

**TAGLIANE LIZA BECKER**

**ESTUDO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA  
DE INIBIDORES DE SECREÇÃO ÁCIDA**

**ORIENTADOR**

**PROF. DR. JOSÉ PEDRAZZOLI JÚNIOR**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Bióloga – Tagliane Liza Becker.*

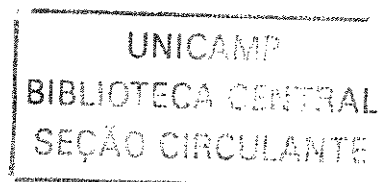
*Campinas, 17 de fevereiro de 2005.*

*Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior  
- Orientador -*

**CAMPINAS**

**2005**

i



**TAGLIANE LIZA BECKER**

**ESTUDO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA  
DE INIBIDORES DE SECREÇÃO ÁCIDA**

**ORIENTADOR**

**PROF. DR. JOSÉ PEDRAZZOLI JÚNIOR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**CAMPINAS**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

B388e Becker, Tagliane Liza  
Estudo "in vivo" da atividade antiinflamatória de inibidores de secreção ácida / Tagliane Liza Becker. Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: José Pedrazzoli Júnior  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Pantoprazol. 2. Neutrófilos. 3. Bombas de próton. 4. Helicobacter pylori. 4. Antagonistas dos receptores H2 de histamina. I. José Pedrazzoli Júnior. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

JNIDADE Bc  
Nº CHAMADA UNICAMP  
B388e  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMPO 65.206  
PROC 16.P.00086.05  
C \_\_\_\_\_ B \_\_\_\_\_  
PREÇO 11,00  
DATA 11/08/05  
Nº CPD Bibnd 360465

SLP



UNICAMP

---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

---

**Orientador:**

---

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**

---

---

**Membros:**

---

**Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**

---

**Prof. Dr. Stephen Hyslop (UNICAMP)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Soraia Katia Pereira Costa (USP)**

---

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 17/02/2005**

---

***“Um homem pode ser destruído, mas nunca derrotado”.***

(Ernest Hemingway)

***Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo”.***

(Galileu Galilei)

## ***AGRADECIMENTOS***

É com muita satisfação que venho neste espaço agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado e concluído da maneira, espero, mais adequada.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, por todo sacrifício que fizeram para que eu tivesse a oportunidade de estudar, pelo apoio e confiança. Agradeço ainda as minhas irmãs, que sempre me apoiaram de forma a conseguir tempo e disposição para desenvolver esse trabalho. Obrigada pelos momentos de confiança e carinho.

E, principalmente, agradeço ao Marco, o qual nunca hesitou em tranquilizar-me em ocasiões que me deixaram desentusiasmada e preocupada. Obrigada pela paciência, carinho e amor que sempre me dedicou, pois certamente foi isso que me incentivou e permitiu o máximo de meu empenho.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr. (Tio), pela oportunidade, confiança, orientação e, acima de tudo, pela amizade.

Devo muita gratidão à Prof<sup>a</sup> Dra. Alessandra Gambero pela dedicada co-orientação e estímulo em todas as etapas do trabalho. Espero ter cumprido a tarefa satisfatoriamente, e de acordo com suas orientações.

Não poderia esquecer-me de agradecer à Marta Maróstica, que muito me ajudou na parte experimental do trabalho e além de tudo demonstrou ser grande amiga. E também ao Ronaldo e à Fernanda pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

Meus agradecimentos estendem-se aos professores da UNIFAG, Prof. Dr. Sergio de Mendonça e Prof. Dr. Marcelo Ribeiro de Lima, bem como as suas alunas Vanessa Toledo

Sette e Yune Helena Borges Benvengo, por terem fornecido a matéria prima para o trabalho, *Helicobacter pylori*.

Minha gratidão estende-se também aos demais professores, alunos e funcionários da UNIFAG: Betão, Bernasconi, Eduardo, Paulinho, Cebola, Fabíola, Lucas, Daniel, D. Nice (pelo cafezinho maravilhoso!!), Maristela, Vivian, Beth, Benê, Mariana, Amanda, Rafael, enfim, a todos que de certa forma contribuíram no desenvolvimento do trabalho. Obrigada pela atenção e paciência.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra. Sonia Gurgueira, que nunca poupou esforços em contribuir para o meu crescimento intelectual e pessoal.

E, certamente, não poderia deixar de agradecer aos amigos, pois sem vocês tudo seria mais difícil. Obrigada pelos inúmeros momentos de gargalhadas na Cachaçaria, no Trairagem, na Confraria, no Giulio's, ah, já estava me esquecendo, no War.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que assistiram o desenvolvimento do trabalho e sempre que possível, contribuíram para enriquecê-lo.

E à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Como gratidão, dedico este trabalho a todos supra citados.

Obrigada pela confiança!



LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Processo inflamatório.....	22
1.2. <i>Helicobacter pylori</i> e inflamação gástrica.....	23
1.3. Fármacos utilizados para inibir ou neutralizar a secreção gástrica.....	28
1.4. Modelo experimental de inflamação na bolsa de ar em ratos.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Animais.....	36
3.2. Cultura do <i>Helicobacter pylori</i> .....	36
3.3. Modelo experimental de inflamação na bolsa de ar em ratos.....	37
3.4. Determinação da cinética da resposta inflamatória induzida pelo <i>Helicobacter pylori</i> .....	39
3.5. Realização da curva de concentração-resposta induzida pelo <i>Helicobacter pylori</i> .....	39
3.6. Determinação da resposta inflamatória em função da viabilidade bacteriana.....	39
3.7. Avaliação da resposta inflamatória induzida por diferentes linhagens de <i>Helicobacter pylori</i> .....	40
3.8. Determinação dos níveis de PGE <sub>2</sub> e citocinas.....	40
3.9. Avaliação da atividade anti-secretora dos inibidores de secreção ácida.....	41
3.10. Avaliação do efeito dos inibidores de secreção ácida na inflamação..	41

## SUMÁRIO

---

3.11. Análise estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Cinética da resposta inflamatória induzida pelo <i>Helicobacter pylori</i> na bolsa de ar.....	44
4.2. Resposta inflamatória observada após a inoculação de diferentes concentrações de <i>Helicobacter pylori</i> .....	48
4.3. Resposta inflamatória observada após a inoculação de bactéria fervida.....	52
4.4. Resposta inflamatória observada após a inoculação de diferentes linhagens de <i>Helicobacter pylori</i> .....	55
4.5. Níveis de prostaglandina E <sub>2</sub> , IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ no exsudato.....	58
4.6. Caracterização da resposta inflamatória induzida por carragenina e <i>Helicobacter pylori</i> na bolsa de ar em ratos.....	60
4.7. Caracterização da atividade anti-secretora dos inibidores de bomba protônica.....	63
4.8. Efeito dos inibidores de bomba protônica sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina e <i>Helicobacter pylori</i> .....	65
5. DISCUSSÃO.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
7. ANEXOS.....	89
7.1. ARTIGO 1 : Acute inflammatory response induced by <i>Helicobacter pylori</i> in the rat air pouch.....	91
7.2. ARTIGO 2: Pantoprazole treatment does not invoke anti-inflammatory properties in vivo.....	97
7.3. Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal.....	104

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>BHI-</b>	Infusão de coração e cérebro
<b>Cag A-</b>	Citotoxina associada à proteína A
<b>cagA-</b>	Gene codificador da citotoxina associada à proteína A
<b>cag PAI -</b>	Ilha de patogenicidade cag
<b>CEMIB-</b>	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
<b>COX-</b>	Ciclooxigenase
<b>DMSO-</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNU-</b>	Dispepsia não ulcerosa
<b>ELISA-</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EPM-</b>	Erro padrão da média
<b>fMLP-</b>	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
<b>H<sup>+</sup>-</b>	Íons de hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>-</b>	Receptor de histamina do tipo 2
<b>HP-NAP-</b>	<i>Helicobacter pylori</i> proteína ativadora de neutrófilos
<b>ICAM-1-</b>	Molécula de adesão intercelular-1
<b>iceA -</b>	Gene induzido por contato com o epitélio
<b>IFN-<math>\gamma</math>-</b>	Interferon gama
<b>IL-1-</b>	Interleucina-1
<b>IL-1<math>\beta</math>-</b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>IL-6-</b>	Interleucina-6
<b>IL-8-</b>	Interleucina-8
<b>LPS-</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTs-</b>	Leucotrienos
<b>MN-</b>	Células mononucleares
<b>PAF-</b>	Fator de ativação plaquetária
<b>PBS-</b>	Tampão salina fosfatado
<b>PCR-</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PGs-</b>	Prostaglandinas
<b>PGE<sub>2</sub>-</b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>pH<sub>i</sub>-</b>	pH intracelular

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>PMA-</b>	Forbol miristato acetato
<b>PMN-</b>	Células polimorfonucleares
<b>PPI-</b>	inibidor de bomba protônica
<b>RNA-</b>	Ácido ribonucléico
<b>SS1-</b>	Linhagem de <i>Helicobacter pylori</i> (Sydney strain)
<b>TNF<math>\alpha</math>-</b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>TTC-</b>	Cloreto de trifenil tetrazolium
<b>UP-</b>	Úlcera péptica
<b>VacA-</b>	Citotoxina de vacuolização
<b>vacA-</b>	Gene codificador da citotoxina de vacuolização
<b>VCAM-1-</b>	Molécula de adesão de células vasculares -1

## **LISTA DE TABELAS E FIGURAS**

---

	Página
<b>Tabela 1.</b> Relação das linhagens utilizadas e suas diferenças genótípicas.....	40
<b>Tabela 2.</b> Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar 1, 6, 12 e 24 horas após a inoculação do <i>H. pylori</i> .....	47
<b>Tabela 3.</b> Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de suspensão de <i>H. pylori</i> . .....	51
<b>Tabela 4.</b> Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de suspensão de <i>H. pylori</i> não fervida ou fervida.....	53
<b>Tabela 5.</b> Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de diferentes linhagens de <i>H. pylori</i> .....	57
<b>Tabela 6.</b> Níveis de PGE <sub>2</sub> , IL-1β e TNF-α (pg/ml) encontrados no exsudato coletado 6 horas após a inoculação de <i>H. pylori</i> .....	59
<b>Tabela 7.</b> Contagem diferencial de leucócitos do exsudato coletado após 6 horas da injeção de carragenina na bolsa de ar em ratos.....	62
<b>Tabela 8.</b> Contagem diferencial de leucócitos presentes na bolsa de ar em ratos após 6 horas da injeção local de <i>H. pylori</i> .....	62
<b>Tabela 9.</b> Número de células polimorfonucleares e mononucleares presente na bolsa de ar após 6 horas da injeção de carragenina em ratos previamente tratados com os inibidores de secreção ácida.....	70
<b>Tabela 10.</b> Número de células polimorfonucleares e mononucleares presente na bolsa de ar após 6 horas da injeção de <i>H. pylori</i> em ratos previamente tratados com os inibidores de secreção ácida.....	71
<b>Figura 1.</b> Volume de exsudato coletado da bolsa de ar 1, 6, 12 e 24 horas após a inoculação de <i>H. pylori</i> .....	457
<b>Figura 2.</b> Contagem de leucócitos totais encontradas no exsudato coletado na bolsa de ar (A) e no sangue periférico (B) 1, 6, 12 e 24 horas após a inoculação de <i>H. pylori</i> .....	46

	<b>Página</b>
<b>Figura 3.</b> Volume de exsudato coletado 6 horas após a inoculação de diferentes concentrações de <i>H. pylori</i> na bolsa de ar em ratos.....	<b>49</b>
<b>Figura 4.</b> Número de leucócitos encontrados 6 horas após a inoculação de diferentes concentrações de <i>H. pylori</i> na bolsa de ar em ratos.....	<b>50</b>
<b>Figura 5.</b> Volume de exsudato (A) e número de leucócitos (B) coletados na bolsa de ar em ratos 6 horas após a inoculação de <i>H. pylori</i> não fervida ou fervida.....	<b>54</b>
<b>Figura 6.</b> Número de leucócitos 6 horas após a inoculação de diferentes linhagens de <i>H. pylori</i> na bolsa de ar em ratos.....	<b>56</b>
<b>Figura 7.</b> Volume de exsudato e número de leucócitos coletados na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de carragenina (A e B) ou <i>H. pylori</i> (C e D).....	<b>61</b>
<b>Figura 8.</b> Efeito dos inibidores de secreção ácida, administrados i.p. sobre, a secreção basal de ácido gástrico, após ligadura de piloro em ratos.....	<b>64</b>
<b>Figura 9.</b> Volume de exsudato coletado na bolsa de ar em ratos 6 horas após a inoculação de carragenina em ratos previamente tratados com inibidores de secreção ácida durante 7(A) ou 28 (B) dias.....	<b>66</b>
<b>Figura 10.</b> Número de leucócitos coletados na bolsa de ar de ratos 6 horas após a inoculação de carragenina em ratos previamente tratados com inibidores de secreção ácida durante 7(A) ou 28 (B) dias.....	<b>67</b>
<b>Figura 11.</b> Número de leucócitos coletado na bolsa de ar de ratos 6 horas após inoculação de <i>H. pylori</i> em ratos previamente tratados com inibidores de secreção ácida durante 7(A) ou 28 (B) dias.....	<b>68</b>
<b>Figura 12.</b> Volume de exsudato (A) e número de leucócitos (B) coletado na bolsa de ar de ratos 6 horas após a inoculação de carragenina em ratos previamente tratados com inibidores de secreção ácida durante 7(A) ou 28 (B) dias.....	<b>69</b>



**RESUMO**

---

As principais causas de ulceração da mucosa gástrica são o uso prolongado de antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) e a infecção pelo *Helicobacter pylori*. Pacientes com ulcerações gástrica são tratados, principalmente, com antagonistas de receptor de histamina-2 e inibidores de bomba protônica, que neutralizam e/ou reduzem a secreção ácida. Estudos têm mostrado que estas drogas possuem propriedades adicionais de inibirem funções leucocitárias. Estas propriedades são de relevante importância, visto que a lesão na mucosa gástrica induzida tanto por AINEs quanto pelo *H. pylori*, envolve diretamente a participação de neutrófilos. Baseado nestes relatos, os objetivos deste trabalho foram: 1) padronizar o modelo de inflamação induzida por *H. pylori* em bolsa de ar na pele dorsal de ratos; 2) avaliar a possível atividade antiinflamatória de inibidores de secreção ácida modelo experimental. A inoculação de *H. pylori* na bolsa de ar em ratos causou um significativo infiltrado neutrofilico, sendo este, dependente da concentração e, independente da viabilidade e do genótipo das linhagens inoculadas. Nota-se que após o tratamento com os inibidores de secreção ácida, durante 7 ou 28 dias, a produção de exsudato inflamatório e migração de leucócitos na bolsa de ar incubada com *H. pylori* ou carragenina não foi alterada. Em contraste, a dexametasona, antiinflamatório esteroidal, inibe significativamente a resposta inflamatória. Ao contrário dos estudos anteriores, esses resultados indicam que os inibidores de bomba protônica e os antagonistas de receptor H<sub>2</sub> não possuem atividade antiinflamatória no modelo de inflamação *in vivo* induzido pelo *H. pylori* em bolsa de ar em ratos, quando utilizados por curto ou longo período.

**ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

---

*Helicobacter pylori* infection and the administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs are the main causes of gastric ulcerations. In the clinical setting, patients with gastric ulcerations are treated with histamine-2 (H<sub>2</sub>) receptor antagonists and proton pump inhibitors (PPI) to neutralize or reduce the acid secretion. Recently, studies have shown that these drugs have additional properties related to their capacity to inhibit some neutrophil functions. Since the damage to gastric mucosa, associated with *H. pylori* or nonsteroidal anti-inflammatory drugs, is also induced by neutrophils these properties could be beneficial. In the present study, we characterized the inflammatory response induced by *H. pylori* in the rat air pouch model. We also evaluated the anti-inflammatory activity of acid secretion inhibitors such as omeprazole, lansoprazole, pantoprazole and cimetidine in this experimental model. The injection of *H. pylori* into rat air pouch caused pronounced neutrophil infiltration. This response was dependent upon the number of bacteria injected and independent of bacterial viability and genotype. The duration of treatment with the acid secretion inhibitors did not affect the ability of neutrophils to migrate in response to *H. pylori* or carrageenan. On the other hand, dexamethasone, a classic anti-inflammatory drug, reduced the exudate formation and leukocyte migration. Our results indicate that proton pump inhibitors or histamine-2 receptor antagonists have no anti-inflammatory activity *in vivo*.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta local e inespecífica do tecido a um agente lesivo, caracterizada por uma série de alterações que tendem a minimizar os efeitos da agressão. Essas alterações são denominadas sinais “cardinais”, sendo eles: rubor, calor, tumor e dor. No século XV, Virchow acrescentou um quinto sinal, a perda da função (MONTENEGRO e FECCHIO, 1999).

