. Extrato de *H. pylori* na concentração de 0,063µg/mL: (1) 24 horas; (2) 48 horas; (3) 72 horas. Extrato de *H. pylori* na concentração de 0,125µg/mL: (4) 24 horas; (5) 48 horas; (6) 72 horas. Extrato de *H. pylori* na concentração de 0,250µg/mL: (7) 24 horas; (8) 48 horas; (9) 72 horas. MM: massa molecular.

O perfil eletroforético desses extratos mostrou bandas que variaram de 100 a 11 kDa em geral e diferenças quanto a intensidade e número de bandas. Essas observações não são suficientes para a caracterização das proteínas diferencialmente expressas na presença de AMX, sendo necessária a eletroforese bidimensional para atingir esse objetivo.

4.7. Análise protéica por eletroforese bidimensional de extratos de *H. pylori*

A eletroforese bidimensiobnal do extrato protéico obtido de *H. pylori* mantido em AMX na concentração de 0,063, 0,125 e 0,250 µg/mL por 24 horas apresentou: 312 spots com proteínas variando de 107,96 a 13 kDa e *pIs* de 9,0777 a 4,1351 (Figura 12 - A), 340 spots que variaram de 107,27 a 13,6 kDa e *pIs* de 9,331a 3,7 (Figura 12 - B) e 244 spots que variaram de 107,17 kDa a 14,03 e *pIs* de 8,226 a 4,428 (Figura 12 - C), respectivamente. O extrato proteico do controle obtido após 24 horas de incubação apresentou 138 spots com proteínas variando de 86,47 a 14,52 kDa e *pIs* de 7,166 a 3,951 (Figura 12 - D).

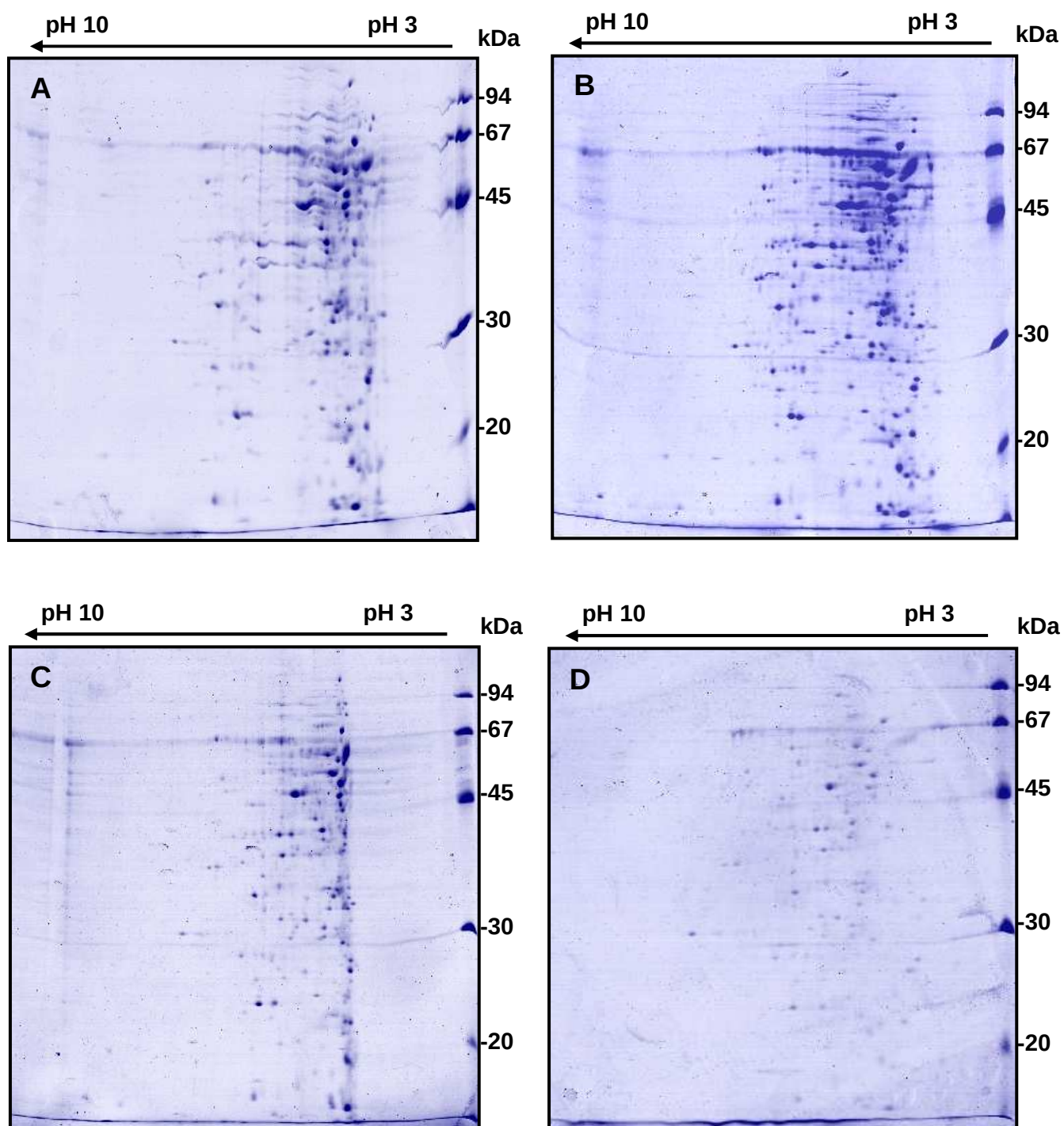


Figura 12: Géis obtidos por eletroforese bidimensional dos extratos proteicos de *H. pylori* mantido em 0,063 µg/mL (A), 0,125 µg/mL (B), 0,250 µg/mL de amoxicilina (C) e na ausência (D) por 24 horas, corados por Coomassie Blue R-250.

O extrato protéico obtido de *H. pylori* mantido por 48 horas nas mesmas condições apresentou: 308 spots com proteínas variando de 109 a 13,5 kDa e *pI*s de 9,288 a 4,173 (Figura 13 - E), 275 spots que variaram de 92,02 a 13,81 kDa e *pI*s de 7,215 a 3,711 (Figura 13 - F) e 119 spots que variaram de 88,19 a 13,92 kDa e *pI*s de 8,324 a 4,149 (Figura 13 - G). O extrato proteico do controle em 48 horas apresentou 130 spots com proteínas variando de 90,47 kDa a 13,95 e *pI*s de 6,194 a 4,097 (Figura 13 - H).

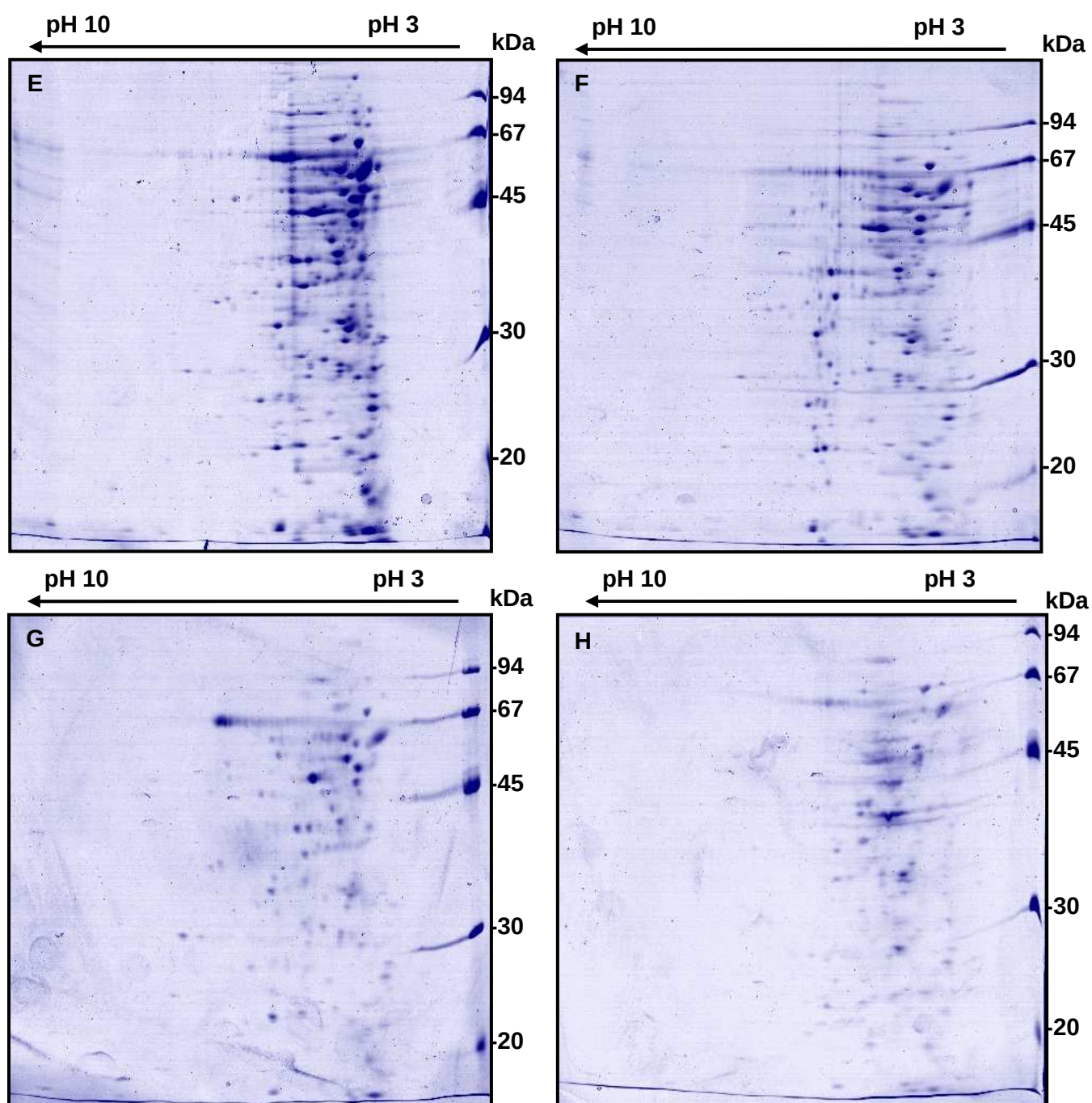


Figura 13: Géis obtidos por eletroforese bidimensional dos extratos proteicos de *H. pylori* mantido em 0,063 $\mu\text{g/mL}$ (A), 0,125 $\mu\text{g/mL}$ (B), 0,250 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina (C) e na ausência (D) por 48 horas, corados por Coomassie Blue R-250.

Após análise pelo *software* ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare), 31 proteínas diferencialmente expressas representadas pela média da intensidade em volume percentual tiveram seus spots cortados e estes foram identificados por Synapt HDMS. Deste total, 9 proteínas/spots apresentaram identificação significativa (*score* maior que o limite de significância) com *H. pylori* e homologia com outras bactérias quando testados contra um banco de proteínas de Eubactérias.

Dentre as proteínas diferencialmente expressas selecionadas, conforme demonstradas nas Figuras 14 e 15 e Tabela 8, foi observado aumento significativo na expressão ($p < 0,05$) de chaperona dnaK (proteína de choque térmico 70 kDa), ATP subunidade alfa sintase, chaperona de 60 kDa, enolase, argininosuccinato sintase, RNA polimerase subunidade alfa, superóxido dismutase, proteína ativadora de neutrófilos e proteína ribossomal 50S quando a cepa foi tratada com as concentrações subinibitórias de 0,063 e 0,125 µg/mL de amoxicilina. Houve menor indução dessas proteínas quando a bactéria foi mantida na concentração inibitória mínima de amoxicilina e na sua ausência.