O eritema (rubor) e a hipertermia (calor) na inflamação são conseqüências da vasodilatação e do aumento do fluxo sangüíneo na região inflamada. O edema (tumor) é provocado pelo acúmulo de exsudato, particularmente dos componentes fluidos e leucócitos; a hiperalgesia (dor) depende do acúmulo local de aminas, cininas e mediadores lipídicos que atuam sobre as terminações nervosas, e a perda da função é conseqüência do somatório de vários fatores, especialmente do edema e da dor (VANE e BOTTING, 1996).

Em condições normais, os elementos figurados do sangue circulam, preferencialmente, na porção central do fluxo sangüíneo e somente o fluido entra em contato com o endotélio. No processo inflamatório, essa condição é modificada, pois os leucócitos passam a circular na periferia do vaso, o que permite aos mesmos, forte adesão ao endotélio vascular (adesão). Posteriormente, passam por entre as junções endoteliais (diapedese) e migram para o local inflamado em resposta aos inúmeros mediadores do processo inflamatório (quimiotaxia) (VANE e BOTTING, 1996; MONTENEGRO e FECCHIO, 1999).

## 1. INTRODUÇÃO

---

Os inúmeros mediadores inflamatórios podem ter origem no plasma, como no caso do sistema complemento e cininas (ex: bradicinina), ou serem sintetizados e liberados pelas células que migram para o local da agressão, como no caso das aminas (ex: histamina e serotonina), das citocinas (ex: interleucina-1, IL-1) e dos mediadores lipídicos (ex: prostaglandinas -PGs e leucotrienos -LTs) (STEVENS, 1996; GARRISON, 1998).

### 1.2. *Helicobacter pylori* E INFLAMAÇÃO GÁSTRICA

A inflamação gástrica pode ser definida como uma resposta de proteção contra injúrias, envolvendo interações complexas homeostáticas. Entretanto, quando este processo ocorre de maneira desordenada, tem-se como resposta o dano celular e tecidual excessivo, resultando na cronificação do processo inflamatório e destruição do tecido sadio (YOSHIKAWA e NAITO, 2001).

As principais causas de inflamação gástrica descritas atualmente são o uso excessivo de antiinflamatórios não-esteroidais e a infecção pelo *Helicobacter pylori*.

O *H. pylori* é um bacilo espiralado e flagelado, Gram-negativo, de crescimento lento e microaerofílico, cujo nicho ecológico é restrito ao estômago humano e, ocasionalmente, de outros mamíferos (CRABTREE e FIGURA, 1999). A infecção causada pelo *H. pylori* na mucosa gástrica tem sido considerada uma das mais comuns infecções crônicas bacterianas em seres humanos (GRAHAM, 2000). Estimativas indicam que a taxa da população mundial colonizada por esta bactéria seja superior a

## 1. INTRODUÇÃO

---

50% e a importância disto reside no fato da infecção estar intimamente associada à gastrite aguda, gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico (TAYLOR e BLASER, 1991; GO, 2002).

O *H. pylori* tem como principal característica bioquímica a abundante produção de urease. Esta enzima tem um papel crucial na fase de colonização do epitélio gastrointestinal, pois é responsável por hidrolisar uréia em água e amônia, tamponando a acidez gástrica e otimizando o pH ao redor da bactéria, permitindo sua colonização no epitélio gastrointestinal e, conseqüentemente, seu crescimento (GOODWIN e ARMSTRONG, 1989). Além disso, é um importante marcador da presença do microorganismo, sendo utilizado para diagnosticar a presença da bactéria através dos testes rápidos de urease, respiratórios e sorológicos (PETERSON e GRAHAM, 1998).

A resposta inicial à infecção pelo *H. pylori* é caracterizada por um considerável infiltrado neutrofílico, o que contribui na indução do dano tecidual através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de ativação plaquetária (PAF), bem como, a liberação de espécies reativas de oxigênio (WALLACE, 1991; KOZOL *et al.*, 1991; BLASER, 1992).

A IL-8 é um potente quimiotático de neutrófilos (CRABTREE *et al.*, 1999; HIDA *et al.*, 1999). Estudos relatam o aumento significativo da expressão do RNAm da IL-8 em biópsias de pacientes com gastrite induzida pelo *H. pylori* e esse aumento mostrou-se



## 1. INTRODUÇÃO

---

relacionado com a severidade da gastrite, sugerindo que a IL-8 tem um importante papel na inflamação da mucosa (MOSS *et al.*, 1996).

Além dos mediadores inflamatórios liberados no sítio de inflamação, componentes do próprio *H. pylori* são capazes de induzir ativação e quimiotaxia de neutrófilos, geração de metabólitos reativos de oxigênio e expressão de moléculas de adesão (MONTECUCCO *et al.*, 1999). É comumente reconhecido, que os lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas estimulam a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6). Na gastrite crônica ativa associada ao *H. pylori*, o TNF- $\alpha$  e a IL-6 podem ser derivados dos macrófagos ou dos linfócitos T (PAJARES, 1995). O lipopolissacarídeo do *H. pylori* (LPS) possui uma baixa atividade biológica se comparado com o LPS de outras bactérias (NIELSEN *et al.*, 1994). Apesar disso, o LPS do *H. pylori* pode estimular a secreção de IL-8 pelas células epiteliais gástricas e células mononucleares *in vitro* (BLISS *et al.*, 1998).

Vários estudos *in vitro* têm fornecido evidências da presença de um componente protéico em extratos aquosos de *H. pylori*, capaz de atrair e ativar neutrófilos e outras células inflamatórias, além de estimular a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (FUJIWARA *et al.*, 2001). Atualmente este componente protéico tem sido denominado de proteína ativadora de neutrófilos (HP-NAP- *H. pylori* neutrophil-activating protein). O HP-NAP promove a adesão de neutrófilos às células epiteliais e quimiotaxia *in vitro*, bem como a produção de oxigênio reativo e a expressão de ciclooxigenase-2 em neutrófilos (SATIN *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001), sugerindo que esta molécula tenha um papel importante

## 1. INTRODUÇÃO

---

no acúmulo dessas células no sítio de inflamação (EVANS *et al.*, 1995; SATIN *et al.*, 2000).

Acredita-se que a HP-NAP seja capaz de induzir a adesão a células endoteliais e quimiotaxia de neutrófilos por modular a expressão de CD11b/CD18 (MAI *et al.*, 1992; EVANS *et al.*, 1995), bem como estimular a produção de espécies reativas de oxigênio nestas células através do aumento da concentração de cálcio e fosforilação de proteínas intracelulares (SATIN *et al.*, 2000). A maioria dos pacientes infectados com o *H. pylori* possui anticorpos contra a HP-NAP. Esta proteína é também capaz de promover a imunização de camundongos protegendo-os da infecção pelo *H. pylori* (SATIN *et al.*, 2000).

A heterogeneidade na virulência das cepas de *H. pylori* pode ser uma das principais razões pela qual apenas uma minoria dos pacientes infectados desenvolve doença ulcerosa péptica (BLASER, 1995).

Dentre os fatores de virulência conhecidos por diferir entre as cepas bacterianas, citam-se principalmente a citotoxina de vacuolização VacA, codificada pelo gene *vacA*, e a proteína CagA, codificada pelo gene *cagA* (ATHERTON *et al.*, 1995).

O gene *vacA* foi caracterizado por possuir duas famílias de alelos estruturais (m1, m2) e três famílias de alelos da seqüência sinal (s1a, s1b, s2). Estudos preliminares sugerem que pacientes com úlcera péptica possuem mais linhagens de *H. pylori* s1 do que do tipo s2 (BLASER, 1996).

## 1. INTRODUÇÃO

---

A toxina vacuolizante (VacA) induz a formação de um grande vacúolo citoplasmático em culturas celulares e aumenta a permeabilidade da barreira epitelial, provavelmente por atuar em junções celulares reduzindo a resistência trans-epitelial, potencializando, assim, a migração de neutrófilos na mucosa gástrica (COVER *et al.*, 1990; PAPINI *et al.*, 1998).

É interessante observar que, embora a maioria das cepas de *H. pylori* possua o gene *vacA*, apenas 50-60% de todas as cepas induzem a vacuolização em células eucarióticas. Em contrapartida, o gene *cagA* está presente em cerca de 60% de todas as cepas de *H. pylori*, e a maioria delas expressa CagA, um antígeno de superfície associado a progressão da lesão gastrintestinal (LEUNK *et al.*, 1988; TELFORD *et al.*, 1994; BLASER, 1996; PETERSON & GRAHAM, 1998; TAKATA *et al.*, 1998). Relatos na literatura mostram que a produção de IL-8 pelas células epiteliais gástricas encontra-se aumentada em pacientes com gastrite crônica associada ao *H. pylori cagA* positivo (EATON *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos relatam a presença de outros genes da ilha de patogenicidade *cag* PAI envolvidos na indução de IL-8, dentre eles, o *cagE*. A inativação do *cagE* diminui significativamente a indução da expressão de IL-8 pelas células epiteliais gástricas (SHARMA *et al.*, 1995; CENSINI *et al.*, 1996; OGURA *et al.*, 1998).

Diversos fatores de virulência contribuem na patogenicidade do *H. pylori*. Entretanto, não está muito claro quais desses, direta ou indiretamente, modulam a migração de neutrófilos durante a infecção pelo *H. pylori*.

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.3. FÁRMACOS UTILIZADOS PARA INIBIR OU NEUTRALIZAR A SECREÇÃO DE ÁCIDO GÁSTRICO

Na rotina clínica, pacientes com ulcerações gástrica são tratados com substâncias antiácidas como silicato de alumínio, hidróxido de magnésio, antagonistas de receptor de histamina-2 ( $H_2$ ) ou inibidores de bomba protônica (*proton pump inhibitors* – PPI), visando neutralizar ou reduzir a secreção ácida (FELLENIOUS *et al.*, 1981).

Os inibidores de bomba protônica, membros da classe dos benzimidazoles, suprimem a secreção de ácido gástrico por inibirem especificamente o sistema enzimático  $H^+,K^+$  - ATPase (adenosina trifosfatase), inibindo fortemente a liberação de  $H^+$  na superfície secretora das células parietais gástricas (FELLENIOUS *et al.*, 1981). Já os antagonistas de receptores  $H_2$  impedem a ação do mediador fisiológico histamina em receptores presentes na membrana basolateral das células parietais, que são ligados à proteína G. A ativação deste receptor promove ativação de mecanismos intracelulares que culminam com aumento dos níveis de AMP cíclico, que por sua vez, ativa proteína quinases, resultando na geração de íons hidrogênio (LICHTENSTEIN & WOLFE, 1993). Os antagonistas  $H_2$  e os PPIs, em especial, promovem benefícios significativos no quadro de úlceras devido às suas funções de inibir a secreção ácida, entretanto, os PPIs parecem ser mais efetivos na cicatrização das úlceras quando comparados com os antagonistas  $H_2$  (WANDALL, 1992).

## 1. INTRODUÇÃO

---

OHARA e ARAKAWA (1999) e KAWAMURA *et al.* (2000) demonstraram que além de inibir a secreção ácida, os antagonistas H<sub>2</sub> parecem ser capazes de diminuir o número de leucócitos circulantes no sangue, reduzindo o fluxo de células da medula óssea para o sangue e deste para a mucosa gástrica.

Alguns estudos têm sugerido que os inibidores de bomba protônica são capazes de inibir inúmeras funções neutrofílicas *in vitro*, tais como, a quimiotaxia, a produção de superóxido, a desgranulação (WANDALL, 1992; RITTER *et al.*, 1998; CAPODICASA *et al.*, 1999), a fagocitose, a acidificação de fagolisossomas (AGASTYA *et al.*, 2000), bem como a expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, a adesão estimulada por IL-1 $\beta$  e por extrato aquoso de *H. pylori* (YOSHIDA *et al.*, 2000). Inibem também a atividade citotóxica de células *natural killer* (CAPODICASA *et al.*, 1999) e a expressão de moléculas de adesão em células mononucleares humanas *in vitro* (OHARA e ARAKAWA, 1999). Estas ações, caracterizadas em ensaios *in vitro*, fornecem evidências de que drogas como os antagonistas H<sub>2</sub> e os PPIs possuem propriedades antiinflamatórias/imunossupressivas adicionais (YOSHIDA *et al.*, 2000).

Há relatos de que a administração oral de omeprazol, durante 7 dias, a voluntários sadios, promove uma redução da capacidade de geração de radicais livres por neutrófilos (SUZUKI *et al.*, 1996) e há um caso descrito de leucopenia severa após tratamento com omeprazol (ODOU *et al.*, 1999).

Utilizando um sistema de microscopia intravital SUZUKI *et al.* (1999) demonstraram que o omeprazol foi capaz de inibir a adesão de neutrófilos induzida por extrato aquoso de *H. pylori* em vênulas mesentéricas de ratos.

## 1. INTRODUÇÃO

---

STYRT e KLEMPNER (1982) mostraram que a alcalinização de lisossomas interfere na fusão de vesículas citoplasmáticas, inibindo também a ativação da NADPH oxidase. A expressão de moléculas de adesão na superfície celular parece ser dependente de um processo de fusão de grânulos citoplasmáticos, embora o mecanismo exato pelo qual os PPIs inibem a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos permanece inexplicado (YOSHIDA *et al.*, 2000).

A estimulação de neutrófilos por fMLP e outros quimiotáticos como PAF, PMA e LTB<sub>4</sub>, promove a formação de íons H<sup>+</sup> pela ativação da NADPH oxidase. A oxidação do NADPH para NADP<sup>+</sup> resulta no aumento da concentração de H<sup>+</sup> e concomitantemente a queda do pH<sub>i</sub> e a despolarização da membrana celular (NANDA e GRINSTEIN, 1991). Essas alterações são prontamente corrigidas através do transporte de prótons pela membrana, que ocorre por três mecanismos distintos e bem descritos na literatura, sendo eles, a ativação dos trocadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (GRINSTEIN *et al.*, 1986), a ativação das H<sup>+</sup>-ATPases vacuolares (NANDA *et al.*, 1996 ; SUZUKI *et al.*, 1996) e pelos canais de H<sup>+</sup> metais sensíveis (LUKACS *et al.*, 1993).

RITTER *et al.* (1998), através de experimentos de imunoblot, verificaram que a incubação de lisados de neutrófilos e de mucosa gástrica com o anticorpo monoclonal da β-subunidade da H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - ATPase detectava a presença da proteína em ambos os lisados, sugerindo a existência de uma H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - ATPase nos neutrófilos, que também teria importante participação como trocadora de H<sup>+</sup>. Dessa forma, tanto a quimiotaxia quanto outros eventos de ativação de neutrófilos dependeriam desses trocadores H<sup>+</sup>, os quais, possivelmente seriam inibidos pelos PPIs.

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.4. MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO NA BOLSA DE AR EM RATOS

Relatos sobre a capacidade do *H. pylori* induzir inflamação são restritos, na sua maioria, à análise de biópsias de pacientes, bem como a aspectos da interação, *in vitro*, entre leucócitos e *H. pylori* (KONTUREK *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, diversos modelos animais têm sido utilizados para o estudo da fisiopatologia e terapia das infecções causadas pelo *H. pylori*. Entre eles macacos, gatos, cães, e várias espécies de roedores, incluindo camundongo, rato, gerbil e porco da Índia. Camundongos geneticamente modificados também têm sido utilizados em alguns estudos (NEDRUD, 1999).

Diversos trabalhos relatam a infecção por diferentes espécies de *Helicobacter*, como *H. mustelae*, *H. felis* e *H. heilmannii*, nas espécies anteriormente citadas. Entretanto, o processo não mimetiza o que acontece no homem, pois essas espécies geralmente não expressam os mesmos fatores de virulência (*vacA*, *cagA* ou *iceA*, citotoxinas, etc) necessários para a inflamação da mucosa e formação de úlcera gástrica. Além disso, algumas dessas espécies apresentam dificuldades em relação à sua manutenção em biotérios (KONTUREK *et al.*, 2000).

A administração de suspensão de *H. pylori* ou de seus produtos através da via oral a ratos promove apoptose celular em estômagos previamente ulcerados e retarda a cicatrização das ulcerações, mas poucas bactérias ou nenhuma permanecem aderidas à camada mucosa ou à superfície epitelial mostrando a ausência de colonização (KONTUREK *et al.*, 2000). Já o mesmo procedimento em camundongos tem mostrado

## 1. INTRODUÇÃO

---

que algumas linhagens de *H. pylori* (p.ex. SS1 e SPM326) podem colonizar particularmente camundongos C57BL/6, promovendo respostas inflamatórias com a participação de neutrófilos (Van DOORN *et al.*, 1999)

O modelo experimental de bolsa de ar (air pouch model) inicialmente descrito por SEYLE (1953), tem sido amplamente utilizado na investigação do processo inflamatório induzido por uma variedade de estímulos, como o zimozan (KONNO e TSURUFUJI, 1983), carboximetil celulose (ISHIKAWA *et al.*, 1968), adjuvante de Freund (OHUCHI *et al.*, 1982), fragmentos de parede celular, toxinas bacterianas (CLARK e WEINHOLD 1979; YOSHINO *et al.*, 1985; TESSIER *et al.*, 1998; KON *et al.*, 1999) e carragenina (FUKUHARA e TSURUFUJI, 1969). Nesse modelo, uma cavidade artificial é formada e diferentes parâmetros do processo inflamatório podem ser monitorados, como a formação de exsudato, influxo de leucócitos e acúmulo de mediadores do processo inflamatório, permitindo a observação da cinética do processo inflamatório induzido na cavidade. O modelo de bolsa de ar tem sido extensivamente empregado em estudos que objetivam avaliar a atividade antiinflamatória de diversos compostos (FORREST *et al.*, 1988).



## **2. OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

---

- Caracterizar o modelo de inflamação induzida por *H. pylori* na bolsa de ar em ratos, avaliando a influência dos fatores de virulência, bem como o padrão de citocinas e mediadores lipídicos formados;
- Avaliar a possível atividade antiinflamatória de inibidores de secreção ácida, através da observação da resposta inflamatória na bolsa de ar em ratos induzida por carragenina e por *H. pylori*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 180-220g, adquiridos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas coletivas, em número de cinco (5) animais por unidade e mantidos no Biotério da Universidade São Francisco (USF), com ciclos artificiais de 12 horas claro/escuro. Os ratos se serviram *ad libitum* de água e ração.

Os experimentos foram executados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

#### 3.2. CULTURA DO *Helicobacter pylori*

O fornecimento das culturas, bem como a caracterização dos fatores de virulência foram realizados pelo Prof. Dr. Sérgio de Mendonça e Prof. Dr. Marcelo Ribeiro de Lima – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – UNIFAG/USF.

Os isolados clínicos de *H. pylori* foram obtidos de pacientes com dispepsia não ulcerosa (DNU) ou úlcera peptica (UP) e armazenados no banco de linhagens da UNIFAG. As linhagens estocadas foram reativadas segundo o protocolo descrito por MENDONÇA *et al.* (2000). O inóculo foi feito em placas de Petri com meio seletivo contendo infusão de coração e cérebro (BHI - Brain heart infusion), sangue de carneiro a 10%, vancomicina (10 mg/l), ácido nalidíxico (20 mg/l), anfotericina B (10 mg/l), cloreto de trifetil tetrazolium (40 mg/l). As placas foram incubadas a 37°C em condições microaerofílicas (5-6% O<sub>2</sub>, 8-10% CO<sub>2</sub>, 80-85% N<sub>2</sub>), com 98% de umidade

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

relativa, durante um período de 3-7 dias.

A morfologia das bactérias obtidas das cultura foi observada ao microscópio óptico após coloração de Gram, e as amostras que apresentaram forma característica de *H. pylori* foram confirmadas pela produção de urease, catalase e oxidase e pela amplificação dos genes específicos *glmM* (BICKLEY *et al.*, 1993) e 16s rRNA (HO *et al.*, 1991).

As linhagens identificadas como *H. pylori* foram transferidas para meio de cultura líquido (BHI, soro fetal bovino a 10%, 10 mg/ de anfotericina B) e incubadas por 3 a 5 dias a 37°C em condições microaerofílicas no Orbital Shaker a 50 rpm ou coletadas das placas com auxílio de um swab e transferidas para tubos contendo 1 ml de PBS. A concentração de bactérias tanto no meio líquido quanto em PBS foi ajustada através da escala nefelométrica de McFarland onde a concentração de bactéria é determinada pela turvação do meio líquido.

Os fatores de virulência da bactéria foram determinados através da amplificação dos genes *vacA* (s1, s2 e m1, m2), *cagA*, *cagE* e HP-NAP pela reação em cadeia da polimerase (PCR- Polimerase chain reactions) em termociclador. O DNA foi extraído com DNAzol®.

#### 3.3. MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO NA BOLSA DE AR EM RATOS

Os ratos foram transitoriamente anestesiados com halotano e a bolsa de ar foi produzida na região dorsal dos animais conforme descrito por MARTIN *et al.* (1994). No dia 0 (zero), 20 ml de ar estéril foi injetado subcutaneamente no dorso dos animais. No

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

dia 3, as bolsas de ar foram novamente infladas, com 10 ml de ar estéril. No dia 6 foi injetado, dentro da bolsa de ar, 2 ml do estímulo inflamatório.

Após percorrido o tempo determinado para a observação da resposta inflamatória, os ratos foram novamente anestesiados com halotano e a bolsa de ar foi cuidadosamente aberta por uma pequena incisão. O exsudato formado foi coletado e seu volume determinado por gravimetria. A contagem de leucócitos total foi realizada em contador automático de células e a contagem diferencial de leucócitos foi feita no microscópio óptico em lâmina preparada em citocentrifuga e corada com May-Grunwald-Giemsa. Alíquotas do exsudato foram estocadas em freezer -20°C para subsequente quantificação de mediadores inflamatórios.

Amostras de sangue periférico foram coletadas pela veia abdominal e transferidas para tubos de vidro contendo EDTA. A contagem de leucócitos total foi realizada em contador automático de células. E a contagem diferencial de leucócitos foi feita no microscópio óptico em lâminas de esfregaço coradas com May-Grunwald-Giemsa. Em seguida os tubos foram centrifugados (1000 g, 10 min) e alíquotas de plasma armazenadas para posterior determinação dos níveis de mediadores inflamatórios.

Os ratos foram sacrificados logo após a coleta do sangue pelo aprofundamento da anestesia.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **3.4. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO *Helicobacter pylori***

A presença e a cinética da resposta inflamatória induzida pelo *H. pylori* foi determinada através da inoculação na bolsa de ar de 2 ml de meio de cultura líquido contendo um pool das linhagens 109 e 551 (Tabela 1) de *H. pylori*. O grupo controle recebeu somente meio de cultura líquido. Após 1, 6, 12 e 24 horas da administração dos estímulos, os ratos foram submetidos ao procedimento descrito no item 3.3.

#### **3.5. REALIZAÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA INDUZIDA PELO *Helicobacter pylori***

A curva de concentração-resposta de *H. pylori* foi obtida pela inoculação de 2ml de suspensão, da linhagem 551, contendo 3, 6 ou  $18 \times 10^8$  bactéria na bolsa de ar. Após 6 horas da administração dos estímulos, os ratos foram submetidos ao procedimento descrito no item 3.3.

#### **3.6 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM FUNÇÃO DA VIABILIDADE BACTERIANA**

A viabilidade bacteriana foi testada através da inoculação de 2 ml de suspensão contendo  $6 \times 10^8$  bactéria da linhagem 551 após tratamento térmico a temperatura de 100°C, durante 15 minutos e posteriormente injetadas na bolsa de ar. O grupo controle recebeu bactérias sem tratamento térmico. Após 6 horas da administração dos estímulos, os ratos foram submetidos ao procedimento descrito no item 3.3.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.7. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR DIFERENTES LINHAGENS DE *Helicobacter pylori*

Para verificar se os fatores de virulência interferiram na resposta inflamatória, 2 ml de suspensão contendo  $3 \times 10^8$  bactéria de diferentes linhagens de *H. pylori* foram inoculados na bolsa de ar. As características genóticas das linhagens estão descritas na tabela 1. Após 6 horas da administração dos estímulos, os ratos foram submetidos ao procedimento descrito no ítem 3.3.

**Tabela 1.** Relação das linhagens utilizadas e suas diferenças genóticas.

Linhagem	Origem*	Genótipo			
		HP-NAP	cagE	cagA	vacA
219	UP	+	+	-	s2m2
551	UP	+	+	+	s1m2
320	UP	+	+	+	s1m1
109	DNU	+	+	+	s2m2

\*DNU: Dispepsia não ulcerosa; UP: Úlcera peptica.

#### 3.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PGE<sub>2</sub> E CITOCINAS (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ )

A determinação dos níveis de PGE<sub>2</sub> e citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) no exsudato foi realizada nos grupos que receberam 2 ml de suspensão contendo  $3 \times 10^8$  bactéria das linhagens 551, 320 e 109. Nesses grupos também foi determinado os níveis de citocinas plasmáticas. A quantificação foi realizada através de kit comercial de ELISA (Amersham Biosciences, UK).



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA DOS INIBIDORES DE SECREÇÃO ÁCIDA

Para avaliar a atividade anti-secretora dos inibidores de secreção ácida os ratos foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com os inibidores de bomba protônica (pantoprazol, omeprazol, lansoprazol), antagonista dos receptores  $H_2$  (cimetidina) ou com o veículo dimetilsulfóxido (DMSO, 1:10, v/v). Após 30 minutos da administração das drogas os ratos foram anestesiados com Tiopental (40 mg/kg) e realizou-se uma incisão abdominal com posterior exposição da região pilórica. O piloro foi amarrado e em seguida os animais foram suturados adequadamente. Após 4 horas do procedimento cirúrgico, os animais foram novamente anestesiados e a região esofágica exposta e amarrada. Posteriormente, o estômago foi retirado e o conteúdo presente em seu interior coletado. A acidez foi determinada através da titulação contra NaOH 0,01 M até pH 7,0.

#### 3.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS INIBIDORES DE SECREÇÃO ÁCIDA NA INFLAMAÇÃO

Os ratos foram previamente tratados por 7 ou 28 dias com pantoprazol, cimetidina ou veículos pela via intraperitoneal. Grupos tratados por 7 dias foram realizados para o omeprazol e lansoprazol. Para o controle da atividade antiinflamatória o tratamento foi realizado com a dexametasona, um potente antiinflamatório. Nesses ratos, bolsas de ar foram produzidas na região dorsal conforme descrito no ítem 3.3 onde carragenina (2 ml; solução a 1% em PBS estéril) ou *H. pylori* (2 ml de  $12 \times 10^8$  bactérias da linhagem 551) foram utilizados como estímulo inflamatório. Um grupo

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

recebeu somente 2 ml de PBS na bolsa de ar (controle). Após 6 horas da administração dos estímulos, os ratos foram submetidos ao procedimento descrito no ítem 3.3.

#### **3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média acompanhada pelo respectivo erro padrão da média (EPM) de  $n$  experimentos realizados. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), teste  $t$  de Student não-pareado ou teste de Duncan para comparações múltiplas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## **4. RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

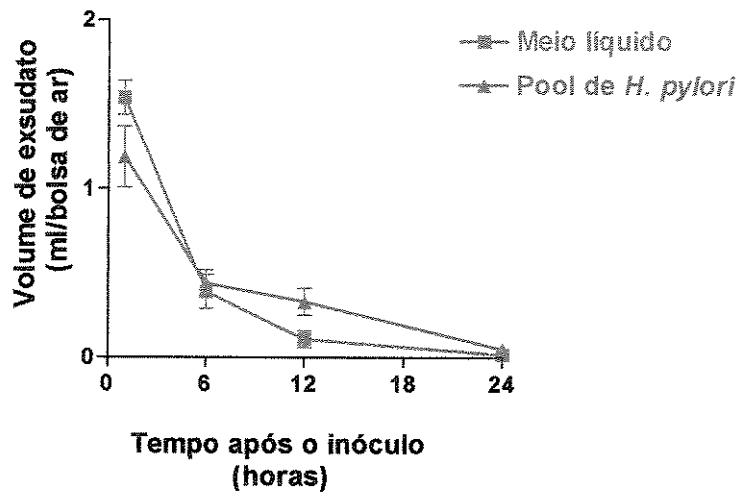
---

### 4.1. CINÉTICA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO *Helicobacter pylori* NA BOLSA DE AR

O volume de exsudato coletado das bolsas de ar em diferentes tempos após o inóculo de *H. pylori* (pool das linhagens 109 e 551) não foi significativamente diferentes do grupo controle (Figura 1). A inoculação de *H. pylori* dentro das bolsas de ar resultou em grande acúmulo de leucócitos após 6 horas e 12 horas comparado com o que foi encontrado no meio líquido (\*\* $p < 0,01$ ; Figura 2A). O número de leucócitos retornou para níveis basais após 24 h. Após 1, 6 e 12 h, houve um aumento significativo no número de neutrófilos quando comparado com o grupo controle (\*\* $p < 0,01$ ; Tabela 2). O número de leucócitos presentes no sangue periférico dos animais inoculados com cultura líquida contendo *H. pylori* não diferiu do encontrado no grupo controle (Figura 2B).

## 4. RESULTADOS

---



**Figura 1.** Volume de exsudato coletado da bolsa de ar 1, 6, 12 e 24 horas após a inoculação de *H. pylori* ou meio líquido (grupo controle). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5).

## 4. RESULTADOS

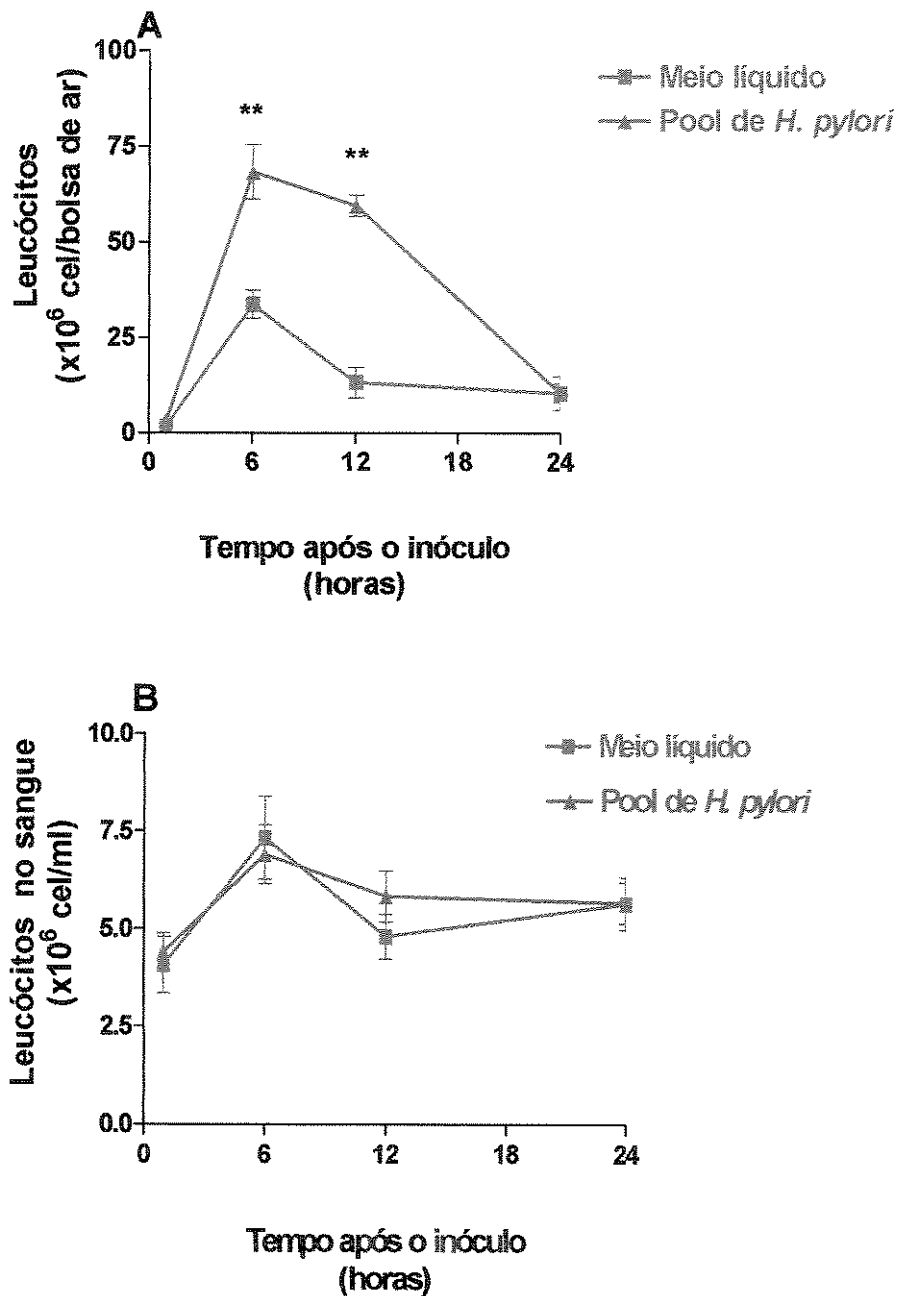


Figura 2. Contagem de leucócitos totais encontradas no exsudato coletado na bolsa de ar (A) e no sangue periférico (B) 1, 6, 12 e 24 horas após a inoculação de *H. pylori* ou meio líquido. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5).\*\*p<0,01 comparando com o controle (meio líquido).