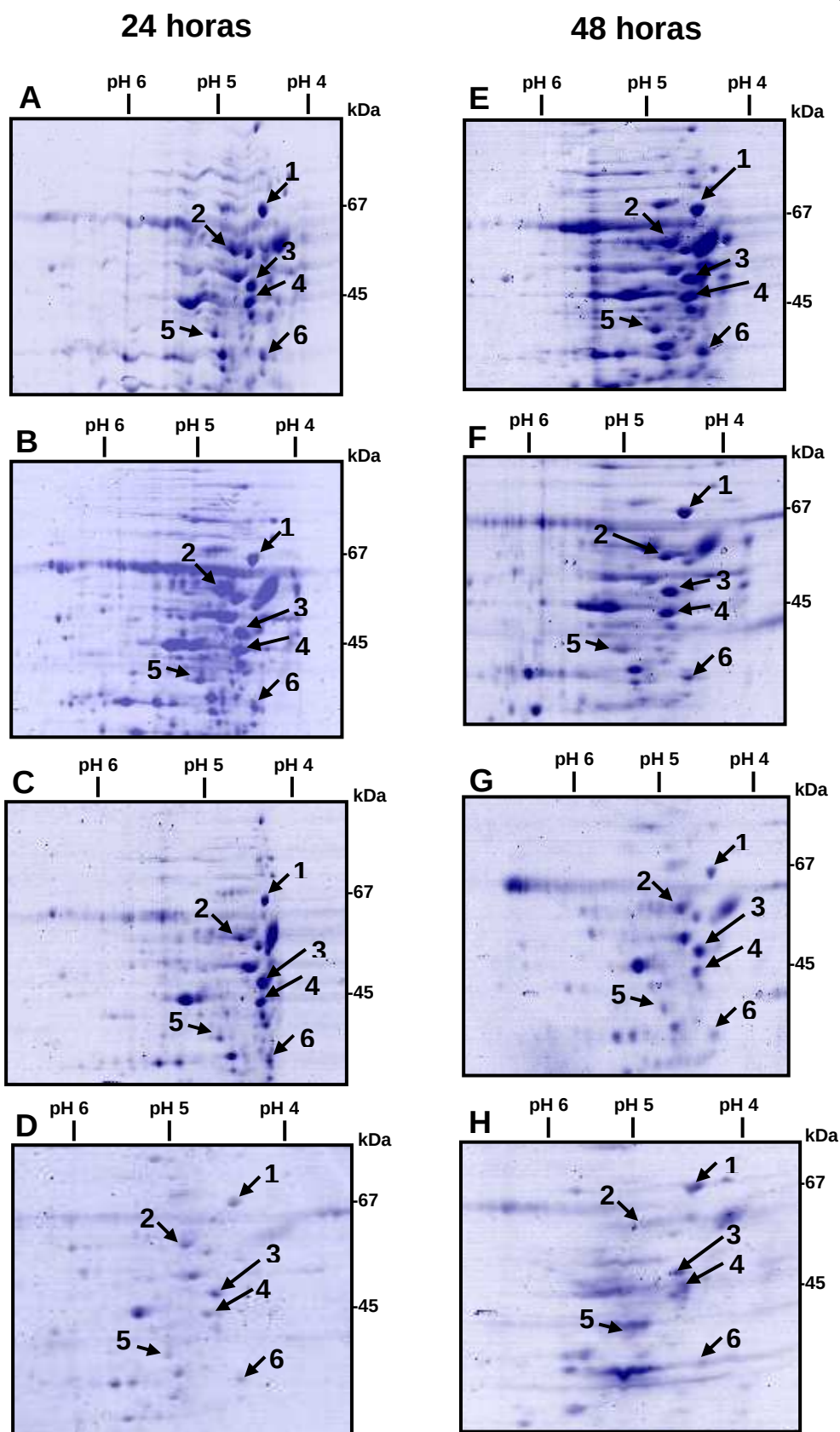


Figura 14: Seleção de proteínas/spots diferencialmente expressos (% volume) identificados por Synapt HDMS. Proteínas de *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas respectivamente em 0,063 µg/mL (A, E), 0,125 µg/mL (B, F), 0,250 µg/mL de amoxicilina (C, G) e na ausência (D, H), corados por Coomassie Blue R-250.

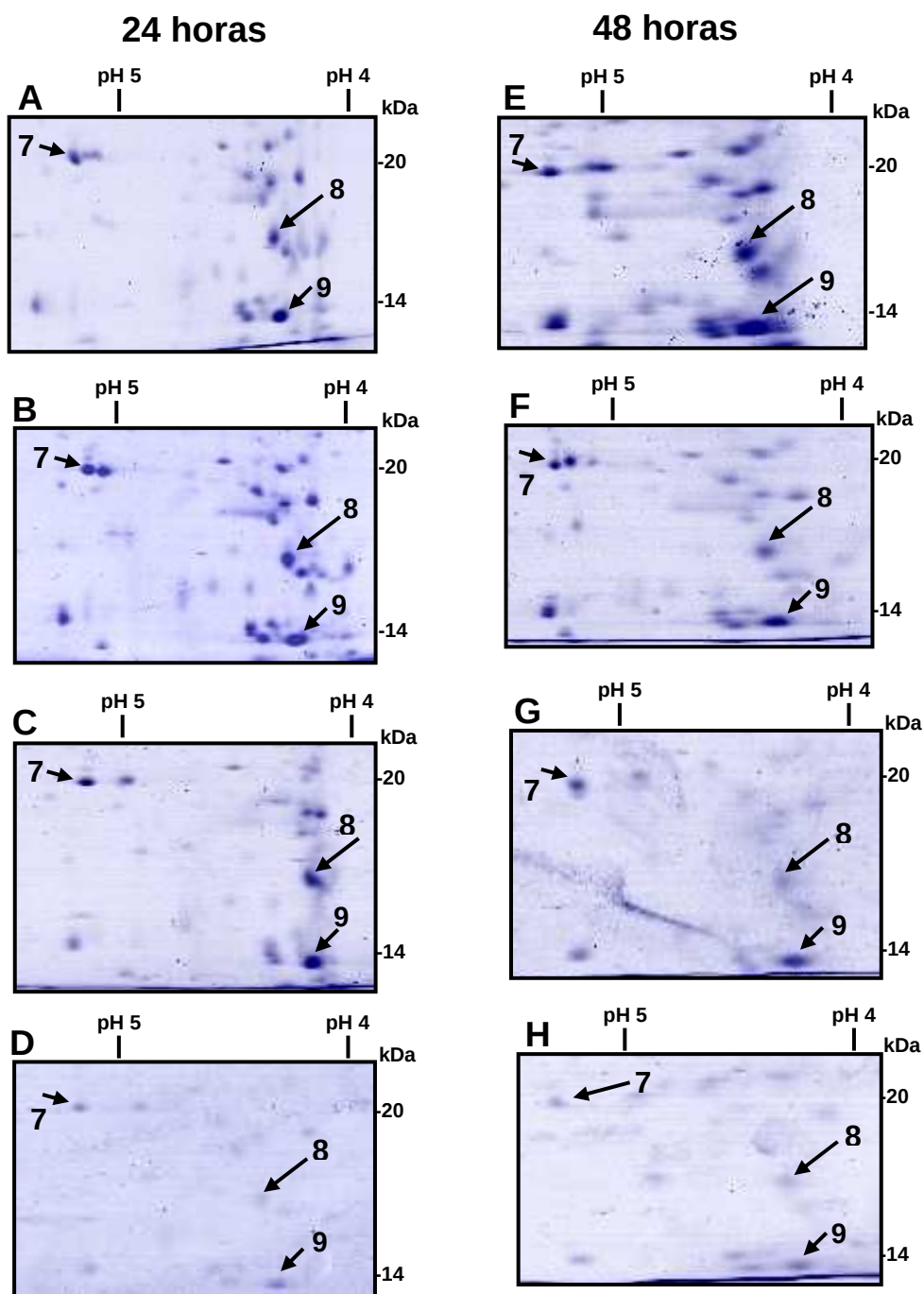


Figura 15: Seleção de proteínas/spots diferencialmente expressos (% volume) identificados por Synapt HDMS. Proteínas de *H. pylori* mantidos por 24 e 48 horas respectivamente em 0,063 µg/mL (A, E), 0,125 µg/mL (B, F), 0,250 µg/mL de amoxicilina (C, G) e na ausência (D, H), corados por Coomassie Blue R-250.

Tabela 8: Proteínas/spots diferencialmente expressas de *H. pylori* cultivado em concentrações subinibitórias de amoxicilina após 24 e 48 horas de incubação identificadas por Synapt HDMS

SPOT	PROTEÍNAS	MMI/pl Experimental	MMI/pl Teórico	Expressão proteica diferencial (% volume)								FUNÇÃO
				Concentração de amoxicilina (µg/mL)								
				24 h				48 h				
				0,063	0,125	0,250	C+	0,063	0,125	0,250	C+	
1	Chaperona dnaK (proteína de choque térmico 70kDa)	64,10/4,61	67,19/4,59	1,75	1,76	1,37	0,78	2,53	2,16	1,73	1,74	Enovelamento de proteína, agrupamento, transporte, reparo em condições de estresse térmico, por acidez ou osmótico (SCHUMANN et al. ,2007). Adesão, adaptação na mucosa gástrica e proteção da bactéria contra EROs e NO (BELLMANN et al., 1996).
2	ATP subunidade alfa sintase	54,13/4,92	58,78/4,84	1,63	1,58	0,98	1,21	1,74	1,77	1,55	1,11	Homeostase do pH e produção de ATP a partir de ADP, subunidade reguladora (MARTÍN-GALIANO et al., 2001).
3	Chaperona 60 kDa (proteína de choque térmico)	49,93/4,73	56,79/4,86	1,75	1,45	1,28	0,97	2,23	1,76	1,30	1,76	Enovelamento de proteína, agrupamento, transporte, reparo, tanto em condições de estresse (SCHUMANN et al. ,2007).
4	Enolase	44,27/4,76	45,05/4,69	1,49	1,34	1,23	0,95	2,74	2,22	1,58	0,98	Catalisa a conversão reversível de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, essencial para a degradação de hidratos de carbono via glicólise (PANCHOLI, 2001).
5	Argininosuccinato sintase	41,09/5,11	44,03/4,84	0,79	0,77	0,71	0,50	0,87	0,84	0,67	0,65	Processo de biossíntese de argininosuccinato. Ciclo da ureia (MENDZ et al., 1996)
6	RNA polimerase subunidade alfa	37,67/4,61	36,70/4,48	0,84	0,79	0,50	0,43	1,02	0,64	0,63	0,63	Transcrição do DNA em RNA (UniProt KB, 2012).
7	Superoxide dismutase	21,15/5,80	22,53/5,29	0,89	0,83	0,74	0,51	0,95	1,04	0,55	0,56	Destruição dos radicais ânion superóxido produzidos no interior das células e que são tóxicos para os sistemas biológicos (SPIEGELHALDER et al., 1993).
8	Proteína ativadora de neutrófilos (NAP)	17,24/4,69	16,83/4,64	1,10	0,82	0,71	0,62	1,34	1,20	0,47	0,67	Indutor da quimiotaxia de neutrófilos às células endoteliais, liberação de EROs, provocando danos ao epitélio e ao DNA das células (PINHEIRO JR et al., 2007).
9	Proteína ribossomal 50S	13,88/4,59	13,42/4,49	1,61	1,70	1,40	0,95	1,97	1,80	1,65	1,42	Ligação ao RNAr 23S e contato com o sítio A e P do RNAt (UniProt KB, 2012).

5. Discussão

Concentrações de antibióticos abaixo da concentração inibitória mínima (MIC) são conhecidas por promover variações nos fatores de virulência bacterianos, afetando a reposta do hospedeiro (WORLITZSCH et al., 2001). Sabe-se que durante o processo de colonização e infecção, vários fatores de virulência são induzidos para garantir a sobrevivência da bactéria, entre eles a regulação do pH citoplasmático, síntese de proteínas de reparo, proteínas de choque térmico (com função de chaperonas) e produção de compostos básicos (SATORHELYI, 2004).

As proteínas de choque térmico compreendem um subgrupo de chaperonas constitutivas ou induzidas em resposta às condições ambientais adversas (incluindo, mas não só limitadas ao calor excessivo) (SCHUMANN et al., 2007). *H. pylori* cultivados na presença de concentrações subinibitórias de amoxicilina apresentaram maior expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (hsp 70 kDa) e 60 kDa (hsp 60 kDa) ($p < 0,001$). Essas proteínas apresentam expressão aumentada em condições de estresse, promovendo o enovelamento, reparo e, conseqüentemente, impedindo a desnaturação de proteínas; atuam também na remoção de proteínas desnaturadas (ITO; TASHIMA, 1991; SCHUMANN et al., 2007). Alguns estudos sugerem um papel de adesinas para ambas as classes de chaperonas, colaborando na invasão da célula hospedeira (HUESCA et al. 1996; YAMAGUCHI et al., 1997).

Um mecanismo de defesa do hospedeiro contra os micro-organismos é a geração de altos níveis de óxido nítrico. Neste estudo, demonstramos que *H. pylori* mantidos em concentrações subinibitórias de amoxicilina aumentaram a

indução de NO pelos macrófagos quando comparados aos seus respectivos controles sem tratamento. O aumento dessa espécie reativa poderia, rapidamente, matar o *H. pylori*, entretanto esta bactéria apresenta um sistema antioxidante (proteínas de choque térmico de 70 e 60 kDa e superóxido dismutase) capaz de combater essas EROs e NO, permitindo sua sobrevivência no sítio da infecção (ERNST et al., 2005; WANG et al., 2006). Aumento na indução de NO pode ser associado à elevação dessas proteínas, conforme demonstrado através da análise proteômica. Apesar dessas proteínas terem ação antioxidante, o *H. pylori* durante a infecção induz resposta inflamatória, com aumento na produção da quimiocina CXCL - 8 pelos fagócitos, aumentando a produção de EROs e NO, induzindo produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim para o estresse oxidativo e danos na mucosa gástrica (MEYER et al., 2000; AUGUSTO et al., 2007; YAMAOKA et al., 2007).