#### 4. RESULTADOS

**Tabela 2.** Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar após 1, 6, 12 e 24 horas do inóculo de *H. pylori* ou meio líquido. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5) dos valores totais. \*\*p<0,01 comparando com o controle (meio líquido).

Tempo (h)	Meio líquido (controle)			Pool de <i>Helicobacter pylori</i>		
	Neutrófilos (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	Eosinófilos (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	Mononucleares (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	Neutrófilos (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	Eosinófilos (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	Mononucleares (x10 <sup>6</sup> /bolsa)
1	0,42 $\pm$ 0,10	0,13 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,10	1,62 $\pm$ 0,22**	0,29 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,17
6	26,65 $\pm$ 2,88	0,54 $\pm$ 0,29	6,81 $\pm$ 1,03	44,56 $\pm$ 3,60**	0,22 $\pm$ 0,14	17,62 $\pm$ 2,91
12	6,57 $\pm$ 1,85	0,40 $\pm$ 0,13	4,47 $\pm$ 0,51	37,73 $\pm$ 7,64**	0,79 $\pm$ 0,37	20,94 $\pm$ 9,78
24	5,08 $\pm$ 2,24	0,31 $\pm$ 0,18	5,10 $\pm$ 1,96	7,14 $\pm$ 1,68	0,12 $\pm$ 0,03	3,16 $\pm$ 0,69

## 4. RESULTADOS

---

### 4.2. RESPOSTA INFLAMATÓRIA OBSERVADA APÓS A INOCULAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Helicobacter pylori*

Quando as respostas dos grupos controle PBS e meio líquido foram comparadas verificou-se um aumento no número de leucócitos encontrados na bolsa estimulada com meio líquido. Dessa forma nos experimentos seguintes as bactérias foram obtidas de meio de cultura sólido e coletadas em PBS.

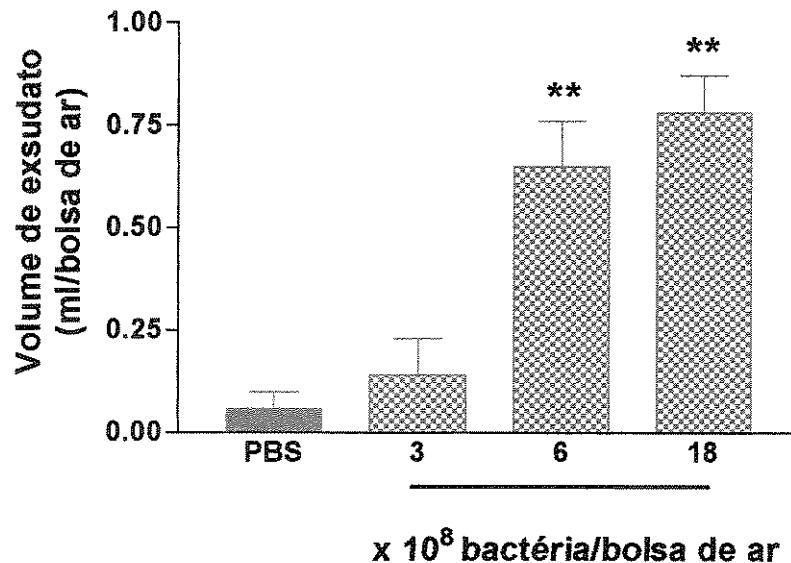
A inoculação de suspensão de *H. pylori* contendo diferentes concentrações de bactérias ( $3 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$  ou  $18 \times 10^8$  bactéria/bolsa) causaram o aumento do volume de exsudato formado (\*\* $p < 0,01$ ; Figura 3).

Um aumento na migração de células inflamatórias para a bolsa de ar também foi observado após o inóculo da suspensão de *H. pylori* em PBS. Esta resposta mostrou-se dependente da concentração de bactéria inoculada (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ; Figura 4). Neutrófilos foram as células inflamatórias predominantemente encontradas nas bolsas de ar em resposta à suspensão de *H. pylori* 551 (\*\* $p < 0,01$ ). Nos grupos onde foram inoculadas as maiores concentrações de bactéria, verificou-se significativa migração de eosinófilos e células mononucleares, juntamente com neutrófilos (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ; Tabela 3).



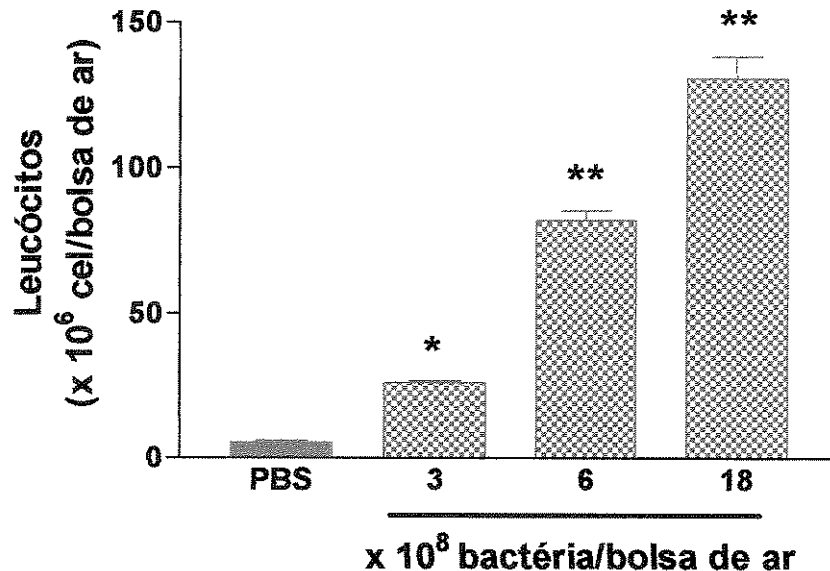
## 4. RESULTADOS

---



**Figura 3.** Volume de exsudato coletado 6 horas após a inoculação de diferentes concentrações (3-18 x10<sup>8</sup> bactéria/bolsa) de suspensão de *H. pylori* ou PBS (grupo controle) na bolsa de ar em ratos. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=5). \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).

## 4. RESULTADOS



**Figura 4.** Número de leucócitos encontrados 6 horas após a inoculação de diferentes concentrações (3-18 x10<sup>8</sup> bactéria/bolsa) de suspensão de *H. pylori* ou PBS (grupo controle) na bolsa de ar em ratos. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=5). \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).

#### 4. RESULTADOS

---

**Tabela 3.** Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar 6 horas após a administração de suspensão de *H. pylori* ou PBS. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).

Células (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	PBS	Suspensão de <i>Helicobacter pylori</i> (x 10 <sup>8</sup> bactéria)		
		3	6	18
<b>Neutrófilos</b>	2,53 $\pm$ 0,39	34,96 $\pm$ 5,21**	72,46 $\pm$ 2,91**	114,47 $\pm$ 4,81**
<b>Eosinófilos</b>	0,31 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,15	1,68 $\pm$ 0,38**
<b>Mononucleares</b>	2,88 $\pm$ 0,49	5,76 $\pm$ 0,94	8,43 $\pm$ 0,30*	14,67 $\pm$ 1,74**

## 4. RESULTADOS

---

### 4.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA OBSERVADA APÓS A INOCULAÇÃO DE BACTÉRIA FERVIDA

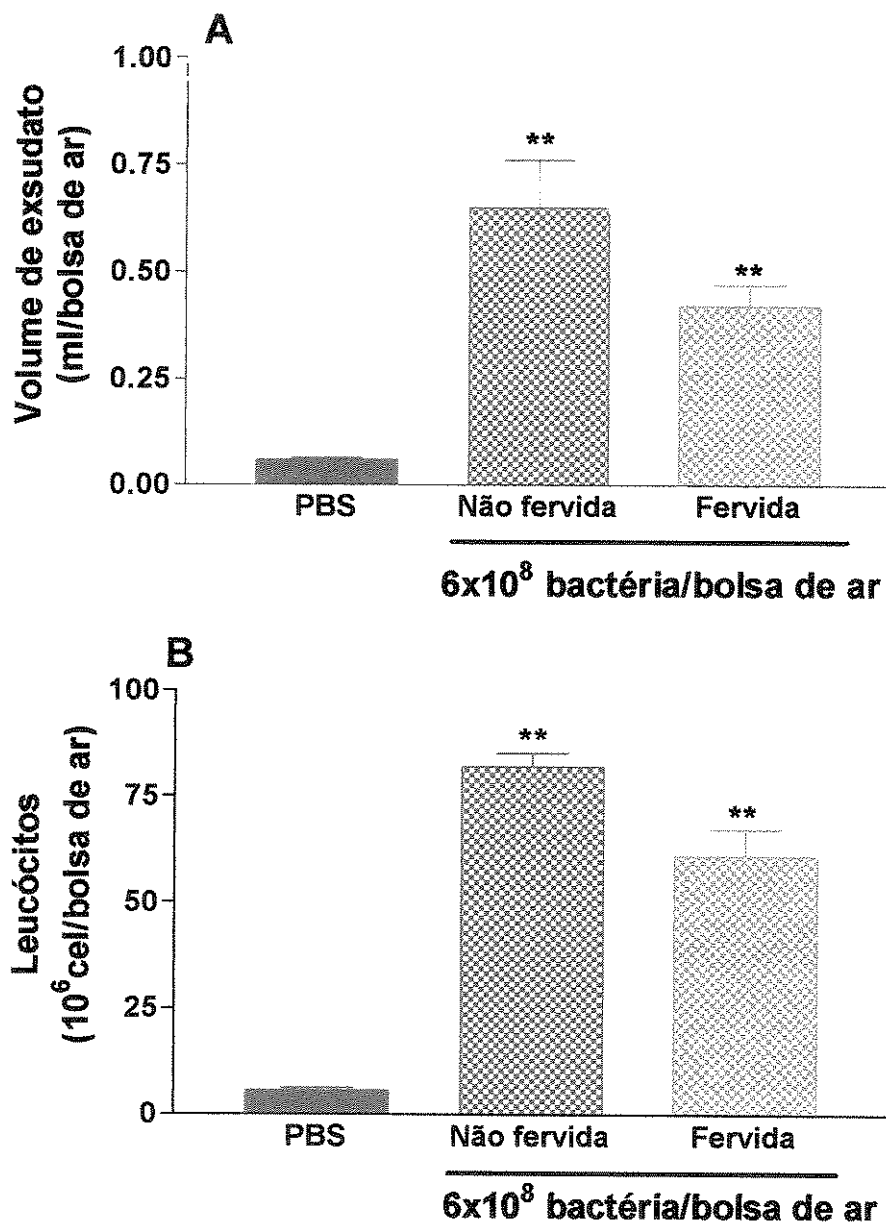
A inoculação de suspensão de *H. pylori* fervida também induziu infiltrado de células, em sua maioria neutrófilos (Tabela 4), bem como aumento do volume de exsudato. Entretanto, este aumento não foi significativamente diferente quando comparado com bactérias vivas (Figura 5).

#### 4. RESULTADOS

**Tabela 4.** Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar 6 horas após a administração de suspensão de *H. pylori* não fervida ou fervida. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).

Células (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	PBS	Suspensão de <i>Helicobacter pylori</i> (6 x 10 <sup>8</sup> bactéria)	
		Não fervida	Fervida
<b>Neutrófilos</b>	2,53 $\pm$ 0,39	72,46 $\pm$ 2,91**	51,62 $\pm$ 6,36**
<b>Eosinófilos</b>	0,31 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,15**	0,14 $\pm$ 0,14
<b>Mononucleares</b>	2,88 $\pm$ 0,49	8,43 $\pm$ 0,30*	9,28 $\pm$ 1,98

## 4. RESULTADOS



**Figura 5.** Volume de exsudato (A) e número de leucócitos (B) coletados na bolsa de ar de ratos 6 horas após a inoculação de suspensão de *H. pylori* não fervida ou fervida. Não houve diferença significativa entre os grupos de *H. pylori*. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).

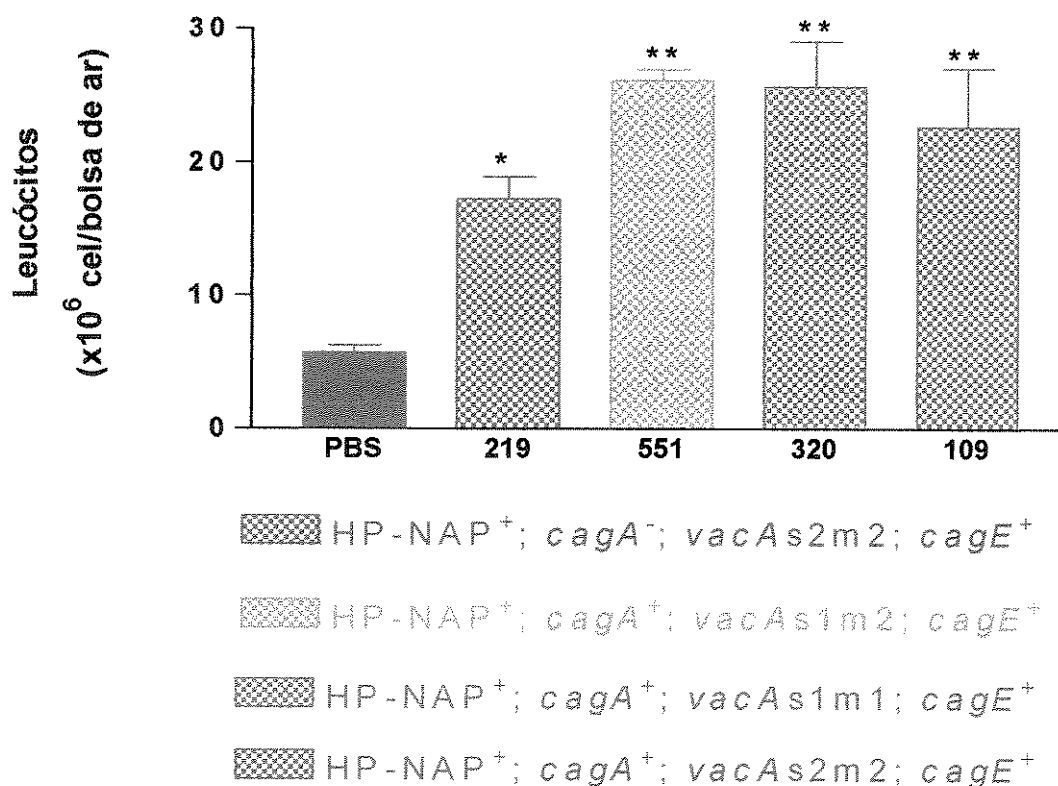
## 4. RESULTADOS

---

### 4.4. RESPOSTA INFLAMATÓRIA OBSERVADA APÓS A INOCULAÇÃO DE DIFERENTES LINHAGENS DE *Helicobacter pylori*

A inoculação de 2 ml de suspensão contendo  $3 \times 10^8$  bactéria de diferentes linhagens de *H. pylori* em PBS nas bolsas de ar induziu a migração de células (\*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ; Figura 6) independente das características genotípicas (cagA, vacA, cagE ou HP-NAP) de cada linhagem (Tabela 1). Novamente houve um predomínio de neutrófilos (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ; Tabela 5).

#### 4. RESULTADOS



**Figura 6.** Número de leucócitos 6 horas após a inoculação de diferentes linhagens de *H. pylori* ou PBS (grupo controle) na bolsa de ar em ratos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).