Proteínas capazes de exibir mais de uma função são denominadas de proteínas *moonlighting* e muitas, envolvidas na regulação metabólica em resposta ao estresse, tem ações adicionais na virulência bacteriana. Enolase é uma enzima da via glicolítica que catalisa a conversão reversível de 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato (PANCHOLI, 2001). Diversos trabalhos demonstram que a enolase de bactérias patogênicas (estreptococos e pneumococos) e da microbiota (lactobacilos e bifidobactérias), além de ser essencial para garantir a viabilidade bacteriana, promove a interação do patógeno com o hospedeiro, contribuindo para colonização e patogênese (LAHTENMAKI et al., 1995; BERGMANN et al., 2001; CANDELA et al., 2007; HURMALAINEN et al., 2007). Nossos resultados demonstraram que a

expressão de enolase em *H. pylori* é aumentada na presença de amoxicilina. Essa proteína quando exposta na superfície bacteriana serve de receptor para vários ligantes, incluindo plasminogênio (SEWERYN et al., 2007).

Diversos trabalhos demonstram a interação de proteínas de superfície bacteriana com o plasminogênio humano, sendo um mecanismo muito comum usados pelas bactérias para facilitar a invasão tecidual (VALLS SERÓN et al., 2010; FLODEN et al., 2011). Várias espécies bacterianas são capazes de gerar seus próprios ativadores de plasminogênio, como por exemplo estreptococos do grupo A e *Staphylococcus aureus* que secretam estreptoquinase e estafiloquinase, respectivamente, ativadores de plasminogênio (BACHMANN, 1995). Assim como outros patógenos bacterianos, *H. pylori* expressa proteínas de superfície com afinidade para várias proteínas humanas, como os componentes da matriz extracelular de mamíferos, tais como laminina, vitronectina, colagênio tipos I e IV e plasminogênio (KHIN et al., 1996; RINGNÉR et al., 1992; TRUST et al., 1991; VALKONEN et al., 1993) e duas proteínas de 42 e 57 kDa relatadas ligantes como ligantes de plasminogênio (PANTZAR et al., 1998). Proteínas recombinantes (55 e 65 kDa) obtidas a partir de *H. pylori* cepa CCUG 17874 e 26695, descritas como ligantes de plasminogênio que apresentam domínios expostos na superfície da bactéria, permitem que o *H. pylori* seja revestido externamente com plasminogênio que é convertido em plasmina, através de um ativador de plasminogênio (JÖNSSON et al., 2003). Esse mecanismo poderia favorecer o desenvolvimento da úlcera impedindo o processo natural de cura (JÖNSSON et al., 2003).

Maior expressão de proteína ativadora de neutrófilos (NAP) ($p < 0,05$) foi observada em *H. pylori* cultivados nas concentrações sub-CIMs de amoxicilina.

Sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir essa proteína cuja função é atrair neutrófilos e monócitos para o sítio da infecção, durante a resposta inflamatória, induzindo a produção de EROs e NO e contribuindo para a degeneração da superfície do epitélio (EVANS et al., 1995; SATIN et al., 2000; BRISSLERT et al., 2005; AMEDEI et al., 2006; PINHEIRO JR et al., 2007). A NAP é capaz de estimular eficientemente a síntese de fator tecidual e inibidor do ativador de plasminogênio em monócitos humanos, provocando alteração no equilíbrio existente entre coagulação e fibrinólise. Assim sendo, a NAP pode favorecer o desenvolvimento da cronicidade da infecção e ruptura do tecido, dificultando a cicatrização e remoção da fibrina, bem como a movimentação dos fagócitos, protegendo *H. pylori* da fagocitose (MONTEMURRO et al., 2001).

Óxido nítrico é uma molécula sinalizadora importante e componente da resposta inflamatória e seu aumento atua citotxicamente, contribuindo para o desenvolvimento da inflamação (CORREA, 1992). Nossos achados corroboram com outros trabalhos que demonstram aumento de NO após estresse abióticos, tais como osmótico, acidez e térmico.

O aumento na expressão de superóxido dismutase pelo *H. pylori* cultivados nas sub-CIMs de amoxicilina confere a bactéria proteção contra a fagocitose e destruição intracelular, por ser uma enzima extracelular fundamental para sobrevivência da bactéria na mucosa inflamada (PINHEIRO JR et al., 2007).

As citocinas pró-inflamatórias desempenham um importante papel na patogênese da gastrite causada por *H. pylori*, cujo processo é desencadeado pelo aumento da produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 e IL-12 na mucosa,

podendo induzir apoptose celular (HARRIS et al., 1998; WANG et al., 2010; MA et al., 2010; MANENTE et al., 2008; ANDRES et al., 2011). Neste estudo foi observado que *H. pylori* mantido em amoxicilina em sub-CIMs estimula a liberação de IL - 1 β por macrófagos. Conforme demonstrado por outros autores, as proteínas de choque térmico poderiam estar auxiliando nesta indução (LIN et al., 2009; LIN et al., 2010).

Além do seu papel na inflamação, a IL - 1 β também é um potente inibidor da secreção de ácido gástrico (EL-OMAR, 2001). Esta citocina ativa as vias de sinalização em células epiteliais gástricas diminuindo a transcrição do gene HK α , com consequente diminuição da expressão de bombas de prótons funcionais, contribuindo para hipocloridria gástrica (SAHA et al., 2008). Diversos estudos clínicos demonstram que a hipocloridria predispõe a atrofia gástrica (WAGHRAY et al., 2010) e que esta condição pode ser induzida pelo aumento na expressão de proteína de choque térmico de 60 kDa (LERI et al., 1996; KAMIYA et al., 1998).

Nosso estudo evidenciou aumento na expressão de ATP sintase ($p < 0,001$) quando *H. pylori* foi cultivado previamente em sub-CIMs, e sua produção, juntamente com a IL - 1 β , tem um papel fundamental na manutenção da homeostase do pH (MARTÍN-GALIANO et al., 2001). O aumento na expressão da ATP sintase no *H. pylori* cultivado em sub-CIMs de AMX pode ser decorrente do aumento na expressão das proteínas de choque, estimulando o processo inflamatório, produção de NO e citocinas pró-inflamatórias, provocando apoptose dos macrófagos infectados.

Apesar da indução de TNF - α , IL - 6 e TGF - β ocorrer em macrófagos infectados por *H. pylori*, essas citocinas não foram alteradas pela amoxicilina. A

capacidade de *H. pylori* induzir a produção de TGF - β é uma característica constitucional (WU et al., 2004).

Aumento dos níveis de secreção de IL - 12 em pacientes com gastrite por *H. pylori* foi demonstrado Bauditz e colaboradores (1999), indicando um papel chave desta citocina associada à doença gástrica. Nossos resultados demonstraram maior produção de IL - 12 por macrófagos infectados com *H. pylori* previamente mantidos em sub-CIMs de amoxicilina em relação ao *H. pylori* sem tratamento e esse aumento pode ser justificado pela alta expressão da NAP nestas condições. Corroborando com os resultados, Amedei e colaboradores (2006) demonstraram que monócitos infectados com *H. pylori* que não apresentavam a NAP estimularam pobremente a indução IL - 12 quando comparado a uma cepa produtora desta proteína. A IL - 12 está envolvida na indução ou amplificação da resposta T helper (Th) tipo 1. Nas infecções, a produção precoce da IL - 12 demonstra o elo desta citocina entre a resposta inata e a capacidade desta em sustentar uma resposta adaptativa tipo Th 1. Embora a IL - 12 tenha sido demonstrada ser essencial para a proteção da mucosa contra *H. pylori*, a sua produção prolongada está associada ao desenvolvimento de úlcera péptica (JONGE et al. 2004).

Entre as citocinas ensaiadas, a IL - 10 não foi induzida por macrófagos infectados com *H. pylori*. Este dado sugere que ocorreu a polarização da resposta Th 1, contribuindo para lesão dos macrófagos e inibição da resposta Th 2 e da produção de citocinas tais como IL - 5 e IL - 10, importantes para contenção da resposta inflamatória (BAMFORD et al., 1998; MOHAMMADI et al., 1997). Resultados semelhantes foram observados em células dendríticas

humanas infectadas com *H. pylori* por Obonyo et al. (2006) e Guiney et al. (2003).

A análise proteômica demonstrou aumento na expressão de argininosuccinato sintase quando *H. pylori* mantido em sub-CIMs de AMX. Essa enzima tem um papel fundamental no ciclo da ureia do *H. pylori*, participando na biossíntese da arginina a partir da ornitina (MENDZ; HAZELL, 1995). Reynolds e Penn (1994) demonstraram que a arginina é essencial para o crescimento de *H. pylori*. A alta expressão da RNA polimerase subunidade alfa e proteína ribossomal 50S demonstram participação no aumento da expressão das proteínas quando *H. pylori* foi cultivado em sub-CIMs de AMX.

Estudos *in vitro* mostraram que sub-CIMs de antibióticos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas aumentaram os níveis de expressão de alfa-toxina de *Staphylococcus aureus* agravando os sintomas da infecção (WORLITZSCH et al., 2001; KERNODLE et al., 1995; OHLSEN et al., 1998). Nossos resultados fornecem evidências de que a amoxicilina, nas concentrações subinibitórias, aumentam a expressão de proteínas de choque térmico, superóxido dismutase, enolase, ATP sintase, argininosuccinato sintase e NAP que podem promover uma forte resposta imunológica em hospedeiros colonizados com *H. pylori* através da indução de mediadores inflamatórios específicos.

Vários trabalhos demonstram que a apoptose em macrófagos pode ser induzida por numerosas moléculas efetoras, incluindo NO (WILSON; CRABTREE, 2007), e que a modulação da produção de NO durante a infecção por *H. pylori* poderia regular os níveis de apoptose (LU et al., 2011). Nossos resultados demonstraram uma diminuição da viabilidade celular e aumento da apoptose em macrófagos (precoce e tardia/necrose) após a infecção com *H.*

pylori previamente mantidos em sub-CIMs de amoxicilina, estando associado ao aumento na produção de NO.

H. pylori induz apoptose em macrófagos para modular a resposta imune do hospedeiro e estabelecer infecção crônica (MENAKER et al., 2004). Macrófagos expostos ao *H. pylori* previamente mantidos em sub-CIMs de amoxicilina apresentaram maior expressão de alguns fatores de virulência capazes de induzir aumento de NO, IL - 1 β e IL - 12 e, conseqüentemente, apoptose.

Numerosos estudos demonstraram que sub-CIMs de antimicrobianos podem alterar fatores de virulência da bactéria e a relação micro-organismo-hospedeiro (DI MARTINO et al., 2001; KADRY et al., 1999). Nosso trabalho mostra que a amoxicilina, em concentrações subinibitórias, tem um efeito sobre alguns fatores de virulência de *H. pylori* aumentando a expressão de proteínas de choque térmico, enolase, argininosuccinato sintase, superóxido dismutase, ATP alfa sintase e proteína ativadora de neutrófilo, bem como estimulando a resposta inata e o processo inflamatório.

A demonstração que a amoxicilina pode atuar sobre os diferentes aspectos do *H. pylori* e seus fatores de virulência, bem como na resposta do hospedeiro, quando em concentrações abaixo da concentração inibitória pode ser uma das justificativas da falência terapêutica dos esquemas propostos, agravando o processo inflamatório e comprometendo a cura da doença.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo demonstrar a influência da amoxicilina na indução de alguns fatores relacionados à virulência do *H. pylori* comparados à apresentada pela cepa na ausência do antimicrobiano. Nossos resultados demonstraram que:

- *H. pylori* mantido em concentrações subinibitórias de amoxicilina aumentaram a expressão de proteínas de choque térmico, chaperonas, enolase, argininosuccinato sintase, superóxido dismutase, ATP alfa sintase, RNA polimerase subunidade alfa, proteína ribossomal 50S e proteína ativadora de neutrófilo;
- *H. pylori* mantido em concentrações subinibitórias de amoxicilina induziram aumento de NO, IL – 1 β e IL – 12 em macrófagos;
- *H. pylori* mantido em concentrações subinibitórias de amoxicilina estimularam TNF - α , IL - 6 e TGF - β em macrófagos;
- *H. pylori* mantido em concentrações subinibitórias de amoxicilina aumentaram a apoptose.

Os resultados demonstraram que amoxicilina influenciou na expressão de alguns fatores relacionados à virulência de *H. pylori*, aumentando a resposta inflamatória e seus mediadores em macrófagos infectados.

7. REFERÊNCIAS

ABBLES, A.Z.; SIMON, I.; MELTON, E.R. Update on *Helicobacter pylori* Treatment. **Am. Fam. Phys.**, v. 75, p. 351-358, 2007.

ALARCON, T.; DOMINGO, D.; LOPEZ-BREA, M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 12, p. 19-26, 1999.

ALBESA, I.; BECERRA, M. C.; BATTÁN, P. C.; PÁEZ, P. L. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 317, p. 605-609, 2004.

AMEDEI, A.; CAPPON, A.; CODOLO, G.; CABRELLE, A.; POLENGHI, A.; BENAGIANO, M.; TASCA, E.; AZZURRI, A.; D'ELIOS, M.M.; DEL PRETE, G.; DE BERNARD, M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 1092–1101, 2006.

ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrop.**, v. 18, p. 353-357, 1997.

ANDO, T.; GOTO, Y.; MAEDA, O.; WATANABE, O.; ISHIGURO, K.; GOTO, H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 181-186, 2006a.

ANDO, T.; El-Omar, E.M.; GOTO, Y. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 181-186, 2006b.

ANDRES, S.; SCHMIDT, H.M.; MITCHELL, H.; RHEN, M.; MAEURER, M.; ENGSTRAND, L. *Helicobacter pylori* defines local immune response through interaction with dendritic cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 168-178, 2011.

ARAI, M.; IKEDA, M.; SHIMIZU, T. Comprehensive analysis of transmembrane topologies in prokaryotic genomes. **Gene**, v. 304, p. 77–86, 2003.

ARSLAN, E.; ATILGAN, H.; YAVAŞOĞLU, İ. The prevalence of *Helicobacter pylori* in obese subjects. **Eur. J. Int. Med.**, v. 20, p. 695–697, 2009.

ASPHOLM, M.; OLFAT, F.O.; NORDEN, J.; SONDEN, B.; LUNDBERG, C.; SJOSTROM, R.; ALTRAJA, S.; ODENBREIT, S.; HAAS, R.; WADSTROM, T.; ENGSTRAND, L.; SEMINO-MORA, C.; LIU, H.; DUBOIS, A.; TENEBERG, S.; ARNQVIST, A.; BOREN, T. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. **PLoS Pathog.**, v. 2, p. e110, 2006.

ASPHOLM-HURTING, M.; DAILIDE, G.; LAHMANN, M.; KALIA, A.; ILVER, D.; ROCHE, N.; VIKSTROM, S.; SJOSTROM, R.; LINDEN, S.; BACKSTROM, A.; LUNDBERG, C.; ARNQVIST, A.; MAHDAVI, J.; NILSSON, U.J.; VELAPATINO, B.; GILMAN, R.H.; GERHARD, M.; ALARCON, T.; LOPEZ-BREA, M.; NAKAZAWA, T.; FOX, J.G.; CORREA, P.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J.; NORMARK, S.; CARLSTEDT, I.; OSCARSON, S.; TENEBERG, S.; BERG, D.E.; BOREN, T. Functional adaptation of BabA the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesion. **Sci.**, v. 305, p. 519–522, 2004.

ATKINSON, B.A.; AMARAL, L. Sublethal concentrations of antibiotics, effects on bacteria and the immune system. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 101–138, 1982.

AUGUSTO, A.C.; MIGUEL, F.; MENDONÇA, S.; PEDRAZZOLI JR, J.; GURGUEIRA, S. Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. **Clin. Biochem.**, v. 40, p. 615–622, 2007.

AZEVEDO, N.F.; ALMEIDA, C.; CERQUEIRA, L.; DIAS, S.; KEEVIL, C.W.; VIEIRA, M.J. Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 3423–3427, 2007.

BABIOR, M. B. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, M. B. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BACHMANN, F. Fibrinolytic agents. **Fibrinolysis**, v. 9, p. 1-15, 1995.

BACKSTROM, A.; LUNDBERG, C.; KERSULYTE, D.; BERG, D.E.; BOREN, T.; ARNQVIST, A. Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 16923–16928, 2004.

BAMFORD, K.B.; FAN, X.; CROWE, S.E.; LEARY, J.F.; GOURLEY, W.K.; LUTHRA, G.K.; BROOKS, E.G.; GRAHAM, D.Y.; REYES, V.E.; ERNST, P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterol.**, v. 114, p. 482–492, 1998.

BARNES, A. I.; HERRERO, I. L.; ALBESA, I. New aspect of the synergistic antibacterial action of ampicillin and gentamicin. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, p. 146-151, 2005.

BAUDITZ, J.; ORTNER, M.; BIERBAUM, M.; NIEDOBITEK, G.; LOCHS, H.; SCHREIBER, S. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 117, p. 316-323, 1999.

BECERRA, M. C.; ERASO, A. K.; ALBESA, I. Comparison of oxidative stress induce by ciprofloxacin and pyoverdin in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity. **Luminesc.**, v. 18, p. 334-340, 2003.

BEDOYA, A.; GARAY, J.; SANZON, F. Histopathology of gastritis in *Helicobacter pylori* infected children from populations at high and low gastric cancer risk. **Hum. Pathol.**, v. 34, p. 206-213, 2003.

BELLMANN, K.; JAATTELA, .M.; WISSING, D.; BURKART, V.; KOLB, H. Heat shock protein hsp 70 overexpression confers resistance against nitric oxide. **FEBS Lett.**, v. 391, p. 85-88, 1996.

BERGMANN, S.; ROHDE, M.; CHHATWAL, G.S.; HAMMERSCHMIDT, S. Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 1273–1287, 2001.

BERGT, C.; MARSCHKE, G.; PANZENBOECK, U.; HEINECKE, J. W.; MALLE, E.; SATTLER, W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system to oxidatively damage apolipoprotein A-I. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 3523-3531, 2001.

BERNARDO, K.; PAKULAT, N.; FLEE, S.; SCHAITH, A.; UTERMOHLEN, O.; KRUT, O.; MULLER, S.; KRONKE, M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 546-555, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, P. C.; DAL SASSO, M.; SALA, M. T. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, p. 15-25, 2000.

BRISLERT, M.; ENARSSON, K.; LUNDIN, S.; KARLSSON, A.; KUSTERS, J.G.; SVENNERHOLM, A.M.; BACKERT, S.; QUIDING-JARBRINK, M. *Helicobacter pylori* induce neutrophil transendothelial migration: role of the bacterial HP-NAP. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 249, p. 95–103, 2005.

BUMANN, D.; AKSU, S.; WENDLAND, M.; JANEK, K.; *ET AL.* Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 3396-3403, 2002.

CANDELA, M.; BERGMANN, S.; VICI, M.; VITALI, B.; TURRONI, S.; EIKMANN, B. J.; HAMMERSCHMIDT, S.; BRIGIDI, P. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 5929–5936, 2007.

CHATURVEDI, R.; ASIM, M.; LEWIS, N.D.; SCOTT ALGOOD, H.M.; COVER, T.L.; KIM, P.Y.; WILSON, K.T. L-arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 4305-4315, 2007.

CHANG, C.S.; CHEN, W.N.; LIN, H.H.; WU, C.C.; WANG, C.J. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, p. 2232-2240, 2004.

CHEN, M.J.; WU, D.C.; LIN, J.M.; WU, M.T.; SUNG, F.C. Etiologic factors of gastric cardiac adenocarcinoma among men in Taiwan. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, p. 5472-5480, 2009.

CHIBA, T.; SENO, H.; MARUSAWA, H.; WAKATSUKI, Y.; OKAZAKI, K. Host factors are important in determining clinical outcomes of *Helicobacter pylori* infection. **J. Gastroenterol.**, v. 41, p. 1-9, 2006.

CITTERIO, B.; CASAROLI, A.; PIERFELICI, L.; BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E.; BAFFONE, W. Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. **New Microbiol.**, v. 27, p. 353-360, 2004.

COLBECK, J.C.; HANSEN, L.M.; FONG, J.M.; SOLNICK, J.V. Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 4375–4378, 2006.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifunctional process First American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. **Cancer Res.**, v. 52, p. 6735-6740, 1992.

CORREA, P.; PIAZUELO, M.B.; CAMARGO, M.C. Etiopathogenesis of gastric cancer. **Scand. J. Surg.**, v. 95, p. 218-224, 2006.

CORREA, P.; HOUGHTON, J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol.**, v. 133, p. 659-672, 2007.

COVER, T.L.; BLANKE, S.R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 320–332, 2005.

COVER, T.L.; KRISHNA, U.S.; ISRAEL, D.A.; PEEK JR, R.M. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. **Cancer Res.**, v. 63, p. 951–957, 2003.

DAL SASSO, M.; CULICI, M.; BOVIO, C.; BRAGA, P. C. Gemifloxacin: effects of subinhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 21, p. 325-333, 2003.

DI MARTINO. Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to human fibronectin. **Chemother.**, v. 47, p. 344-349, 2001.

DONOFRIO, F.C.; CALIL, A.C.; MIRANDA, E.T.; ALMEIDA, A.M.; BENARD, G.; SOARES, C.P.; VELOSO, S.N.; SOARES, C.M.; MENDES GIANNINI, M.J. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 706-713, 2009.

DULBECCO, R.; FREEMAN, G. Plaque Production by the Polyoma Virus. **Virol.**, v. 8, p. 396-397, 1959.

ECCLISSATO, C.; MARCHIORETTO, M.A.; MENDONCA, S.; GODOY, A.P.; GUERSONI, R.A.; DEGUER, M. et al. Increased primary resistance to recommended antibiotics negatively affects *Helicobacter pylori* eradication. **Helicob.**, v. 7, p. 53–59, 2002.

EL-OMAR, E.M. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. **Gut.**, v. 48, p. 743–747, 2001.

ERNST, P.B.; CROWE, S.E.; REYES, V.E. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? The inflammatory response. **Gastroenterol.**, v. 113, p. S35-S50, 1997.

ERNST, F.D.; HOMUTH, G.; STOOF, J.; MADER, U.; WAIDNER, B.; KUIPERS, EL et al. Iron-responsive regulation of the *H. pylori* iron-cofactored superoxide-dismutase SodB is mediated by Fur. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 3687-3692, 2005.

EVANS, D. J., JR.; EVANS, D.G.; TAKEMURA, T.; NAKANO, H.; LAMPERT, H.C.; GRAHAM, D.Y.; GRANGER, D.N.; KVIETYS, P.R. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2213–2220, 1995.

EVANS, D.J. JR; EVANS, D.G. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. **Helicoba.**, v. 5, p. 83-195, 2000.

EYMAN, C. et al. A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. **Proteom.**, v. 4, p. 2849–2876, 2004.

FERNANDEZ, H. Gênero *Helicobacter*. In: Trabulsi L. R et al., **Microbiologia**, 4ª ed , São Paulo: Atheneu, 353-358, 2004.

FIGUEIREDO C, MACHADO J C, YAMAOKA Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicob.**, v. 10, p. 14-20, 2005.

FLODEN, A.M.; WATT, J.A.; BRISSETTE, C.A. Borrelia burgdorferi enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. **PLoS One.**, v. 6, p. e27502, 2011.

FUJIKAWA, A.; SHIRASAKA, D.; YAMAMOTO, S.; OTA, H.; YAHIRO, K.; FUKADA, M.; SHINTANI, T.; WADA, A.; AOYAMA, N.; HIRAYAMA, T.; FUKAMACHI, H.; NODA, M. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. **Nat. Genet.**, v. 33, 375-381, 2003.

GEMMELL, C. G.; FORD, C. W. Virulence factor expression by gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, p. 665-672, 2002.

GERRITS, M.M.; VAN VLIET, A.H.; KUIPERS, E.J.; KUSTERS, J.G. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. **Lancet Infect. Dis.**, v. 6, p. 699–709, 2006.

GOBERT, A.P.; MCGEE, D.J.; AKHTAR, M. et al. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 13844–13849, 2001.

GODOY, A.P.; RIBEIRO, M.L.; BENVENGO, Y.H.; VITIELLO, L.; MIRANDA, M.D.E.C.; MENDONÇA, S.; et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. **BMC Gastroenterol.**, v. 3, p.20, 2003.

GONZÁLEZ, C.A.; LÓPEZ-CARRILLO, L. *Helicobacter pylori*, nutrition and smoking interactions: Their impact in gastric carcinogenesis. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 45, p. 6–14, 2010.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GREENWOOD D. Interactions between antibacterial drugs below the minimal inhibitory concentration. **Rev. Infect. Dis.**, v. 1, p. 807–812, 1979.

GUINEY, D.G.; HASEGAWA, P.; COLE, S.P. *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4163–4166, 2003.

HAN, M.J.; LEE, J.W.; LEE, S.Y. Understanding and engineering of microbial cells based on proteomics and its conjunction with other omics studies. **Proteom.**, v. 11, p. 721-743, 2011.

HANEDA, T.; SUGIMOTO, M.; YOSHIDA-OHTA, Y.; KODERA, Y.; OH-ISHI, M.; MAEDA, T.; SHIMIZU-IZUMI, S.; MIKI, T.; KUMAGAI, Y.; DANBARA, H.; OKADA, N. Comparative proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ppGpp-deficient mutant to identify a novel virulence protein required for intracellular survival in macrophages. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 324, 2010.

HARRIS, P.R.; ERNST, P.B.; KAWABATA, S.; KIYONO, H.; GRAHAM, M.F.; SMITH, P.D. Recombinant *Helicobacter pylori* urease activates primary mucosal macrophages. **The J. of Infect. Dis.**, v. 178, p. 1516–1520, 1998.

HATAKEYAMA, M.; HIGASHI, H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. **Cancer Sci.**, v. 96, p. 835–843, 2005.