#### 4. RESULTADOS

**Tabela 5.** Contagem diferencial de leucócitos presentes no exsudato coletado na bolsa de ar 6 horas após o inóculo de diferentes linhagens de *H. pylori* ou PBS. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).

Células (x10 <sup>6</sup> /bolsa)	PBS	Linhagens de <i>Helicobacter pylori</i> (3 x 10 <sup>8</sup> bactéria/bolsa de ar)			
		219	551	320	109
<b>Neutrófilos</b>	2,53 $\pm$ 0,39	14,49 $\pm$ 1,05*	18,86 $\pm$ 3,23**	22,35 $\pm$ 3,01**	14,91 $\pm$ 2,16**
<b>Eosinófilos</b>	0,31 $\pm$ 0,09	0,12 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,04
<b>Mononucleares</b>	2,88 $\pm$ 0,49	4,65 $\pm$ 0,77	2,64 $\pm$ 0,43	3,12 $\pm$ 0,72	2,08 $\pm$ 0,38

## 4. RESULTADOS

---

### 4.5. NÍVEIS DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$ NO EXSUDATO

Observou-se um aumento significativo nos níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> presente nas amostras de exsudato coletadas 6 horas após o inóculo da suspensão de *H. pylori* (\*\*p<0,01) quando comparado com o grupo controle (PBS). Os níveis de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  também foram maiores nestes grupos quando comparados ao controle (\*\*p<0,001; Tabela 6). Entretanto, a presença destas citocinas não foi detectada no plasma dos animais de ambos os grupos, controle e suspensão de *H. pylori* (resultado não mostrado).

#### 4. RESULTADOS

---

**Tabela 6.** Níveis de PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (pg/ml) encontrados no exsudato coletado 6 horas após a administração de suspensão *H. pylori* na concentração de 3 x 10<sup>8</sup> bacteria/bolsa de ar. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*<0,01 e \*\*\* p<0,001 comparando com o controle (PBS).

	<b>PBS</b>	<b>Suspensão de <i>Helicobacter pylori</i></b>
<b>IL-1<math>\beta</math> pg/mL</b>	597 $\pm$ 98 (n=4)	6340 $\pm$ 270*** (n=8)
<b>TNF-<math>\alpha</math> pg/mL</b>	0 (n=4)	199 $\pm$ 37*** (n=6)
<b>PGE<sub>2</sub> pg/mL</b>	75 $\pm$ 5 (n=5)	334 $\pm$ 61** (n=5)

## 4. RESULTADOS

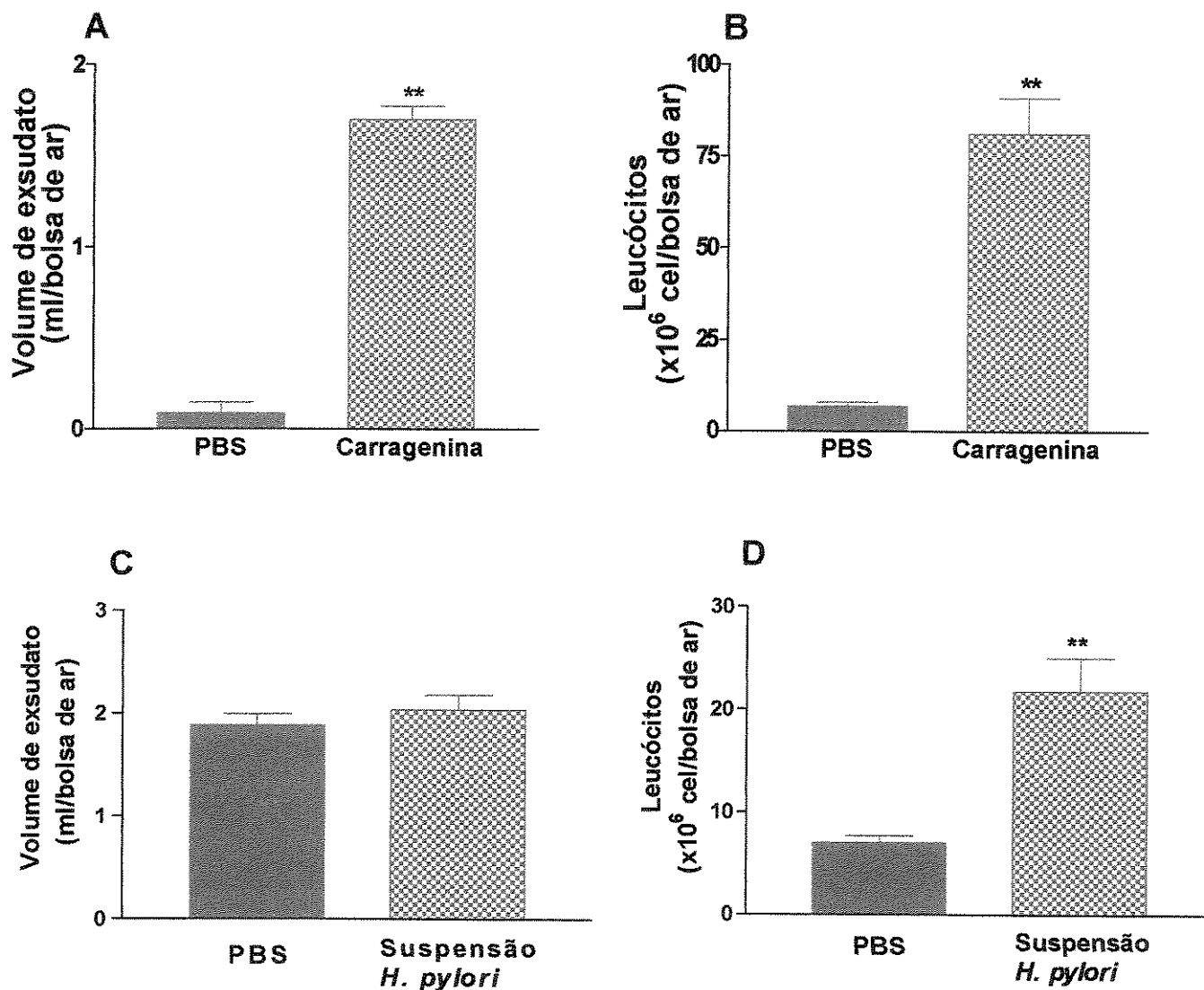
---

### 4.6. CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR CARRAGENINA E *Helicobacter pylori* NA BOLSA DE AR EM RATOS

A administração de carragenina na bolsa de ar em ratos resultou em significativa formação de exsudato e migração de leucócitos para a bolsa quando comparado a administração de PBS (\*\* $p < 0,01$ ; Figura 7A e B). A contagem diferencial das células migradas para a cavidade após a administração de carragenina revelou que neutrófilos constituíram o tipo celular predominante após 6 horas (\*\* $p < 0,01$ ; Tabela 7).

Após a administração de suspensão de *H. pylori* ( $12 \times 10^8$  bactéria/bolsa de ar) não se observou a formação de exsudato, somente uma significativa migração de leucócitos (\*\* $p < 0,01$ ; Figura 7D). A análise das células migradas em resposta à administração de *H. pylori* revelou que neutrófilos constituíram o principal tipo celular presente (\*\* $p < 0,01$ ; Tabela 8).

## 4. RESULTADOS



**Figura 7.** Volume de exsudato e número de leucócitos coletados na bolsa de ar de ratos 6 horas após a inoculação de carragenina (A e B) ou *H. pylori* (C e D). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*p<0,01 comparando com o controle (PBS).

#### 4. RESULTADOS

---

**Tabela 7.** Contagem diferencial de leucócitos presentes na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de 20 mg de carragenina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  comparando com o controle (PBS).

	<b>Neutrófilos</b>	<b>Eosinófilos</b>	<b>Mononucleares</b>
	(x 10 <sup>6</sup> /bolsa)	(x 10 <sup>6</sup> /bolsa)	(x 10 <sup>6</sup> /bolsa)
<b>PBS</b>	4,19 $\pm$ 0,87	0,29 $\pm$ 0,14	1,89 $\pm$ 0,46
<b>Carragenina</b>	69,74 $\pm$ 7,28**	0,24 $\pm$ 0,08	11,10 $\pm$ 4,98**

**Tabela 8.** Contagem diferencial de leucócitos presentes na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de *H. pylori* (12x10<sup>8</sup> bactéria/bolsa de ar). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\* $p < 0,01$  comparando com o controle (PBS).

	<b>Neutrófilos</b>	<b>Eosinófilos</b>	<b>Mononucleares</b>
	(x 10 <sup>6</sup> /bolsa)	(x 10 <sup>6</sup> /bolsa)	(x 10 <sup>6</sup> /bolsa)
<b>PBS</b>	2,53 $\pm$ 0,39	0,31 $\pm$ 0,09	2,88 $\pm$ 0,99
<b>Suspensão de <i>Helicobacter pylori</i></b>	114,47 $\pm$ 4,81**	1,68 $\pm$ 0,38**	14,67 $\pm$ 1,74**

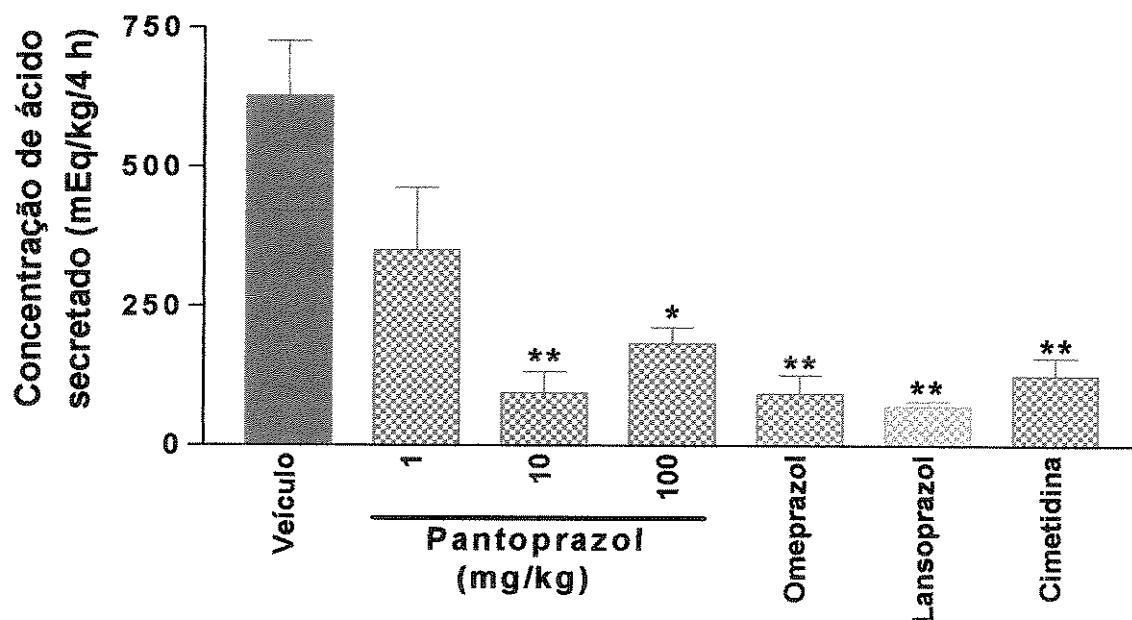
## 4. RESULTADOS

---

### 4.7. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA DOS INIBIDORES DE BOMBA PROTÔNICA

A administração de 10 e 100 mg/kg de pantoprazol resultou em uma redução significativa do conteúdo de ácido gástrico coletado após 4 horas da realização da ligadura do piloro (Figura 8; \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , respectivamente). Doses de 100 mg/kg de omeprazol e lansoprazol também produziram reduções significativas no conteúdo de ácido gástrico (\*\* $p < 0,01$ ). A cimetidina (100 mg/kg) foi utilizada comparativamente por sua ação anti-secretora e também foi eficiente na redução da secreção basal de ácido gástrico (\*\* $p < 0,01$ ). As doses que inibiram a secreção gástrica foram utilizadas nos experimentos subseqüentes.

## 4. RESULTADOS



**Figura 8.** Efeito do pantoprazol (1, 10 e 100 mg/kg), omeprazol (100 mg/kg), lansoprazol (100 mg/kg) e cimetidina 100 (mg/kg) administrados i.p. sobre a secreção basal de ácido gástrico após ligadura de piloro em ratos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=4). \*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparando com o controle (DMSO).



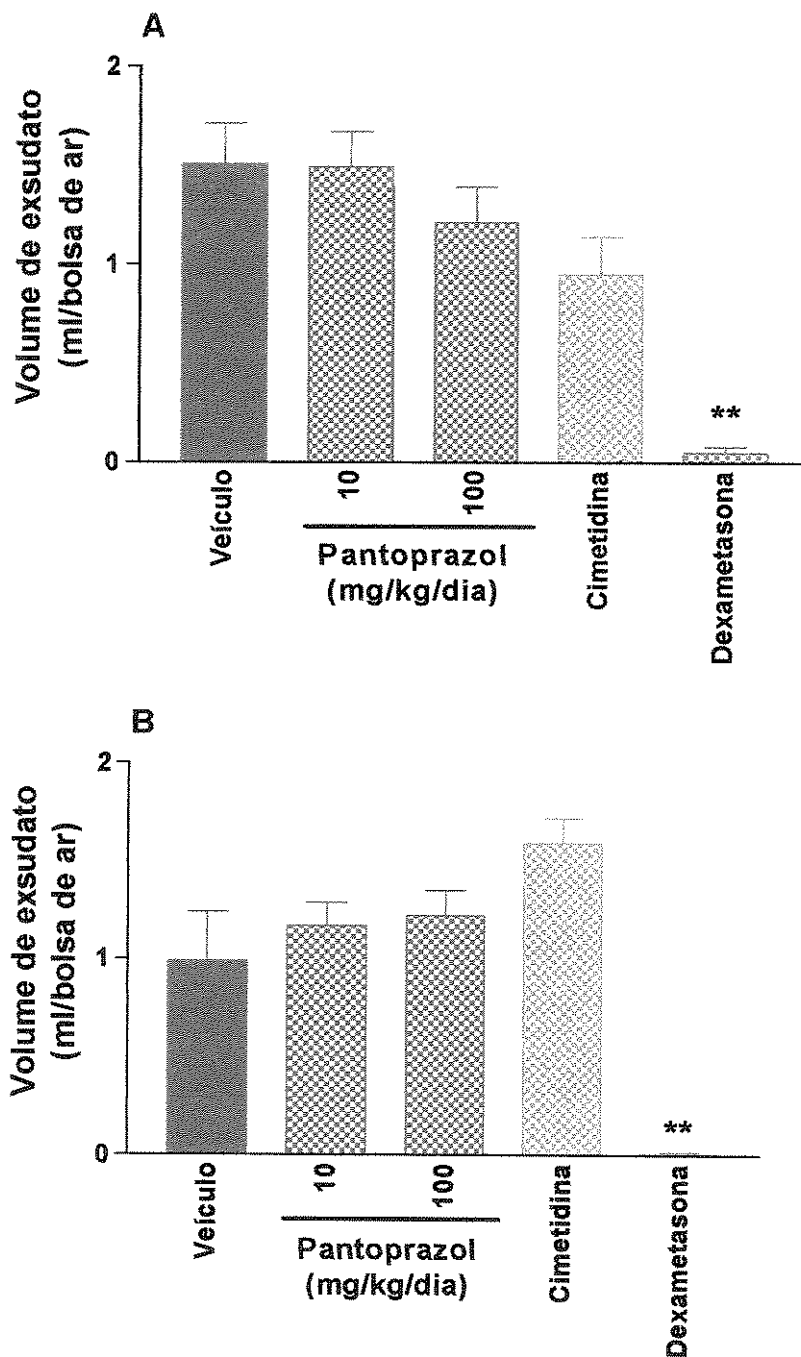
## 4. RESULTADOS

---

### 4.8. EFEITOS DOS INIBIDORES DE BOMBA PROTÔNICA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR CARRAGENINA E *Helicobacter pylori*