HELD, T.K.; ADAMCZIK, C.; TRAUTMANN, M.; CROSS, A.S. Effects of MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1093-1096, 1995.

HOFMAN, P.; WAIDNER, B.; HOFMAN, V.; BERESWILL, S.; BREST, P.; KIST, M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicob.**, v. 9, p. 15-22, 2004.

HUESCA, M.; BORGIA, S.; HOFFMAN, P.; LINGWOOD, C.A. Acidic pH changes receptor binding specificity of *Helicobacteri pylori*: a binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2643, 1996.

HURMALAINEN, V.; EDELMAN, S.; ANTIKAINEN, J.; BAUMANN, M.; ITOH, H.; TASHIMA, Y. The stress (heat shock) proteins. **The Inter. J. of Biochem. and Cell Biol.**, v. 23, p. 1185 – 1191, 1991.

IVIE, S.E.; McCLAIN, M.S.; TORRES, V.J.; ALGOOD, H.M.; LACY, D.B.; YANG, R.; BLANKE, S.R.; COVER, T.L. *Helicobacter pylori* VacA subdomain required for intracellular toxin activity and assembly of functional oligomeric complexes. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2843-2851, 2008.

JAISWAL, M.; LARUSSO, N.F.; NISHIOKA, N.; NAKABEPPU, Y.; GORES, G.J. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. **Cancer Res.**, v. 61, p. 6388-6393, 2001.

JANG, D.S.; KANG, B.S.; RYU, S. Y.; CHANG, I. M.; MIN, K. R.; KIM, Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. **Biochem. Pharmacol.**, v. 57, p. 705-712, 1999.

JENKS, P.J.; KUSTERS, J.G. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 16, p: S11-S8, 2000.

JONGE, R.; KUIPERS, E.J.; LANGEVELD, S.C.L.; LOFFELD, R.J.L.F.; STOOF, J.; VAN VLIET, A.H.M.; KUSTERS, J.G. The *Helicobacter pylori* plasticity region locus jhp0947–jhp0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 161–167, 2004.

JÖNSSON, K.; GUO, B.P.; MONSTEIN, H.J.; MEKALANOS, J.J.; KRONVALL, G. Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, p. 1852-1857, 2004.

JUNGBLUT, P., WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. **J. Biotechnol.**, v. 41, p. 111-120, 1995.

KADRY, A.A.; TAWFIK, A.; EL-ASRAR, A.A.; SHIBL, A.M. Reduction of mucoid *Staphylococcus epidermidis* adherence in intraocular lenses by selected antimicrobial agents. **Chemother.**, v. 45, p. 56-60, 1999.

KAMIYA, S.; YAMAGUCHI, H.; OSAKI, T.; TAGUCHI, H. A virulence factor of *H. pylori*: role of heat shock protein in mucosal inflammation after *H. pylori* infection. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 27, p. S35-S39, 1998.

KATSURAHARA, M.; KOBAYASHI, Y.; IWASA, M.; MA, N.; INOUE, H.; FUJITA, N.; TANAKA, K.; HORIKI, N.; GABAZZA, E.C.; TAKEI, Y. Reactive nitrogen species mediate DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Helicob.**, v. 14, p. 552-558, 2009.

KERNODLE, D.S.; MCGRAW, P.A.; BARG, N.L.; MENZIES, B.E.; VOLADRI, R.K.; HARSHMAN, S. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin *in vitro* induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 410–419, 1995.

KHAN, S.; KARIM, A.; IQBAL, S. *Helicobacter* urease: Niche construction at the single molecule level. **J. Biosci.**, v. 34, p. 503–511, 2009.

KHIN, M.M.; RINGNÉR, M.; ALELJUNG, P.; WADSTRÖM, T.; HO, B. Binding of human plasminogen and lactoferrin by *Helicobacter pylori* coccoid forms. **J. Med. Microbiol.**, v. 45, p. 433-439, 1996.

KIM, S.Y.; LEE, Y.C.; KIM, H.K. et al. *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. **Cell Microbiol.**, v. 8, p. 97-106, 2006.

KIST, M.; GLOCKER, E.; SUERBAUM, S. Pathogenesis, diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori*. **Bundesg. G. G.**, v. 48, p. 669-678, 2005.

KODAIRA, M.S.; ESCOBAR, A.M.U.; GRISI, S. Aspectos Epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na Infância e Adolescência. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, p. 356-369, 2002.

KONTUREK, P.C; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T. *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p. 3-21, 2009.

KUSTERS, J.G.; VAN VLIET, A.H.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 449-490, 2006.

KUSTERS, J.G.; GERRITS, M.M.; VAN STRIJP, J.A.; VANDENBROUCKE-GRAULS. Coccoide forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 3672-3679, 1997.

KWOK, T.; ZABLER, D.; URMAN, S.; ROHDE, M.; HARTIG, R.; WESSLER, S.; MISSELWITZ, R.; BERGER, J.; SEWALD, N.; KONIG, W.; BACKERT, S. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. **Nat.**, v. 449, p. 862–866, 2007.

LABRO, M. T. Interference of antibacterial agents with phagocyte function: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 615-650, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nat.**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAHTENMAKI, K.; VIRKOLA, R.; POUTTU, R.; KUUSELA, P.; KUKKONEN, M.; KORHONEN, T.K. Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3659–3664, 1995.

LERI, O.; TEICHNER, A.; SINOPOLI, M.T.; ABBOLITO, M.R.; PUSTORINO, R.; NICOSIA, R. et al. Heat shock proteins antibodies in patients with *H. pylori* associated chronic gastritis. **Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.**, v. 18, p. 45-47, 1996.

LI, D.; RENZONI, A.; ESTOPPEV, T.; BISOGNANO, C.; FRANCOIS, P.; KELLEY, W. L.; LEW, P. D.; SCHRENZEL, J.; VAUDAUX, P. Induction of fibronectin adhesins in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by sigma B transcription factor activity is mediated by two separate pathway. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 916-924, 2005.

LIN, C.Y.; HUANG, Y.S.; LI, C.H.; HSIEH, Y.T.; TSAI, N.M.; HE, P.J. et al. Characterizing the polymeric status of *H. pylori* heat shock protein 60. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 388, p. 283-289, 2009.

LIN, C.Y.; HE, P.J.; TSAI, N.M.; LI, C.H.; YANG, S.C.; HSU, W.T. et al. A potential role for *H. pylori* heat shock protein 60 in gastric tumorigenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 392, p. 183-189, 2010.

LOPEZ-CAMPISTROUS, A. et al. Localization, Annotation, and Comparison of the *Escherichia coli* K-12 Proteome under Two States of Growth. **Mol. Cell. Proteom.** v.4, p. 1205–1209, 2005.

LU, H.; HSU, P.; GRAHAM, D.Y.; YAMAKA, Y. Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol.**, v. 128, p. 833-848, 2005.

LU, D.Y.; TANG, C.H.; CHANG, C.H.; MAA, M.C.; FANG, S.H.; HSU, Y.M.; LIN, Y.H.; LIN, C.J.; LEE, W.C.; LIN, H.J.; LEE, C.H.; LAI, C.H. *Helicobacter pylori* attenuates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by murine macrophages. **Inn. Immun.**, 2011, [Epub ahead of print].

MA, Y.J.; DUAN, G.C.; ZHANG, R.G.; FAN, Q.T.; ZHANG, W.D. Mutation of *iceA* in *Helicobacter pylori* compromised IL-8 induction from human gastric epithelial cells. **J. Bas. Microbiol.**, v. 50, p. S83-88, 2010.

MAHDAVI, J.; SONDEN, B.; HURTIG, M.; OLFAT, F.O.; FORSBERG, L.; ROCHE, N.; ANGSTROM, J.; LARSSON, T.; TENEBERG, S.; KARLSSON, K.A.; ALTRAJA, S.; WADSTRÖM, T.; KERSULYTE, D.; BERG, D.E.; DUBOIS, A.; PETERSSON, C.; MAGNUSSON, K.E.; NORBERG, T.; LINDH, F.; LUNDSKOG, B.B.; ARNQVIST, A.; HAMMARSTROM, L.; BOREN, T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. **Sci.**, v. 297, p. 573-578, 2002.

MALATY, H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 205-214, 2007.

MANENTE, L.; PERNA, A.; BUOMMINO, E.; ALTUCCI, L.; LUCARIELLO, A.; CITRO, G.; BALDI, A.; IAQUINTO, G.; TUFANO, M.A.; DE LUCA, A.. The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. **J. Cell Physiol.**, v. 214, p. 582–587, 2008.

MARTÍN-GALIANO, A. J.; FERRÁNDIZ, M. J.; DE LA CAMPA, A. G. The promoter of the operon encoding the F₀F₁ ATPase of *Streptococcus pneumoniae* is inducible by pH. **Mol. microbiol.**, v. 41, p. 1327-38, 2001.

MENAKER, R.J.; CEPONIS, P.J.M.; JONES, N.L. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2889–2898, 2004.

MENDONCA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M.S.; GODOY, A.P.; GUERZONI, R.A.; DEGGER, M. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori*

resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicob.**, v. 5, p. 79–83, 2000.

MEYER, F.; WILSON, K.T.; JAMES, S.P. Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6265–6272, 2000.

MENDZ, G. L.; HAZELL, S.L. Amino acid utilization by *Helicobacter pylori*. **Int J Biochem. Cell Biol.**, v. 27, p. 1085-1093, 1995.

MENDZ, G.L.; HAZELL, S.L. The urea cycle of *H. pylori*. **Microbiol.**, v. 142, p. 2959-2967, 1996.

MOHAMMADI, M.; NEDRUD, J.; REDLINE, R.; LYCKE, N.; CZINN, S.J. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. **Gastroenterol.**, v. 113, p. 1848–1857, 1997.

MONTEMURRO, P., BARBUTI, G.; DUNDON, W.G.; DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R.; COLUCCI, M.; DE RINALDIS, P.; MONTECUCCO, C.; SEMERARO, N.; PAPINI, E. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 1055–1062, 2001.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 323-336, 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – 6th ed. (M7 –A6), v. 23, n. 2. Wayne, PA, **NCCLS 2003**.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

NIELSEN, B.L.; BROWN, L.R. The bases for colored silver protein complex formation in stained polyacrilamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 141, p. 311-5, 1984.

OBONYO, M.; COLE, S.P.; DATTA, S.K.; GUINEY, D.G. Evidence for interleukin-1-independent stimulation of interleukin-12 and down-regulation by interleukin-10 in *Helicobacter pylori* infected murine dendritic cells deficient in the interleukin-1receptor. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v 47, p. 414–419, 2006.

ODENBREIT, S.; PÜLS, J.; SEDLMAIER, B.; GERLAND, E.; FISCHER, W.; HAAS, R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Sci**, v. 287, p.1497-1500, 2000.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** v.250, p. 4007-21, 1975.

OHLSSEN, K.; ZIEBUHR, W.; KOLLER, K.P.; HELL, W.; WICHELHAUS, T.A.; HACKER, J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alphatoxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2817–2823, 1998.

O'TOOLE, P.W.; LANE, M.C.; PORWOLLIK, S. *Helicobacter pylori* motility. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1207-1214, 2000.

PANCHOLI, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 902–920, 2001.

PAKODI, F.; ABDEL-SALAM, O.M.; DEBRECENI, A.; MOZSIK, G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. **J. Physiol. Paris**, v. 94, p. 139-152, 2000.

PANTZAR, M.; LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. Plasminogen binding and activation at the surface of *Helicobacter pylori* CCUG 17874. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4976-4980, 1998.

PARIJ, N.; NAGY, A. M.; FONDU, P.; NÈVE, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 352, p. 299-305, 1998.

PEREZ-PEREZ, G.I.; ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicob.**, v. 9, p. 1-6, 2004.

PINHEIRO JR, A.A.; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. *Helicobacter pylori*. **Hig. Aliment.**, v. 18, p. 19-24, 2007.

POLENGHI, A.; BOSSI, F.; FISCHETTI, F.; DURIGUTTO, P.; CABRELLE, A.; TAMASSIA, N.; CASSATELLA, M.A.; MONTECUCCO, C.; TEDESCO, F.; DE BERNARD, M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. **J. Immunol.**, v. 178, p. 1312-1320, 2007.

QU, J.; LESSE, A.J.; BRAUER, A.L.; CAO, J.; GILL, S.R.; MURPHY, T.F. Proteomic expression profiling of *Haemophilus influenza* grown in pooled human sputum from adults with chronic obstructive pulmonary disease reveal antioxidant and stress responses. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 162, 2010.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, C.A.; MAGALHÃES, P.P.; MOURA, S.B.; CABRAL, M.M.D.A.; NOGUEIRA, A.M.M.F. *Caga*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in brazil. **Int. J. Cancer**, v. 78, p. 135–139, 1998.

REYNOLDS, D. J.; PENN, C. W. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. **Microbiol.**, v. 140, p. 2649-2656, 1994.

RINGNÉR, M.; PAULSSON, M.; WADSTRÖM, T. Vitronectin binding by *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiol. Immun.**, v. 5, p. 219-224, 1992.