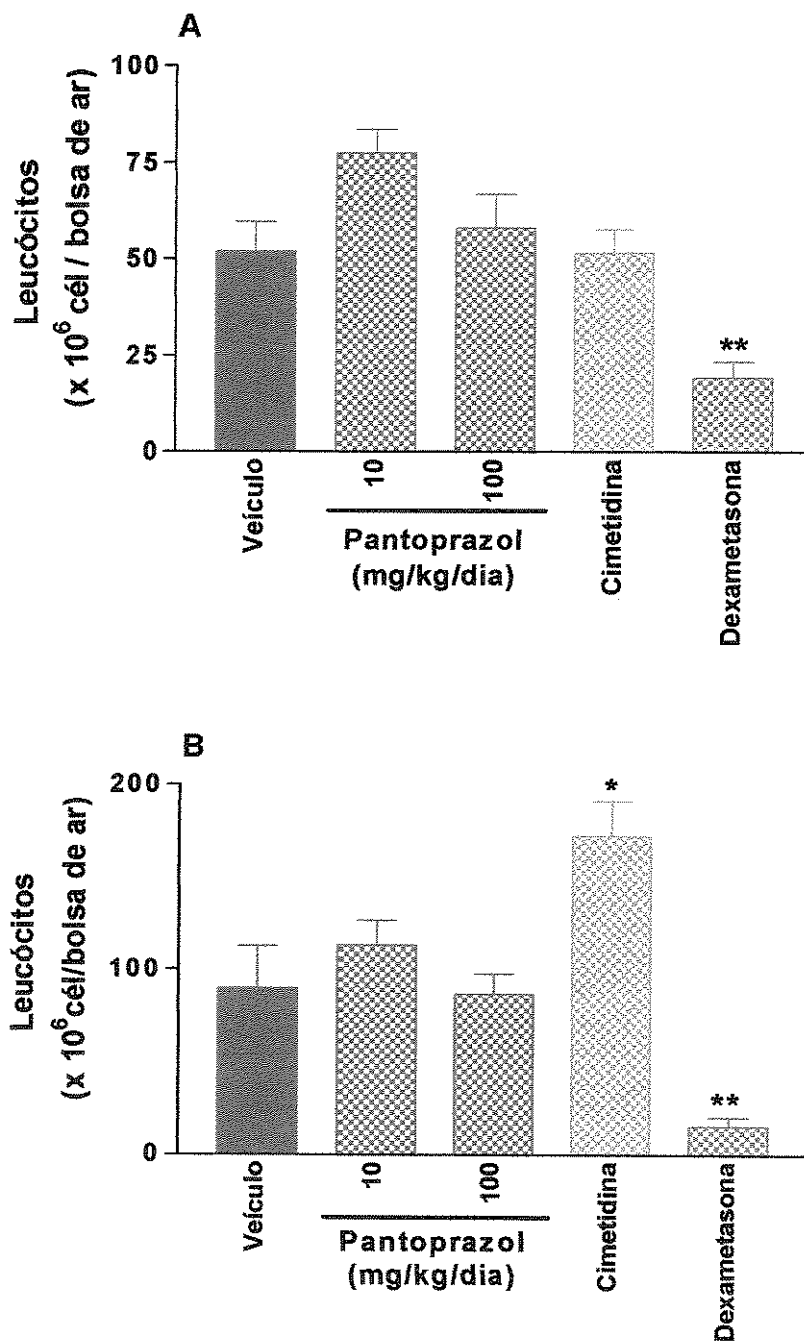
A administração de 10 e 100 mg/kg de pantoprazol ou 100 mg/kg de cimetidina por 7 ou 28 dias aos animais não produziu modificações no volume de exsudato (Figura 9A e B) ou migração de leucócitos em resposta a carragenina (Figura 10A e B). O mesmo tratamento também não foi capaz de modificar a migração celular induzida pela injeção de *H. pylori* na bolsa de ar (Figura 11A e B). Comparativamente, o tratamento com omeprazol e lansoprazol por 7 dias também não foi capaz de reduzir a formação de exsudato e a migração de leucócitos induzida pela administração de carragenina (Figura 12A e B). O antiinflamatório esteroide, dexametasona, foi utilizado como controle positivo para atividade antiinflamatória. Podemos observar na Figura 9 (A e B) que a administração de dexametasona (0,75 mg/kg) por 7 e 28 dias foi eficiente em reduzir a formação do exsudato inflamatório em resposta à carragenina (\*\* $p < 0,01$ ). O mesmo tratamento foi capaz de inibir significativamente a migração de leucócitos para a bolsa de ar quando o estímulo utilizado foi a carragenina (\*\* $p < 0,01$ ; Figura 10A e B) ou a suspensão de *H. pylori* (\*\* $p < 0,01$ ; Figura 11A e B). A contagem diferencial revela que a dexametasona foi capaz de inibir a migração de neutrófilos e células mononucleares induzida por carragenina ou *H. pylori* (\*\* $p < 0,01$ ; Tabela 9 e 10, respectivamente) quando utilizada por 7 ou 28 dias.

## 4. RESULTADOS



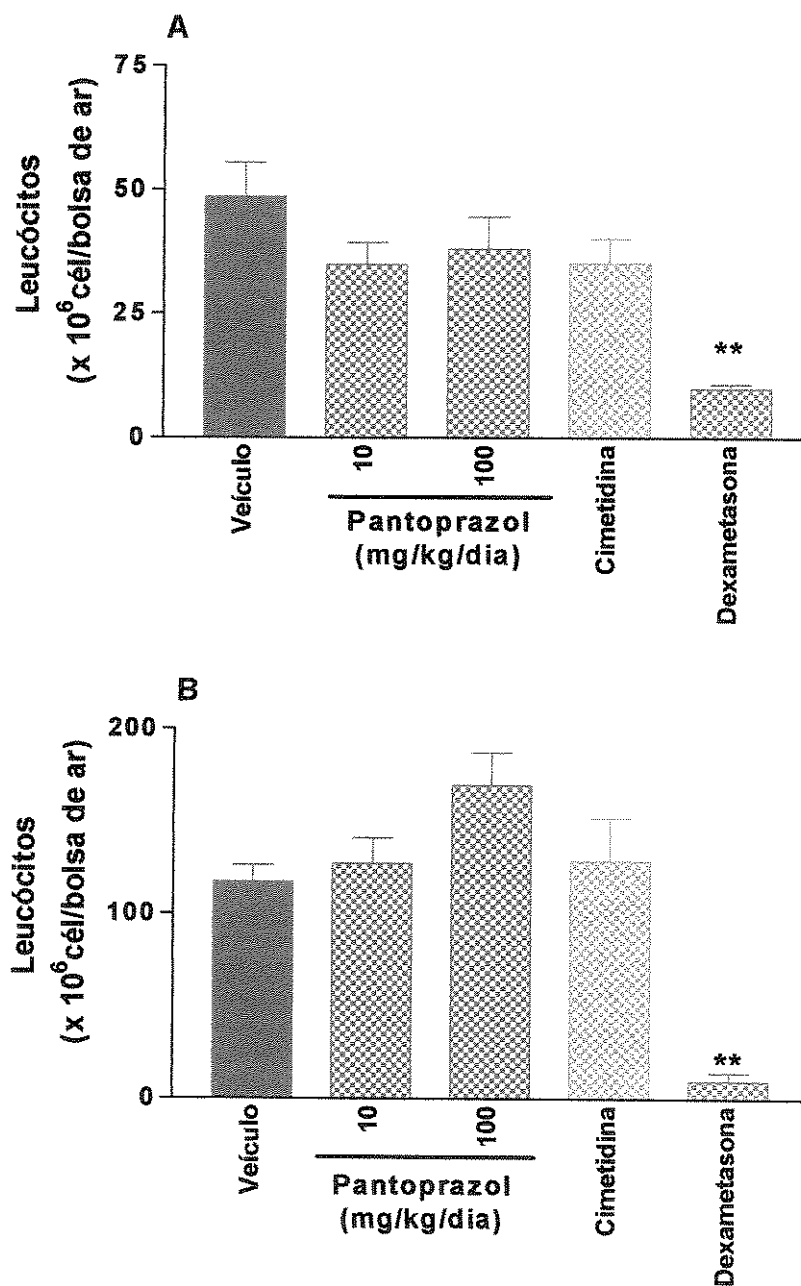
**Figura 9.** Volume de exsudato coletado na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de carragenina em ratos previamente tratados com pantoprazol (10 e 100 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou dexametasona (0,75 mg/kg) durante 7(A) ou 28 (B) dias. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*p<0,01 comparando com o controle (DMSO).

## 4. RESULTADOS



**Figura 10.** Número de leucócitos coletado na bolsa de ar de ratos 6 horas após a inoculação de carragenina em ratos previamente tratados com pantoprazol (10 e 100 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou dexametasona (0,75 mg/kg) durante 7(A) ou 28 (B) dias. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*p<0,05 e \*\*p<0,01 comparando com o controle (DMSO).

## 4. RESULTADOS



**Figura 11.** Número de leucócitos coletado na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de *H. pylori* em ratos previamente tratados com pantoprazol (10 e 100 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou dexametasona (0,75 mg/kg) durante 7(A) ou 28 (B) dias. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*p<0,01 comparando com o controle (DMSO).

## 4. RESULTADOS

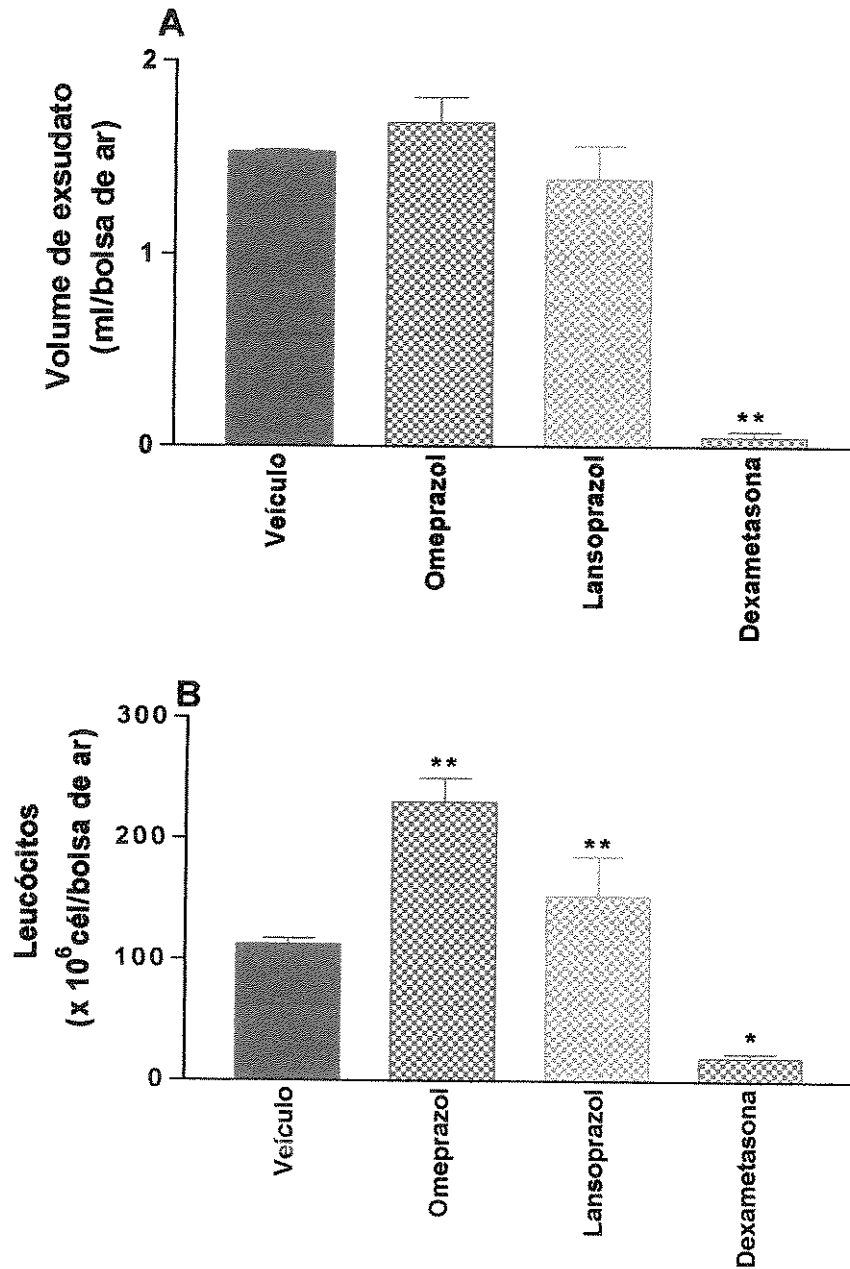


Figura 12. Volume de exsudato (A) e número de leucócitos (B) coletado na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de carragenina em ratos previamente tratados com omeprazol (100 mg/kg), lansoprazol (100 mg/kg) ou dexametasona (0,75 mg/kg) durante 7 dias. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparando com o controle (bicarbonato de sódio 5%).

#### 4. RESULTADOS

---

**Tabela 9.** Número de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) presente na bolsa de ar 6 horas após a inoculação de carragenina em ratos previamente tratados com veículo (DMSO), pantoprazol (10 e 100 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou dexametasona (0,75 mg/kg) por 7 ou 28 dias. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*p<0,01 comparando com o controle (DMSO).

Tratamento	7 dias		28 dias	
	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )
<b>Veículo</b>	46,04 $\pm$ 6,79	5,96 $\pm$ 1,20	82,19 $\pm$ 20,59	8,07 $\pm$ 1,93
<b>Pantoprazol 10 mg/kg</b>	69,30 $\pm$ 5,64	7,47 $\pm$ 1,18	97,64 $\pm$ 8,87	15,66 $\pm$ 4,78
<b>Pantoprazol 100 mg/kg</b>	46,75 $\pm$ 9,26	5,56 $\pm$ 1,01	79,73 $\pm$ 10,42	7,07 $\pm$ 1,55
<b>Cimetidina 100 mg/kg</b>	45,72 $\pm$ 5,87	5,82 $\pm$ 0,72	156,72 $\pm$ 13,60	15,49 $\pm$ 3,55
<b>Dexametasona 0,75 mg/kg</b>	17,49 $\pm$ 3,18**	1,85 $\pm$ 1,15**	14,65 $\pm$ 4,18**	1,10 $\pm$ 0,46**

#### 4. RESULTADOS

**Tabela 10.** Número de células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) presente na bolsa de ar 6 horas após da injeção de *H. pylori* em ratos previamente tratados com veículo (DMSO), pantoprazol (10 e 100 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou dexametasona (0,75 mg/Kg) por 7 ou 28 dias. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5). \*\*p<0,01 comparando com o controle (DMSO).

Tratamento	7 dias		28 dias	
	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )
<b>Veículo</b>	41,91 $\pm$ 6,36	6,59 $\pm$ 0,62	111,00 $\pm$ 8,44	7,81 $\pm$ 1,34
<b>Pantoprazol 10 mg/kg</b>	30,23 $\pm$ 3,95	4,60 $\pm$ 0,89	178,89 $\pm$ 58,25	6,78 $\pm$ 1,93
<b>Pantoprazol 100 mg/kg</b>	32,35 $\pm$ 5,89	5,69 $\pm$ 1,14	162,34 $\pm$ 15,96	7,12 $\pm$ 1,64
<b>Cimetidina 100 mg/kg</b>	30,26 $\pm$ 4,39	4,65 $\pm$ 0,68	87,97 $\pm$ 13,60	5,54 $\pm$ 2,13
<b>Dexametasona 0,75 mg/kg</b>	7,56 $\pm$ 0,95**	2,29 $\pm$ 0,45**	9,86 $\pm$ 4,41**	0,63 $\pm$ ,24**

## **5. DISCUSSÃO**

---



## 5. DISCUSSÃO

---

A inoculação de *H. pylori* nas bolsas de ar em ratos promoveu um infiltrado neutrofílico após 6-12 horas, validando o modelo experimental de inflamação aguda. O perfil de influxo de leucócitos assemelha-se ao observado para outros estímulos previamente descritos em outros trabalhos para o modelo de bolsa de ar (MARTIN *et al.*, 1994, WALLACE *et al.*, 1999). Nenhum influxo celular foi observado após 24 horas, indicando que esta foi uma resposta inflamatória aguda. Esta resposta apareceu como resultado de uma estimulação direta de neutrófilos por componentes do *H. pylori*, pois diferentes cepas, expressando *cagA*, *vacA* ou *cagE* induziram a migração de neutrófilos. Estes resultados estão de acordo com a ativação de leucócitos induzida pelo *H. pylori in vitro*, na qual não há contato ou interferência com as células epiteliais. Neste caso, cepas de *H. pylori cagA*<sup>+</sup> e *cagA*<sup>-</sup> foram capazes de induzir quimiotaxia de neutrófilos em câmaras de Boyden (AKYON e HASCELIK, 1999).

O aumento de expressão da molécula de adesão CD11b e o *burst* respiratório oxidativo foram observados em neutrófilos expostos à suspensão de diversas cepas de *H. pylori*. Cepas sem os genes *cagA* e *picB* tiveram a mesma habilidade de aumentar a expressão de CD11b do mesmo modo que as cepas positivas para esses genes (HANSEN *et al.*, 1999). Nestes casos, fatores de virulência como *cagA*, *cagE* e *vacA*, que dependem da interação com o epitélio gástrico para sua atividade, aparentemente não interferem em eventos de migração leucocitária *in vitro*.

A ciclooxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina (PG) H sintase, catalisa uma reação fundamental no metabolismo do ácido araquidônico para PGs e tramboxanos. Esta enzima é expressa constitutivamente (COX-1) e indutivamente (COX-2) (SMITH *et al.*, 1996). Em neutrófilos de pessoas normais, o

## 5. DISCUSSÃO

---

ácido araquidônico é predominantemente metabolizado para leucotrienos por expressão constitutiva de lipoxigenase-5 (HENDERSON, 1994). A estimulação de neutrófilos pelo lipopolissacarídeo ou citocinas próinflamatórias induz a expressão de COX-2, que resulta na síntese e secreção de PGE<sub>2</sub> (MALONEY *et al.*, 1998). Sugere-se que o aumento da expressão do RNAm de COX-2, bem como o aumento da PGE<sub>2</sub> liberado de neutrófilos está relacionada à presença *H. pylori* (KIM *et al.*, 2001). Estudos clínicos mostram que biópsia gástrica de pacientes com gastrite ativa, associada à infecção de *H. pylori*, expressa COX-2 e produz grande quantidade de PGE<sub>2</sub> quando comparada com biópsia de indivíduo normal (FRANCO *et al.*, 1999). Da mesma forma, observou-se um aumento significativo na síntese de PGE<sub>2</sub> no exsudato coletado nas bolsas de ar que receberam *H. pylori*, indicando que a COX-2 é induzida no modelo de bolsa de ar em pele dorsal de ratos.

Citocinas liberadas por neutrófilos, incluindo IL-1  $\alpha$  e  $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , fator  $\beta$  de crescimento e transformação e outros (CASSATELLA *et al.*, 1997), exercem ações pró-inflamatórias e imuno-reguladoras. Os componentes do *H. pylori* podem induzir a migração de neutrófilos para a mucosa gástrica e seguindo o extravasamento, os próprios neutrófilos podem ser um meio de liberação de citocinas, amplificando a resposta inflamatória (KIM *et al.*, 1998). No presente estudo, notou-se um aumento significativo nos níveis de IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  nas bolsas de ar inoculadas com *H. pylori*, indicando que, assim como em outros modelos de inflamação, neutrófilos produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias em resposta ao *H. pylori*. Isto pode ter uma participação na patogenicidade da inflamação aguda induzida por este microorganismo.

## 5. DISCUSSÃO

---

Embora o *H. pylori* não colonize estômagos de ratos, demonstramos de o modelo de bolsa de ar em ratos permite estudar a interação entre leucócitos e o *H. pylori*, bem como a atividade de drogas que possam modular esta interação.

Os inibidores de bomba protônica (PPIs), como omeprazol, lansoprazol e pantoprazol são drogas amplamente utilizadas na terapêutica em situações onde a redução da secreção de ácido gástrico pode resultar na cicatrização de lesões do trato gastrintestinal (CARO *et al.*, 2001). A associação destas drogas com antibióticos resulta no aumento dos níveis de erradicação do *H. pylori*. Os PPIs também são utilizados profilaticamente em cirurgias e outros procedimentos para reduzir a incidência de problemas decorrentes do refluxo de secreções gástricas (MIKAWA *et al.*, 2001).

Relatos na literatura apontam a existência de uma atividade antiinflamatória associada à ação anti-secretora, demonstrada pela habilidade destes compostos em reduzir a expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, a redução da capacidade dos leucócitos polimorfonucleares aderirem e migrarem em resposta a um estímulo inflamatório (YOSHIDA *et al.*, 2000). Esta possível atividade poderia ser promissora se considerarmos que as ulcerações do trato gastrointestinal decorrentes da infecção por *H. pylori*, do uso de antiinflamatórios não-esteroidais ou de estresse têm a participação de neutrófilos como células que contribuem para o estabelecimento e manutenção das lesões (CRABTREE, 1996; WALLACE *et al.*, 1990). No entanto, a atividade antiinflamatória e imunossupressora destes compostos poderia comprometer o uso profilático dos mesmos em situações pré-operatórias ou em pacientes com comprometimento imunológico.

## 5. DISCUSSÃO

---

O presente estudo mostrou que o tratamento, de curto ou longo prazo com os inibidores de secreção ácida, em doses que promovem inibição significativa da concentração de ácido gástrico secretado, não promoveu redução da formação de exsudato nem do influxo de leucócitos para a bolsa em resposta a carragenina, um estímulo inflamatório não-específico, extensamente utilizado em diferentes modelos de inflamação (SALVEMINI *et al.*, 1995). Os mesmos resultados foram observados no tratamento por sete dias com o omeprazol e o lansoprazol. Resultados semelhantes foram verificados após o tratamento com os inibidores de secreção ácida, por 7 ou 28 dias, nas bolsas de ar inoculadas com *H. pylori*. Não houve modificação na habilidade dos leucócitos migrarem para a bolsa de ar em resposta a presença do *H. pylori*. Somente a dexametasona, um potente antiinflamatório esteroide foi capaz de reduzir significativamente a migração leucocitária e a formação de exsudato em resposta a ambos os estímulos, carragenina e *H. pylori*.

A dexametasona é conhecida por inibir significativamente a migração de leucócitos no processo inflamatório. Como outros glicocorticóides, a dexametasona induz a síntese de lipocortina, que por sua vez, inibe a fosfolipase A<sub>2</sub>, prevenindo a geração de prostaglandinas, leucotrienos e PAF, mediadores responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação. Em adição, os glicocorticóides inibem a síntese e a atividade de quimiocinas com propriedades quimiotáticas como a IL-1 e TNF- $\alpha$  bem como, suas habilidades em induzir a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (PERRETTI, 1997; 1998).

Embora diversos trabalhos relatem a capacidade dos inibidores de secreção ácida inibirem funções leucocitárias, como a quimiotaxia induzida por fMLP

## 5. DISCUSSÃO

---

(WANDALL,1992), a expressão de moléculas de adesão (YOSHIDA *et al.*, 2000), geração de radicais livres (SUZUKI *et al.*, 1996), bem como a redução do número de leucócitos circulantes no sangue (KAWAMURA *et al.*, 2000), os dados apresentados nesse trabalho indicam que o tratamento, a curto e longo prazo, com os inibidores de bomba protônica e com os antagonistas de receptor H<sub>2</sub> não apresentam qualquer efeito antiinflamatório sobre a resposta inflamatória induzida pelo *H. pylori* no modelo de bolsa de ar em pele dorsal de ratos. Sugerindo, portanto, que tanto os inibidores de bomba protônica quanto os antagonistas de receptor H<sub>2</sub> não possuem ações antiinflamatórias desejáveis ou indesejáveis *in vivo*.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AGASTYA, G.; WEST, B. C.; CALLAHAN, J. M. Omeprazole inhibits phagocytosis and acidification of phagolysosomes of normal human neutrophils in vitro. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 22: 357-72, 2000.

AKYON, Y.; HASCELİK, G. The effect of *Helicobacter pylori* on neutrophil chemotaxis is independent of cagA. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 24: 209-13, 1999.

ATHERTON, J. C.; CAO, P.; COVER, T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem**, 270: 17771-77, 1995.

BICKLEY, J.; OWEN, R.J. FRASER, A. G.; POUNDER, R. E. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *H. pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. **J Med Microbiol**, 39: 338-44, 1993.

BLASER, M. J. Role of vacA and the cagA locus of *Helicobacter pylori* in human disease. **Aliment Pharmacol Ther**, 10 (Suppl.1): 73-77, 1996.

BLASER, M. J.; PEREZ-PEREZ, G. I.; KLEANTHOUS, H.; COVER, T. L.; PEEK, R. M.; *et al.* Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Research**, 55: 2111-15, 1995.

BLASER, M. J. Intrastrain difference in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? **Ann Med**, 27: 559-63, 1995.

BLASER, M. J. Hypothesis on pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. **Gastroenterology**, 102: 720-27, 1992.

BLISS, C. M. Jr.; GOLENBOCK, D. T.; KEATES, S.; LINEVSKY, J. K.; KELLY, C. P. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. **Infect Immun**, 66: 5357-63, 1998.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

CAPODICASA, E.; DE BELLIS, F.; PELLI, M. A. Effect of lansoprazole on human leukocyte function. **Immunopharm Immunotoxicol**, 21: 357-77, 1999.

CARO, J. J.; SALAS, M.; WARD, A. Healing and relapse rates in gastroesophageal reflux disease treated with the newer proton-pump inhibitors lansoprazole, rabeprazole, and pantoprazole compared with omeprazole, ranitidine, and placebo: evidence from randomized clinical trials. **Clin Ther**, 23: 998-1017, 2001.

CASSATELLA, M. A.; GASPERINI, S.; RUSSO, M. P. Cytokine expression and release by neutrophils. **Ann N Y Acad Sci**, 832: 233-42, 1997.

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

CLARK, J. M.; WEINHOLD, K. L. Infection of artificial air pouch in the connective tissue of mice with *Neisseria gonorrhoeae*. **J Med Microbiol**, 12: 233-37, 1979.

COVER, T. L.; DOOLEY, C. P.; BLASER, M. J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infect Immun**, 58: 603-10, 1990.

CRABTREE, J. E. Gastric mucosal inflammatory response to *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther**, 10: 29-37, 1996.

CRABTREE, J. E.; FIGURA, N. Mechanisms of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. In: Scarpignato C, Bianchi Porro G (eds): Clinical pharmacology and therapy of *Helicobacter pylori* infection. **Prog Basic Clin Pharmacol.**, Basel, Karger, 11: 21-43, 1999.

CRABTREE, J. E.; KERSULYTE, D.; LI, S. D.; LINDLEY, I. J.; BERG, D. E. Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by *cagPAI* encoded VirD4 homologue. **J Clin Pathol**, 52: 653-57, 1999.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

EATON, K. A.; KERSULYTE, D.; MEFFORD, M.; DANON, S. J.; KRAKOWKA, S.; *et al.* Role of *Helicobacter pylori* *cag* region genes in colonization and gastritis in two animal models. **Infect Immun**, 69: 2902-8, 2001.

EVANS, D. J. Jr.; EVANS, D. G.; TAKEMURA, T.; NAKANO, H.; LAMPERT, H. C.; *et al.* Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infect Immun**, 63: 2213-20, 1995.

FELLENIUS, E.; BERGLINDH, T.; SACHS, G.; OLBE, L.; ELANDER, B.; *et al.* Substituted benzimidazole block gastric acid secretion by blocking H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase. **Nature**, 290: 159-61, 1981.

FORREST, M. J.; BROOKS, P. M.; TAGAKI, T.; KOWANKO, I. The subcutaneous air-pouch model of inflammation. In **Handbook of animal models for the rheumatic diseases**, Vol 1. Eds: Greenwald, R.A. and Diamond, H.S., London Press, p125-34, 1988.

FRANCO, L.; TALAMINI, G.; CARRA, G.; DORIA, D. Expression of COX-1, COX-2, and inducible nitric oxide synthase protein in human gastric antrum with *Helicobacter pylori* infection. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 58: 9-17, 1999.

FUJIWARA, Y.; HIGUCHI, K.; FUKUDA, T.; WATANABE, T.; TOMINAGA, K.; *et al.* Inhibitory effect of sofalcone on tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta production in human monocytes stimulated by *Helicobacter pylori* water extract. **Drugs Exp Clin Res**, 27: 103-6, 2001.

FUKUHARA, M.; TSURUFUJI, S. The effect of locally injected anti-inflammatory drugs on the carrageenin granuloma in rats. **Biochem Pharmacol**, 18: 475-84, 1969.

GARRISON, J. C. The pharmacological basis of therapeutics. In: GILMAN, A.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **Pergamon Press Oxford**, 1998. p.574-99.

GO, M. F. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther**, 115: (suppl 1): 129: 3-15, 2002.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov, respectively. **Int J Syst Bacteriol**, 39: 397-405, 1989.
- GRAHAM, D. Y. Therapy of *Helicobacter pylori* - Current status and issues. **Gastroenterology**, 118: S2-S8, 2000.
- GRINSTEIN, S.; FURUYA, W.; CRAGOE, Jr., E. J. Volume changes in activated human neutrophils: the role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. **J Cell Physiol**, 128: 33-40, 1986.
- HANSEN, P. S.; GO, M. F.; VARMING, K.; ANDERSEN, L.P.; GRAHAM, D.Y.; *et al.* Proinflammatory activation of neutrophils and monocytes by *Helicobacter pylori* is not associated with *cagA*, *vacA* or *picB* genotypes. **APMIS**, 107: 1117-23, 1999.
- HENDERSON, W. R. Jr. The role of leukotrienes in inflammation. **Ann Intern Med**, 121: 684-97, 1994.
- HIDA, N.; SHIMOYAMA, T. Jr.; NEVILLE, P.; DIXON, M. F.; AXON, A.T.; *et al.* Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial *cag* status and peptic ulceration. **J Clin Pathol**, 52: 658-64, 1999.
- HO, S. A.; HOYLE, J. A.; LEWIS, F. A.; SECKER, A. D.; CROSS, D.; *et al.* Direct polymerase chain reaction test for detection of *H. pylori* in humans and animals. **J Clin Microbiol**, 29: 2543-49, 1991.
- ISHIKAWA, H.; NIINOBE, S.; TSURUFUJI, S. Studies on the mode of action of anti-inflammatory agents. 1. Quantitative analysis of anti-inflammatory effects by carboxymethyl cellulose pouch method. **Yakugaku Zasshi**, 88: 1472-77, 1968.
- KAWAMURA, T.; MIYAJI, C.; TOYABE, S.; FUKUDA, M.; WATANABE, H.; *et al.* Suppressive effect of antiulcer agents on granulocytes – a role for granulocytes in gastric ulcer formation. **Dig Dis Sci**, 45: 1786-91, 2000.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

KIM, J. S.; JUNG, H. C.; KIM, J. M.; SONG, I. S.; KIM, C.Y. Interleukin-8 expression by human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* soluble proteins. **Scand. J Gastroenterol**, 33: 1249-55, 1998.

KIM, J.S.; KIM, J.M.; JUNG, H.C.; SONG, I.S. Expression of cyclooxygenase-2 in human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins: possible involvement of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathway. **Dig Dis Sci**, 46: 2277-84, 2001.

KON, Y.; TSUKADA, H.; HASEGAWA, T.; IGARASHI, K.; WADA, K.; *et al* .The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 25: 313-21, 1999.

KONNO, S.; TSURUFUJI, S. Induction of zymosan air pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anticomplementary and anti-inflammatory agents. **Br J Pharmacol**, 80: 269-77, 1983.

KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J.; KWIECIEN, S. KARCZEWSKA, E.; *et al* . *Helicobacter pylori* infection delays healing of ischaemia reperfusion induced gastric ulcerations: new animal model for studying pathogenesis and therapy of *H. pylori* infection. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 12: 1299-1313, 2000.

KOZOL, R.; DOMANOWSKI, A.; JASZEWSKI, R.; CZANKO, R.; MCCURDY, B.; *et al* . Neutrophil chemotaxis in gastric mucosa. A signal-to-response comparison. **Dig Dis Sci**, 36: 1277-80, 1991.

LEUNK, R. D.; JOHNSON, P. T.; DAVID, B. C.; KRAFT, W. G. MORGAN, D. R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J Med Microbiol**, 26: 93-99, 1988.