ROBINSON, K.; ARGENT, R.H.; ATHERTON, J.C. The inflammatory and immune responses to *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 237-259, 2007.

ROMERO-ADRIÁN, T.B.; LEAL-MONTIEL, J.; MONSALVE-CASTILLO, F.; MENGUAL-MORENO, E.; MCGREGOR, L.P.; ANTÚNEZ, A. *Helicobacter pylori*: Bacterial Factors and the Role of Cytokines in the Immune Response. **Curr. Microbiol.**, 2009.

RUIGUANG, G.; SUN, X.; GU, Q.; WATT, R.M.; TANNER, J.A.; WONG, B.C.Y.; XIA, H.H.; HUANG, J.; HE, Q.; SUN, H. A proteomic approach for the identification of bismuth-binding proteins in *Helicobacter pylori*. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 12, p. 831–842, 2007.

SAHA, A.; HAMMOND, C.E.; GOOZ, M.; SMOLKA, A.J. Interleukin-1 β modulation of H,K-ATPase α subunit gene transcription in *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liv. Physiol.**, v. 292, p. G1055-1061, 2007.

SATIN, B.; DEL GIUDICE, G.; DELLA BIANCA, V.; DUSI, S.; LAUDANNA, C.; TONELLO, F.; KELLEHER, D.; RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C.; ROSSI, F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1467–1476, 2000.

SATORHELYI, P. Microarray Analyse der pH Stressantwort von *Listeria monocytogenes* and *Corynebacterium glutamicum*. 2004.

SCHUMANN, W. Thermosensors in eubacteria: role and evolution. **J.Biosci**, v. 32, p. 549-57, 2007.

SCOTT, D.R.; MARCUS, E.A.; WEEKS, D.L.; SACHS, G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol.**, v. 123, p. 187-195, 2002.

SEWERYN, E.; PIETKIEWICZ, J.; SZAMBORSKA, A.; GAMIAN, A. Enolase on the surface of prokaryotic and eukaryotic cells is a receptor for human plasminogen. **Post. Hig. Med. Dosw.**, v. 61, p. 672- 682, 2007.

SHIBATA, W.; TAKAISHI, S.; MUTHUPALANI, S.; PRITCHARD, D.M.; WHARY, M.T.; ROGERS, A.B.; FOX, J.G.; BETZ, K.S.; KAESTNER, K.H.;

KARIN, M.; WANG, T.C. Conditional deletion of IkappaB-kinase beta (IKKbeta) accelerates *Helicobacter*-dependent gastric apoptosis, proliferation and preneoplasia. **Gastroenterol.**, v. 54, p. 70-74, 2009.

SOLNICK, J.V.; HANSEN, L.M.; SALAMA, N.R.; BOONJAKUAKUL, J.K.; SYVANEN, M. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 2106–2111, 2004.

SPIEGELHALDER, C.; GERSTENECKER, B.; KERSTEN, A.; SCHILTZ, E.; KIST, M. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 5315–5325, 1993.

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-48, 1973.

SUZUKI H, MASAOKA T, NOMURA S, HOSHINO Y, KURABAYASHI K, MINEGISHI Y, et al. Current consensus on the diagnosis and treatment of *H. pylori*-associated gastroduodenal disease. **Keio J. Med.**, v. 52, p. 163-173, 2003.

SWEETMAN, S. Martindale: The Complete drug reference. London: **Pharm. Press**, v. 33, p. 149-150, 2002.

SZOPINSKA, A.; MORSOMME, P. Quantitative proteomic approaches and their application in the study of yeast stress responses. **OMICS**, v. 14, p. 639-649, 2010.

TRUST, T.J.; DOIG, P.; EMÖDY, L.; KIENTLE, Z.; WADSTRÖM, T.; O'TOOLE, P. Highaffinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, v 59, p. 4398- 4404, 1991.

VALKONEN, K.H.; RINGNÉR, M.; LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. High affinity binding of laminin by *Helicobacter pylori*: evidence for a lectin-like interaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 7, p. 29-37, 1993.

VALLS SERÓN, M.; HAIKO, J.; DE GROOT, P.G.; KORHONEN, T.K.; MEIJERS, J.C. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is degraded by *Salmonella enterica* and *Yersinia pestis*. **J. Thromb. Haemost.**, v. 8, p. 2232-2240, 2010.

VAN DOORN, L.J.; SCHNEEBERGER, P.M.; NOUHAN, N.; PLAISIER, A.; QUINT, W.; BOER, W. Importance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment. **GUT.**, v. 46, p. 321-326, 2000.

WAGHRAY, M.; ZAVROS, Y.; SAQUI-SALCES, M.; EL-ZAATARI, M.; ALAMELUMANGAPURAM, C.B.; TODISCO, A.; EATON, K.A.; MERCHANT, J.L. Interleukin-1 β promotes gastric atrophy through suppression of sonic hedgehog. **Gastroenterol.**, v. 138, p. 562–572, 2010.

WANG, G.; ALAMURI, P.; MAIER, R.J. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 847–860, 2006.

WANG, C.A.; LIU, Y.C.; DU, S.Y.; LIN, C.W.; FU, H.W. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein promotes myeloperoxidase release from human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 377, p. 52-56, 2008.

WANG, Y.H.; GORVEL, J.P.; CHU, Y.T.; WU, J.J.; LEI, H.Y. *Helicobacter pylori* impairs murine dendritic cell responses to infection. **PLoS One**, v. 5, p. e10844, 2010.

WASLEY, G. D. A simplified microplate cell culture system. **J. Med. Lab. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 134-135, 1969.

WILSON, K.T.; CRABTREE, J.E. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. **Gastroenterol.**, v. 133, p. 288–308, 2007.

WORLITZSCH, D.; KAYGIN, H.; STEINHUBER, A.; DALHOFF, A.; BOTZENHART, K.; DÖRING, G. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 196-202, 2001.

WU, Y.Y.; TSAI, H.F.; LIN, W.C.; CHOU, A.H.; CHEN, H.T.; YANG, J.C.; HSU, P.I.; HSU, P.N. *Helicobacter pylori* enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, 2334-2339, 2004.

YAMAGUCHI, H.; OSAKI, T.; KURIHARA, N.; TAGUCHI, H.; HANAWA, T.; YAMAMOTO, Y.; KAMIYA, S. Heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 825–831, 1997.

YAMAOKA, Y.; KITA, M.; KODAMA, T.; SAWAI, N.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. **GUT**, v. 41, p. 442–451, 1997.

ZHANG, L.; ESLICK, G.D.; XIA, H.H.X.; WU, C.; PHUNG, N.; TALLEY, N.J. Relationship between Alcohol Consumption and Active *Helicobacter pylori* Infection. **Alcoh. Alcohol.**, v. 45, p. 89–94, 2010.

ZHANG, L.; WANG, Q.; WANG, W.; LIU, Y.; WANG, J.; YUE, J.; XU, Y.; XU, W.; CUI, Z.; ZHANG, X.; WANG, H. Identification of putative biomarkers for the serodiagnosis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Proteome Sci.**, v. 10, p. 12, 2012.

<http://www.uniprot.org/uniprot/P56001>. Acesso: 05 de março de 2012.

<http://www.uniprot.org/uniprot/P56039>. Acesso: 05 de março de 2012.

CAPÍTULO 2

Helicobacter pylori treated by sub-inhibitory concentration of amoxicillin
promote inflammatory cytokine production and apoptosis of
macrophages

Author: Fabiana Cristina Donofrio

Co-authors: Elaine Toscano Miranda

Danielle Cardoso Geraldo Maia

Iracilda Zeponne Carlos

Maria Stella Gonçalves Raddi *

Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia, Faculdade
de Ciências Farmacêuticas - Unesp, Araraquara, SP, Brazil.

***Corresponding authors:**

Maria Stella Gonçalves Raddi

email: raddims@fcfar.unesp.br

Fabiana Cristina Donofrio

e-mail: fabcrisdon@yahoo.com.br

Tel.: +55 (16) 33015720

Fax: +55 (16) 33220073

Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621.

Araraquara - São Paulo - Brazil

CEP - 14801-902

Abstract

Sub-inhibitory concentrations of antibiotics have been shown to alter virulent expression of microorganisms, which may alter the progression of infection. This study assessed the induction of nitric oxide, cytokines and apoptosis on macrophages infected by *H. pylori* exposed to sub-inhibitory concentrations of amoxicillin. RAW 264.7 macrophage-like cells infected with *H. pylori* amoxicillin-treated significantly increased the levels of NO, IL-1 beta, IL-12 and apoptosis as compared to *H. pylori* without treatment infected macrophages. These results suggest that amoxicillin, at sub-inhibitory concentrations, could contribute to stimulate immune response in the host by inducing over-expression of specific inflammatory mediators.

Key Words: *Helicobacter pylori*; sub-inhibitory concentration, amoxicillin, nitric oxide, cytokines, apoptosis.

1. Introduction

Helicobacter pylori is a prevalent Gram-negative microaerophilic bacterium that colonizes the mucus layer in the stomach and produces various virulence-associated factors that have been extensively characterized [1]. The presence of *H. pylori* and development of inflammatory response depends on the host response and bacterial activity [2]. The infection caused by *H. pylori* results in a large influx of immune cells including neutrophils, macrophages,

dendritic cells, lymphocytes, and an associated innate and adaptive immune response [3].

Virulence factors, such as urease, cytotoxin vacuolizing VacA and cytotoxin-associated gene CagA protein, stimulate the immune response in the host in order to eliminate the bacterium without compromising the function of the involved organ. This process occurs predominantly on T helper type 1 cells that induce the production higher levels of cytokines and chemokines, such as interleukin (IL) – 1 β , IL - 6, IL - 8, IL - 10, IL – 12, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and transforming growth factor - beta (TGF- β), contributing to the inflammatory process, with consequent damage to mucosal cells [4,5].

The mechanism by which *H. pylori* promotes apoptosis on human cells has not been completely understood. Although excessive NO generation and a massive rise in apoptosis are well recognized, cytokines (TNF- α , interferon-gamma (IFN- γ), IL-2 and IL-1), ascorbate, and ammonia also activate apoptosis [6,7]. The formation of intracellular reactive nitrogen species (RNS), with increased level of nitric oxide synthase (iNOS) [8] can cause cell DNA damage, mutagenesis, apoptosis and development of gastric carcinoma [9].

The most commonly used regimens for the eradication therapy of *H. pylori* consist of a combination of two antibiotics (usually metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline or furazolidone) associated with a proton pump inhibitor (omeprazole, lansoprazole or pantoprazole) [10]. The efficacy of this therapy depends on antibiotic drug resistance, patient compliance and drug-related side effects [11,12]. However, in recent times, eradication rates in practice for many of the first-line treatment regimens has fallen well below these

levels, generally due to the connected factors of poor compliance with medication and antibiotic resistance [13].

Several studies have demonstrated that the antimicrobial inhibitory concentrations (MIC) [14] or sub-inhibitory concentrations (sub-MICs) might alter the bacterial virulence factors, and as a result the microorganism-host relationship [15]. Furthermore, sub-MICs of antibiotics can alter the morphology and growth of the microorganism, production and/or release of enzymes and toxins, as well as other factors involved in bacterial virulence [16]. Such changes may directly affect the interactions between bacteria and host, and affect the inflammatory response after bacterial exposure [17,18].

Considering that the eradicating therapy of *H. pylori* is not always effective and that amoxicillin is included in treatment regimens, the purpose of the present study was to assess whether macrophages cytokine release might be altered by *H. pylori* growing in contact with sub-inhibitory concentrations of amoxicillin used as stimulus.

2. Materials and Methods

2.1. Helicobacter pylori strain, growth conditions and amoxicillin susceptibility

H. pylori ATCC 43504, metronidazole resistant and amoxicillin susceptible, was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The bacterium was cultured in Columbia agar containing 10 % fetal bovine serum and incubated at 37°C for 72 hours, in 5% CO₂. The

broth microdilution method was used for determining the susceptibility of *H. pylori* to amoxicillin. The wells of a 96-well microplate were filled with 100 µl of various concentrations of amoxicillin (AMX) diluted in distilled water, at the initial concentration of 1 mg/ml (Pharma Nostra, Rio de Janeiro, Brazil). The same volume of *H. pylori* suspension in Brain Heart Infusion supplemented with 10% fetal bovine serum (turbidity equivalent to a 2.0 McFarland opacity standard, (UDO₆₂₀ 0.10) was added to each well. Absorbency was determined using an automatic ELISA microplate reader (Spectra & Rainbow Readers, Tecan). The microplate was incubated at 37°C for 72 hours under microaerophilic atmosphere, agitated and then absorbency was read again in the reader at the same wavelength. The absorbencies were compared to the values obtained before incubation to detect an increase in bacterial growth. The lowest concentration of amoxicillin resulting in inhibition of bacterial growth was 0.250 µg/ml. From this result, the concentrations of 0.063 µg/ml (1/4 MIC) and 0.125 µg/ml (1/2 MIC) were used for the tests.

2.2. Treatment of bacteria with amoxicillin

H. pylori was cultured in Brain Heart Infusion supplemented with 10% fetal bovine serum to achieve a turbidity of 4 McFarland opacity standard, containing sub-inhibitory concentrations (sub-MICs) of amoxicillin, and an untreated amount was kept apart as control. All the samples were incubated at 37°C, microaerophilic atmosphere for 24 and 48 hours. Then, bacterial cells were washed twice with sterile phosphate buffered saline (0.05 M and pH 7.2)

and centrifuged at 6000 *g* for 10 minutes to remove the antimicrobial. Bacterial cells were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium for macrophages tests in the final concentration of 10^9 CFU/ml (UDO₆₂₀ 0.40). Macrophages infected with *H. pylori* growing without amoxicillin and uninfected macrophages were used as controls. Under these growth conditions, the following terminology was used: pre-AMX 24h and pre-AMX 48h for *H. pylori* exposed to amoxicillin for 24 and 48 hours, respectively; Hp 24h and Hp 48h for *H. pylori* growing in the absence of amoxicillin for 24 and 48 hours (controls). Pre-AMX samples were washed to remove the antimicrobial before macrophages infection.

2.3. Cell culture and maintenance

RAW 264.7 macrophage-like cells (American Type Culture Collection ATCC, TIB 71, Rockville, MD) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing L - glutamine and glucose (Gibco BRL Life Technologies) supplemented with 10% FBS and 10 mg/ml gentamicin (Gibco BRL Life Technologies) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were grown in 24 - well plates.

2.4. Nitric oxide (NO) production and cytokines secretion by *H. pylori*-induced RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/500 μ l/well) were added into the wells of microplates. After 24 hours, the cells were washed three times with phosphate buffered saline (0.05 M and pH 7.2) and infections were done with *H. pylori* as described. The plates were incubated for 24 hours. After incubation, the supernatants were collected. The levels of nitric oxide were determined by measuring the amount of nitrite, a stable metabolic product of nitric oxide, as previously reported [19]. The assay mixture contained medium (50 μ l) plus Griess reagent (50 μ l, Merck), and absorption was measured at 540 nm using a microplate reader (Spectra & Rainbow Readers, Tecan). The results were reported as the amount of nitrite (μ mol/ml). Each experiment was accompanied by a positive control (10 μ g/ml lipopolysaccharide, Sigma) and a negative control (Dulbecco's modified Eagle's medium). The cytokine immunoassay (IL-1- β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-12 and TGF- β), macrophages (1×10^6 cells/500 μ l/well) were infected with *H. pylori* as described above in complete Dulbecco's modified Eagle's medium and incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Supernatants were collected and cytokines were quantified by a sandwich immunoassay kit (BD Biosciences Pharmingen) following the manufacturer's instructions.

2.5. Assessment of apoptosis

The binding of annexin V - fluorescein isothiocyanate was used as a measurement of apoptotic RAW 264.7 cells with an annexin V - fluorescein isothiocyanate – propidium iodide apoptosis detection kit (BD Biosciences Pharmingen) according to the manufacturer's instructions. Cells were pooled, pelleted by centrifugation, washed once with ice-cold phosphate buffered saline, and resuspended in binding buffer to a concentration of 10^6 /ml. Next, 0.1 ml of this cell suspension was transferred to a tube and incubated with 5 μ l of annexin V-fluorescein isothiocyanate and 5 μ l of propidium iodide for 10 minutes at 25°C in dark. Finally, 0.4 ml of binding buffer was added, and samples were analyzed by flow cytometry within 1 hour on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson-Bioscience, FACS Calibur™, San Jose, California, USA), and processed with the integrated software. Lipopolysaccharide (10 μ g/ml) was used as control, and uninfected cells without treatment were used as viability control. The apoptosis percentage was calculated as follows: apoptosis = number of early and late apoptotic cells/total number of cells $\times$ 100%.

2.6. Statistical analysis

All experiments were repeated at least twice, using three wells for each sample. The results were assessed and expressed through mean $\pm$ sd. Statistical comparisons were performed using Student's t test data ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Anti - *H. pylori* activity

The minimal antimicrobial concentration of amoxicillin for *H. pylori* was 0.250 µg/ml (MIC). Sub-inhibitory growth concentrations of 0.063 µg/ml ($\frac{1}{4}$ MIC) and 0.125 µg/ml ($\frac{1}{2}$ MIC) were used in the tests.

3.2. Induction of nitric oxide (NO) in macrophages by *H. pylori*

H. pylori previously maintained at different sub-inhibitory concentrations of amoxicillin induced a significant increase of NO in macrophages ($p < 0.05$) compared to the respective positive control after 24 hours of incubation (Fig. 1).

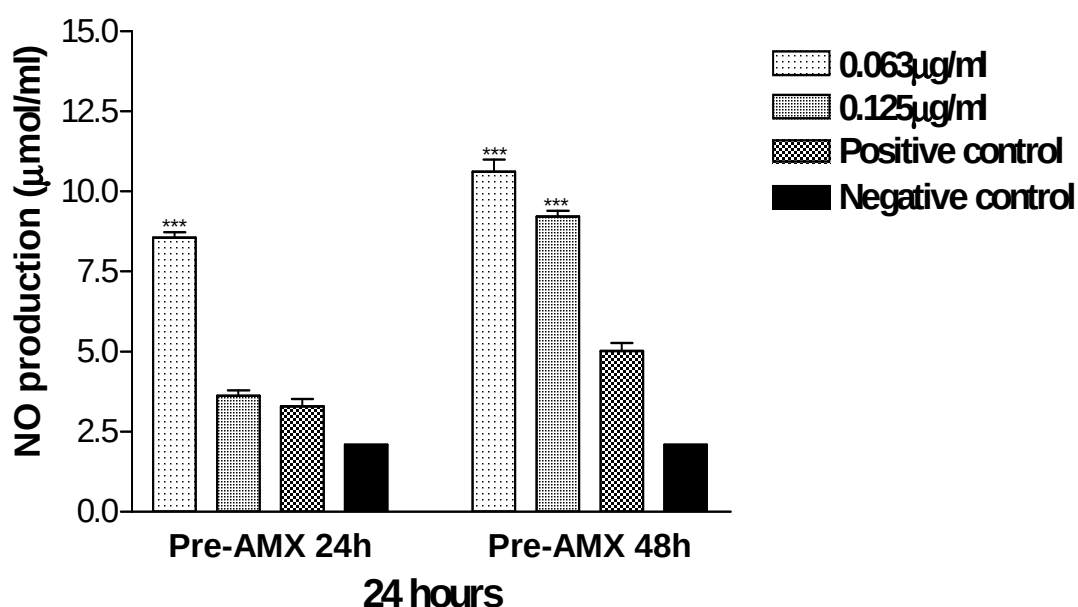


Figure 1: Induction of nitric oxide in macrophages after infection with *H. pylori* for 24 hours. **Pre-AMX 24h/48h:** *H. pylori* maintained for 24 and 48 hours respectively, in the presence of the

antimicrobial agent, then washed with sterile phosphate buffered saline. **Positive control:** *H. pylori* without antimicrobial grown for 24 and 48 hours. **Negative control:** untreated macrophages. **Intra-group** statistical difference compared to positive control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. Induction of cytokines by macrophages infected with *H. pylori*

The culture supernatant of macrophages infected with *H. pylori* previously maintained at 0.063 and 0.125 $\mu\text{g/ml}$ of amoxicillin for 24 and 48 hours had higher concentration of IL-1 β and IL-12 ($p < 0.05$) compared to that induced by bacteria not exposed to antimicrobial. Although the induction of TNF - α , IL - 6 and TGF - β occurred in infected macrophages with *H. pylori*, these cytokines were not altered by amoxicillin (Fig. 2). Amoxicillin treated *H. pylori* and untreated bacteria did not alter the production of IL-10 by macrophages (data not shown).

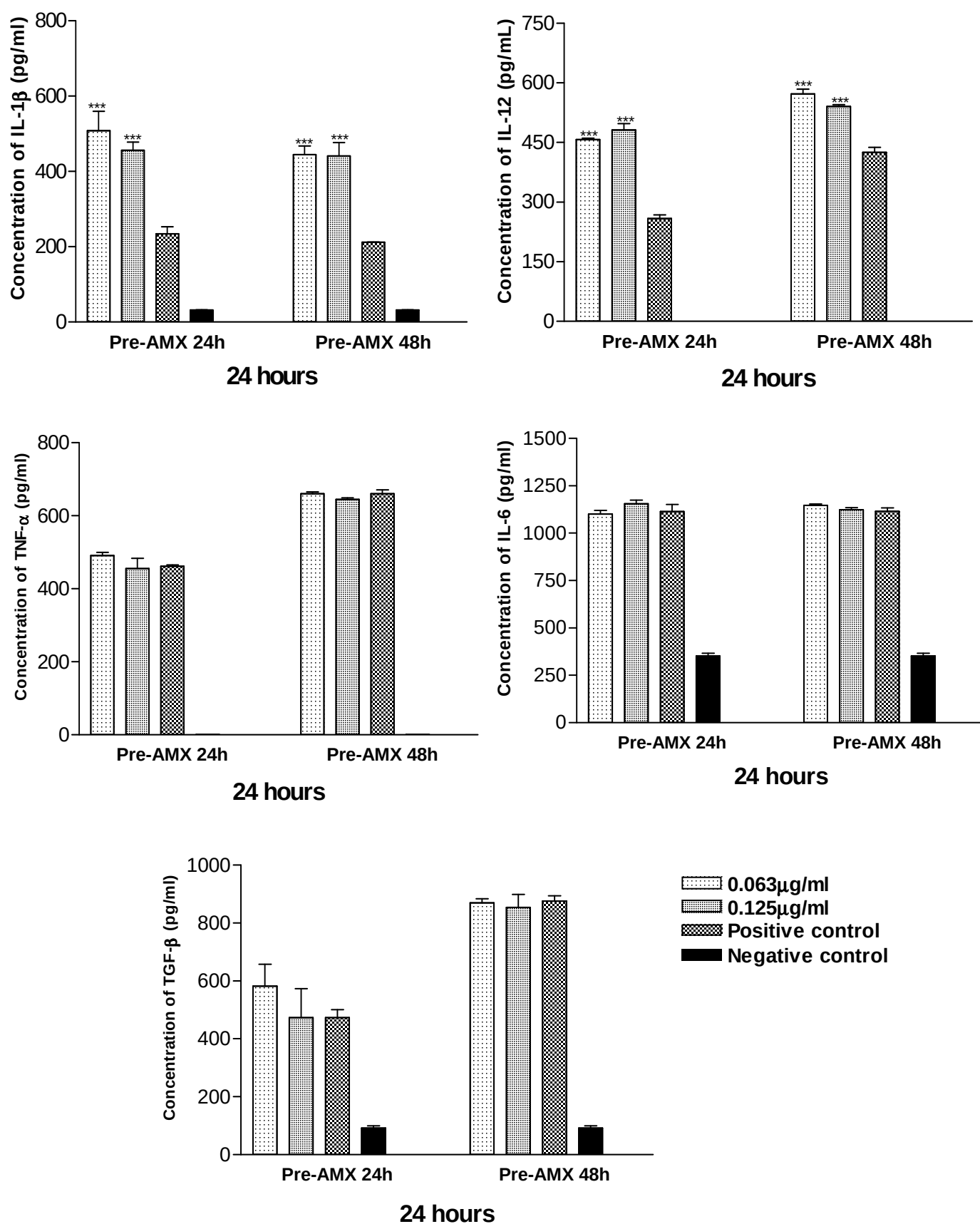


Figure 2: Concentrations of IL-1 β , IL-12, TNF- α , IL-6, TGF- β and IL-10 released in the culture supernatants of macrophages after infection with *H. pylori*. **Pre-AMX 24h/48h:** *H. pylori* maintained for 24 and 48 hours respectively, in the presence of the antimicrobial agent, then

washed with sterile phosphate buffered saline. **Positive control:** *H. pylori* without antimicrobial grown for 24 and 48 hours. **Negative control:** untreated macrophages. **Intra-group** statistical difference compared to positive control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4. Detection of apoptosis with annexin V and propidium iodide

Macrophages infected with *H. pylori* previously maintained for 24 and 48 hours at 0.063 and 0.125 $\mu\text{g/ml}$ of amoxicillin showed higher apoptosis (early and late/necrosis) ($p < 0.05$) compared with their controls (Fig. 3).

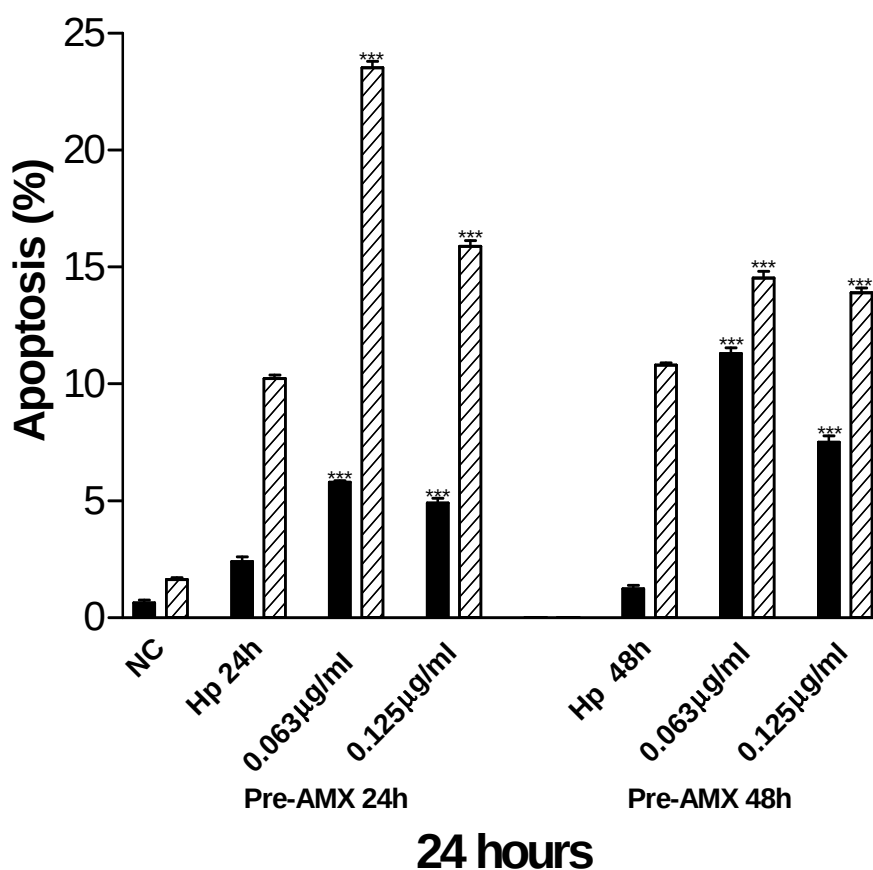


Figure 3: Apoptosis of macrophages after infection with *H. pylori* for 24 hours determined by flow cytometry. **Pre-AMX 24h/48h:** *H. pylori* maintained for 24 and 48 hours respectively, in the presence of the antimicrobial agent, then washed with sterile phosphate buffered saline. **NC:** Macrophages without infection and treatment. **Hp 24/48h:** *H. pylori* without antimicrobial grown for 24 and 48 hours. **Intra-group** statistical difference compared to positive control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Prevalence of *H. pylori* antibiotic resistance is increasing worldwide, and it has been the main factor affecting efficacy of current therapeutic regimens [12]. Concentrations of antibiotics below the minimum inhibitory are known to induce bacterial virulence that can alter the host response [20].

Nitric oxide (NO) produced by inducible NO synthase (iNOS) during infection plays a crucial role in host defense mechanisms, via its antimicrobial and cytoprotective activities [21,22]. In this study, we demonstrated that *H. pylori* treated with sub-MICs of amoxicillin increased macrophages NO production when compared to the controls. With appropriate defenses, this oxidative stress would be able to rapidly kill nearby *H. pylori*, but it is known that *H. pylori* combats oxidative stress via diverse activities, some of which are unique [23]. Although NO is an important signaling molecule and a component of inflammatory response, its overproduction leads to tissue damage and contributes to inflammation [24].

Cytokines play an important role in the pathogenesis of gastritis caused by *H. pylori* infection, and their upregulated production, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 and IL-12, are associated with enhanced inflammatory responses [25-29]. In the current study, *H. pylori* treated with amoxicillin at sub-inhibitory concentration increases the release of IL-1 β by infected macrophages. Apart from its role in inflammation, IL-1 β is also a potent inhibitor of gastric acid secretion [30]. This cytokine activates signaling pathways in gastric epithelial cells that ultimately downregulate H $\text{K}\alpha$ gene transcription. Such downregulation would lower the expression of functional proton pumps and thereby contribute

to gastric hypochlorhydria [31]. Clinically, it is known that hypochlorhydria predisposes to gastric atrophy [32].

Increased levels of IL-12 in gastric mucosa play a key role in *H. pylori*-associated gastric disease [33], and are also involved in the induction or amplification of the T-helper (Th) type 1 response [34]. Our results demonstrated higher production of IL-12 by macrophages infected with *H. pylori* previously treated with sub-MICs of amoxicillin as compared to *H. pylori* without treatment. Although IL-12 has been shown to be essential for protection against *H. pylori*, prolonged production of IL-12 is associated with the development of peptic ulcer disease [34].

In contrast, *H. pylori* stimulation of TNF- α , IL-6 and TGF- β in macrophages were not altered by bacteria amoxicillin pre-treatment. The expression of TNF- α and IL-6 has been demonstrated to be stimulated by *H. pylori* purified urease in mononuclear cells [35]. These findings suggest that urease, an important virulence factor, may not be up-regulated by amoxicillin. However, this point needs further investigations. Although TGF- β was produced by macrophages after exposure to *H. pylori*, our results showed that *H. pylori* pre-treated with amoxicillin did not alter this cytokine production by macrophages. Among the cytokines evaluated, IL-10 was not induced by the macrophages infected with *H. pylori* treated with sub-MICs of amoxicillin. All these cytokines suggested that polarization of the Th1 occurred, contributing to macrophage injury and inhibition of a beneficial Th2 cytokine response.

Previous in vitro studies showed that sub-MICs of beta-lactam antibiotics and fluoroquinolones increase the levels of alpha-toxin expression of *Staphylococcus aureus*, suggesting that the symptoms of *S. aureus* infections

may be aggravated by penicillin treatment [20,36,37]. Our results provide evidence that amoxicillin, at sub-MICs, increases the immune response in *H. pylori* infected macrophages by inducing inflammation through specific inflammatory mediators.

Several reports demonstrated that apoptosis of macrophage can be induced by numerous effectors molecules, including NO [38], and that modulation of NO production in response to *H. pylori* would regulate levels of macrophage apoptosis [39]. Our results demonstrated a decrease in cell viability and increase macrophage apoptosis (early and late/necrosis) after infection with *H. pylori* previously treated with sub-MICs of amoxicillin.

H. pylori induces macrophages apoptosis in order to modulate host immune responses and establish chronic infection [40]. Corroborating the results, macrophages exposed to *H. pylori* previously treated with sub-MICs of amoxicillin produce more NO, IL-1 β and IL-12 increase apoptosis than *H. pylori*-infected macrophages without treatment.

Numerous studies demonstrated that antimicrobial at sub-MICs may alter the bacterial virulence factors and the microorganism-host relationship [15]. This study suggests that amoxicillin at sub-inhibitory concentrations has an effect on the virulence of *H. pylori* that enhances the innate response and the inflammatory process. In clinical situations in which antibiotic treatment does not lead to a rapid and total eradication of *H. pylori*, but takes a partial reduction of bacterial numbers, the presence of amoxicillin can aggravate the inflammatory process compromising the disease outcome.

Acknowledgment

This investigation was financially supported by PADC, CAPES and FCF-UNESP. We thank Djamile Cordeiro Mattos, Cibeles Bonacorsi and Aline Tansini for their technical assistance.

References

- [1] Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Ann Rev Pathol* 2006; 1: 63–96.
- [2] Zaki MH, Akuta T, Akaike T. Nitric oxide-induced nitrate stress involved in microbial pathogenesis. *J Pharmacol Sci* 2005; 98:117-29.
- [3] Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterol* 2007; 133:288–308.
- [4] Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest* 2006; 116:1092–1101.
- [5] Obonyo M, Cole SP, Datta SK, Guiney DG. Evidence for interleukin-1-independent stimulation of interleukin-12 and down-regulation by interleukin-10 in *Helicobacter pylori* infected murine dendritic cells deficient in the interleukin-1 receptor. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 414–19.

- [6] Suzuki H, Masaoka T, Nomura S, Hoshino Y, Kurabayashi K, Minegishi Y. Current consensus on the diagnosis and treatment of *H. pylori*-associated gastroduodenal disease. *Keio J Med* 2003; 52:163-73.
- [7] Wu YY, Tsai HF, Lin WC, Chou AH, Chen HT, Yang JC et al. *Helicobacter pylori* enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10:2334-39.
- [8] Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2232-40.
- [9] Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 2007; 133:659-72.
- [10] Costa F, D'Elios MM. Management of *Helicobacter pylori* infection. *Expert Rev Ant Infect Ther* 2010; 8:887-92.
- [11] Gerrits MM, Van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications, *Lancet Infect Dis* 2006; 6:699–709.
- [12] Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Kodaira C, Nishino M, Yamade M et al. Treatment strategy to eradicate *Helicobacter pylori* infection: impact of pharmacogenomics-based acid inhibition regimen and alternative antibiotics, *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8:2701–17.
- [13] Kanizaj TF, Katicic M, Skurla B, Ticak M, Plecko V, Kalenic S. *Helicobacter pylori* eradication therapy success regarding different treatment period based on

clarithromycin or metronidazole triple-therapy regimens. *Helicobacter* 2009;14:29-35.

[14] Held TK, Adamczik C, Trautmann M, Cross AS. Effects of MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumonia*, *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1093-96.

[15] Di Martino, Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to human fibronectin. *Chemother* 2001;47:344-49.

[16] Braga PC, Dal Sasso M, Sala MT. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:15-25.

[17] Atkinson BA, Amaral L. Sublethal concentrations of antibiotics, effects on bacteria and the immune system. *Crit Rev Microbiol* 1982; 9:101–38.

[18] Dal Sasso M, Culici M, Bovio C, Braga PC. Gemifloxacin: effects of subinhibitory concentrations on various factors affecting bacterial virulence. *Int J Antimicrob Agents* 21 (2003) 325-333.

[19] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, *Anal Biochem* 1982; 126:131-38.

[20] Worlitzsch D, Kaygin H, Steinhuber A, Dalhoff A, Botzenhart K, Döring G. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:196-202.

[21] Nathan CF, Hibbs Jr JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3:65-70.

- [22] Kim YM, Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997; 272:1402-11.
- [23] Wang G, Alamuri P, Maier RJ. The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2006; 61:847–60.
- [24] Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifunctional process First American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* 1992; 52:6735-40.
- [25] Harris PR, Ernst PB, Kawabata S, Kiyono H, Graham MF, Smith PD. Recombinant *Helicobacter pylori* urease activates primary mucosal macrophages. *The J Infect Dis* 1998; 178:1516–20.
- [26] Wang YH, Gorvel JP, Chu YT, Wu JJ, Le HY. *Helicobacter pylori* impairs murine dendritic cell responses to infection. *PLoS One* 2010; 5:e10844.
- [27] Ma YJ, Duan GC, Zhang RG, Fan QT, Zhang WD. Mutation of *iceA* in *Helicobacter pylori* compromised IL-8 induction from human gastric epithelial cells. *J Basics Microbiol* 2010; 50:S83-8.
- [28] Manente L, Perna A, Buommino E, Altucci L, Lucariello A, Citro G et al. The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Cell Physiol* 2008; 214:582–87.
- [29] Andres S, Schmidt HM, Mitchell H, Rhen M, Maeurer M, Engstrand L. *Helicobacter pylori* defines local immune response through interaction with dendritic cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011; 61:168-78.
- [30] El-Omar EM. The importance of interleukin 1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48:743–47.

- [31] Saha A, Hammond CE, Gooz M, Smolka AJ. Interleukin-1 β modulation of H,K-ATPase α subunit gene transcription in *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:G1055-61.
- [32] Waghray M, Zavros Y, Saqui-Salces M, El-Zaatari M, Alamelumangapuram CB, Todisco A et al. Interleukin-1 β promotes gastric atrophy through suppression of sonic hedgehog. *Gastroenterol* 2010; 138:562–72.
- [33] Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, Niedobitek G, Lochs H, Schreiber S. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:316-23.
- [34] Jonge R, Kuipers EJ, Langeveld SCL, Loffeld RJLF, Stoof J, van Vliet AHM et al. The *Helicobacter pylori* plasticity region locus jhp0947–jhp0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 41:161–67.
- [35] Tanahashi T, Kita M, Kodama T, Yamaoka Y, Sawai N, Ohno T et al. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2000; 68:664-71.
- [36] Kernodle DS, McGraw PA, Barg NL, Menzies BE, Voladri RK, Harshman S. Growth of *Staphylococcus aureus* with nafcillin in vitro induces alpha-toxin production and increases the lethal activity of sterile broth filtrates in a murine model. *J Infect Dis* 1995; 172:410–19.
- [37] Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2817–23.

- [38] Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1993; 150:5080.
- [39] Gobert AP, Cheng Y, Wang JY, Boucher JL, Ramaswamy K, Stephen D et al. *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J Immunol* 2002; 168:4692-4700.
- [40] Jones NL, Day AS, Jennings H, Shannon PT, Galindo-Mata E, Sherman PM. Enhanced disease severity in *Helicobacter pylori*-infected mice deficient in Fas signaling. *Infect Immun* 2002; 70:2591–97.