LICHTENSTEIN, D. R.; WOLFE, M. M. Histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists. *In: Gastrointestinal Pharmacology*, WB Saunders Co, p. 47-113, 1993.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- LUKACS, G.L.; KAPUS, A.; NANDA, A.; ROMANEK, R.; GRINSTEIN, S. Proton conductance of the plasma membrane: properties, regulation, and functional role. **Am J Physiol**, 265: C3-14, 1993.
- MAI, U. E. H.; PEREZ-PEREZ, G. I.; ALLEN, J. B.; WAHL, S. M.; BLASER, M. J.; *et al.* Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. **J Exp Med**, 175: 517-25, 1992.
- MALONEY, C. G.; KUTCHERA, W. A.; ALBERTINE, K. H.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; *et al.* Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. **J Immunol**, 160: 1402-10, 1998.
- MARTIN, S. W.; ETEVENS, A. J.; BRENNAN, B. S.; DAVIES, D.; ROWLAND, M.; *et al.* The six -day- old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 32: 139-47, 1994.
- MENDONÇA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M. S.; GODOY, A. P. O.; GUERZONI, R. A.; *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, 5: 79-83, 2000.
- MIKAWA, K.; AKAMATSU, H.; NISHINA, K.; NIWA, Y. Effects of pirenzepine, omeprazole, lansoprazole, and rabeprazole on human neutrophil functions. **Can J Anaesth**, 48: 421-2, 2001.
- MONTECUCCO, C.; PAPINI, E.; BERNARD, M.; ZORATTI, M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. **FEBS Lett**, 452: 16-21, 1999.
- MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO, M. R. FRANCO, M. **Patologia: Processos gerais**. 4ª edição. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 109-28.
- MOSS, S. F.; CALAM, J.; AGAWAL, B.; WANG, S.; HOLT, P. R. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. **Gut**, 38: 498-501, 1996.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

NANDA, A.; BRUMELL, J. H.; NORDSTRÖN, T.; KJELDEN, L.; SENGELOV, H.; *et al.* Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases. **J Biol Chem**, 271: 15963-70, 1996.

NANDA, A.; GRINSTEIN, S. Protein kinase C activates an H<sup>+</sup> (equivalent) conductance in the plasma membrane of human neutrophils. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 10816-20, 1991.

NEDRUD, J. G. Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 24: 243-50, 1999.

NIELSEN, H.; BIRKHOLZ, S.; ANDERSEN, L. P.; MORAN, A. P. Neutrophil activation by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. **J Infect Dis**, 170: 135-9, 1994.

ODOU, P.; MARTIN, P.; MEMBRE, S.; GRESSIER, B.; TAMIJI, L.; *et al.* Omeprazole-induced leukopenia. A case report. **J Clin Pharm Ther**, 24: 317-21, 1999.

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

OHARA, T.; ARAKAWA, T. Lansoprazole decreases peripheral blood monocytes and intercellular adhesion molecule-1-positive mononuclear cells. **Dig Dis Sci**, 44: 1710-15, 1999.

OHUCHI, K.; YOSHINO, S.; KANAOKA, K.; TSURUFUJI, S.; LEVINE, L. A possible role of arachidonate metabolism in allergic air pouch inflammation in rats. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, 68: 326-31, 1982.

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

PAPINI, E.; SATIN, B.; NORAIS, N.; DE BERNARD, M.; TELFORD, J.L.; *et al.* Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. **J Clin Invest**, 102: 813-20, 1998.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

PERRETTI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. **Trends Pharmacol Sci**, 18: 418-25, 1997.

PERRETTI, M. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation **Gen Pharmac**, 31: 545-52, 1998.

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

RITTER, M.; SCHRATZBERGER, P.; ROSSMANN, H.; WOLL, E.; SEILER, K.; *et al.* Effect of inhibitors of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> ATPase on cell volume, intracellular pH and migration of human polymorphonuclear leucocytes. **Br J Pharmacol**, 124: 627-38, 1998.

SALVEMINI, D.; MANNING, P. T.; ZWEIFEL, B. S., SEIBERT, K.; CONNOR, J.; *et al.* Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. **J Clin Invest**, 96:301-8, 1995.

SATIN, B.; GIUDICE, G. D.; BIANCA, V. D.; DUSI, S.; LAUDANNA, C.; *et al.* The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. **J Exp Med**, 191: 1467-76, 2000.

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

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT., D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem**, 271: 33157-60, 1996.

STEVENS, A. Respostas teciduais ao dano. In: STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 95-107.

STYRT, B.; KLEMPNER, M. S. Internal pH of human neutrophil lysosomes. **FEBS Lett**, 149: 113-6, 1982.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

SUZUKI, M.; MORI, M.; FUKUMURA, D.; SUZUKI, H.; MIURA, S.; *et al.* Omeprazole attenuates neutrophil-endothelial cell adhesive interaction induced by extracts of *Helicobacter pylori*. **J Gastroenterol Hepatol**, 14: 27-31, 1999.

SUZUKI, M.; MORI, M.; MIURA, S.; SUEMATSU, M.; FUKUMURA, D.; *et al.* Omeprazole attenuates oxygen-derived free radical production from human neutrophil. **Free Rad Biol Med**, 21:727-31, 1996.

TAKATA, T.; FUJIMOTO, S.; ANZAI, K.; SHIROTAMI, T.; ONO, J.; *et al.* Analysis of the expression of *CagA* and *VacA* and the vacuolating activity in 167 isolates from patients with either peptic ulcers or non-ulcer dyspepsia. **Am J Gastroenterology**, 93: 30-34, 1998.

TAYLOR, D. N.; BLASER, M. J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol Rev**, 13: 42-59, 1991.

TELFORD, J. L.; GHIARA, P.; DELL'ORCO, M.; COMAMDUCCI, M.; XIANG, Z.; *et al.* Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. **J Exp Med**, 179: 1653-58, 1994.

TESSIER, P. A.; NACCACHE, P. H.; DIENER, K. R.; SPARRIUS, M.; STOOF, J.; *et al.* Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF- $\alpha$ . **J Immunol**, 161: 1204-11, 1998.

Van DOORN, N. E. M.; NAMAVAR, F.; SPARRIUS, M.; STOOF, J.; Van REES, E. P.; *et al.* *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. **Infect Immun**, 67: 3040-6, 1999.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand J Rheumatol**, 25: 9-21, 1996.

WALLACE, J. L.; CHAPMAN, K.; MCKNIGHT, W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan- air pouch inflammation. **Br J Pharmacol**, 126: 1200-4, 1999.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

WALLACE, J. L. Possible mechanisms and mediators of gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol**, 187: 65-70, 1991.

WALLACE, J. L.; KEENAN, C. M.; GRANGER, D. N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. **Am J Physiol**, 259: G462-7, 1990.

WANDALL, J. H. Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, superoxide production, degranulation and translocation of cytochrome b245. **Gut**, 33: 617-21, 1992.

YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; TANAKA, Y.; FUJITA, N.; KASSAI, K.; *et al.* A new mechanism for anti-inflammatory actions of proton pump inhibitors – inhibitory effects on neutrophil-endothelial cell interactions. **Aliment Pharmacol Ther**, 14: 74-81, 2000.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. **Free Radic Res**, 33: 785-94, 2001.

YOSHINO, S.; CROMARTIE, W. J.; SCHWAB, J. H. Inflammation induced by bacterial cell wall fragments in the rat air pouch: comparison of rat strains and measurement of arachidonic acid metabolites. **Am J Pathol**, 121: 327-36, 1985.



## **7. ANEXOS**

---

## **7. ANEXOS**

---

**7.1. Artigo 1: Acute inflammatory response induced by *Helicobacter pylori* in the rat air pouch.**

**7.2. Artigo 2: Pantoprazole treatment does not invoke anti-inflammatory properties in vivo.**

**7.3. Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação animal.**

## Acute inflammatory response induced by *Helicobacter pylori* in the rat air pouch

Alessandra Gambero, Tagliane L. Becker, Sonia A. Gurgueira, Yune H.B. Benvenuto, Marcelo L. Ribeiro, Sergio de Mendonça, José Pedrazzoli Jr. \*

Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Av. São Francisco de Assis 218, 12916-900 Bragança Paulista, SP, Brazil

Received 23 October 2002; received in revised form 26 March 2003; accepted 31 March 2003

First published online 17 June 2003

### Abstract

Infection by *Helicobacter pylori* elicits persistent neutrophil infiltration in the gastric mucosa and stimulates the release of substances that may contribute to the establishment of gastritis. In this study, we used the rat air pouch model to evaluate the acute inflammatory response to *H. pylori*, in vivo. A pronounced neutrophil infiltration was observed 6 h and 12 h after the injection of *H. pylori* into the air pouch. Strains with different genotypes were able to induce cellular influx. This response was dependent upon the amount of bacteria injected and still occurred when heat-killed bacteria were employed. An increase in prostaglandin E<sub>2</sub> levels was observed, indicating that *H. pylori* induced cyclooxygenase 2 in this model. The production of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  by leukocytes was also enhanced, suggesting that this model may be useful for studying the direct activation of neutrophils by *H. pylori* in vivo.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Air pouch; *Helicobacter pylori*; inflammation; Interleukin-1 $\beta$ ; Neutrophil; Tumor necrosis factor- $\alpha$

### 1. Introduction

*Helicobacter pylori* is one of the most common human gastrointestinal pathogens, infecting 50% of the human population [1]. Infection by *H. pylori* induces acute gastritis, which later develops into chronic gastritis. Both forms of gastritis are characterized by a considerable neutrophil infiltration, which can contribute to gastritis induction by releasing pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as well as reactive oxygen species [2–4]. *H. pylori* or its products may recruit and activate neutrophils by directly stimulating these inflammatory cells or by stimulating the release of epithelial chemokines [5].

Many virulence factors contribute to the pathogenesis of *H. pylori*, but it is still unclear which of these modulate, directly or indirectly, neutrophil migration during *H. pylori* infection. Vacuolating toxin (VacA) induces the formation of large cytoplasmic vacuoles in cultured cells and increases the permeability of the epithelial barrier, probably by acting on tight junctions to reduce transepithelial resistance and, consequently, potentiating neutrophil migration into the gastric mucosa [6,7]. Several events occur after cell contact with bacteria possessing the *cag* pathogenicity island, for example, IL-8 may be induced by gastric epithelial cells and IL-8, in turn, is a potent neutrophil chemo-attractant [8].

Protein components in *H. pylori* extracts can attract and activate neutrophils and other inflammatory cells, thereby stimulating the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [9]. A 150-kDa protein in aqueous extracts of *H. pylori* promoted neutrophil adhesion to endothelial cells and chemotaxis in vitro, suggesting that this molecule could have a role in the accumulation of these cells at the site of infection [10,11]. This protein, designated HP-NAP (*H. pylori* neutrophil-activating protein), stimulates the production of reactive oxygen intermediates and the expression of

\* Corresponding author. Tel.: +55 (11) 4034 8024; Fax: +55 (11) 4034 1825.

E-mail address: pedrazzoli@saofrancisco.edu.br (J. Pedrazzoli Jr.).

cyclooxygenase 2 (COX-2) in neutrophils [11,12]. *H. pylori* lipopolysaccharide (LPS) possesses little biological activity compared to LPS from other bacteria [13]. This LPS, however, can stimulate the secretion of IL-8 by gastric epithelial cells and mononuclear cells, in vitro [14]. The priming of neutrophils by pre-incubation with LPS has also been described [13,15].

Reports on the ability of *H. pylori* to induce inflammation have been restricted almost entirely to the analysis of biopsies from patients. Only a few animal models have been used, although several aspects of the interaction between leukocytes and *H. pylori* have been evaluated in experiments in vitro [16]. The rat air pouch model of inflammation has been used to investigate the inflammatory response to a variety of agents, including zymosan, carrageenan and bacteria [17–20]. This model allows a quantitative assessment of the progress of inflammation and measurement of the formation of chemical mediators such as cytokines. In this study, the air pouch model was used to characterize the acute inflammatory response induced by *H. pylori*. The kinetics of leukocyte recruitment and the levels of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and cytokines formed were evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Culture conditions and characterization of *H. pylori*

*H. pylori* isolates obtained from patients with non-ulcer dyspepsia and with peptic ulcer disease were included in the study (Table 1). Isolates of *H. pylori* were inoculated into selective medium [brain heart infusion (BHI) agar (Merck, Germany), 10% sheep blood, 10 mg l<sup>-1</sup> vancomycin, 20 mg l<sup>-1</sup> nalidixic acid, 2 mg l<sup>-1</sup> amphotericin B and 40 mg l<sup>-1</sup> 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma, Germany)], followed by incubation for 3–7 days at 37°C under microaerophilic conditions (8–10% CO<sub>2</sub>, 5–6% O<sub>2</sub>, 80–85% N<sub>2</sub>, at 98% humidity). The identity of the colonies was confirmed by Gram staining and oxidase, catalase and urease production. The strains were inoculated on a plate, transferred to liquid medium [BHI agar, 10% fetal calf serum (Cultilab, Brazil), 10 mg l<sup>-1</sup> amphotericin B] and incubated for 3–5 days at 37°C under microaerophilic conditions as above, with continuous shaking at 50 rpm.

Genomic DNA was extracted with DNAzol<sup>®</sup> reagent (Gibco BRL, Cincinnati, OH, USA). Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a total volume of 50 µl containing 50 pmol primer, 100 ng genomic DNA, 1.0 mmol l<sup>-1</sup> of each of the four dNTPs (Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies, Alameda, CA, USA) and 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen<sup>®</sup> Life Technologies). The reaction mixtures were cycled in an automated GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 thermal cycler (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 3 min followed by 35 cycles of

denaturation at 95°C for 1 min, with annealing temperature ranging from 45 to 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. The final cycle included a 7-min step to ensure full extension of the PCR products. The presence of *H. pylori* was confirmed by PCR of the 16S rRNA [21] and *glmM* [22] genes. The *cagA*, *cagE*, *vacA* (m and s regions) and HP-NAP genes were analyzed (Table 1) using previously described primers [23–26].

### 2.2. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) free of specific pathogens were obtained from CEMIB (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil). The experiments were performed in accordance with the principles outlined by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

### 2.3. Air pouch model

Air pouches were produced as described elsewhere [27]. Briefly, 20 ml of sterile air was injected subcutaneously in the dorsal skin of rats. Three days later, another 10 ml of air was injected at the same site. On the sixth day after the first injection, the pouch received 2 ml of an *H. pylori* suspension. After the injection of *H. pylori*, the rats were anesthetized with halothane and the pouch was carefully opened by a small incision. The exudate was collected and transferred to a sterile tube and the exudate volume was measured gravimetrically. An aliquot of the exudate was used to determine the leukocyte number in an automatic counter (Celm 550, Brazil). The profile of infiltrated cells was determined in exudate smears stained with May-Grunwald-Giemsa. Samples of exudate were also frozen and stored at -20°C for subsequent quantification of PGE<sub>2</sub>, TNF-α and IL-1β using commercially available ELISA kits (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK). A sample of blood was drawn from the inferior vena cava for determination of leukocyte numbers and plasma cytokine levels.

To determine the occurrence and the kinetics of the inflammatory response, two *H. pylori* strains (109, 551) were initially used to inoculate BHI broth and both strains were co-injected in the same animal. Thereafter, individual suspensions of *H. pylori* collected from solid plate cultures in phosphate-buffered saline (PBS) were used. In another experiment, bacteria were collected in PBS and heated to

Table 1  
Strains used and genotypic status

Strain	Origin	Genotype			
		HP-NAP	<i>cagE</i>	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>
109	NUD	+	+	+	s2m2
219	PUD	+	+	-	s2m2
320	PUD	+	+	+	s1m1
551	PUD	+	+	+	s1m2

NUD, non-ulcer dyspepsia; PUD, peptic ulcer disease.

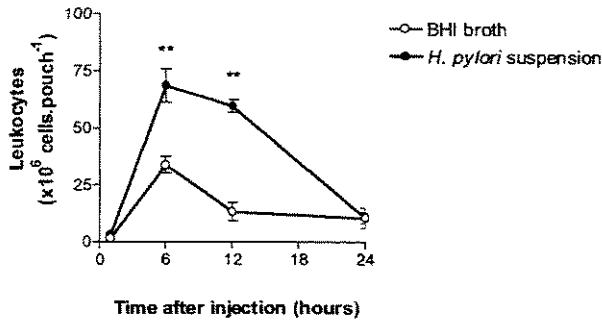


Fig. 1. Leukocyte counts in inflammatory exudates from rat air pouches co-injected with *H. pylori* suspension strains 109 and 551 or BHI broth (control). The points represent the means  $\pm$  S.E.M. of five rats. \*\* $P < 0.01$  compared to the control group.

100°C for 5 min. Control rats received only BHI broth or PBS.

#### 2.4. Statistical analysis

All data were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Comparisons among groups were performed using one-way analysis of variance followed by the Student *t*-test or Dunnett multiple comparisons test, when convenient. An associated probability (*P* value) of less than 5% was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Inflammatory response at different times after the injection of *H. pylori* cultured in BHI broth

The volume of exudate recovered from air pouches at different times after the injection of *H. pylori* did not differ from that of the control group (data not shown). The co-injection of *H. pylori* (strains 109 and 551) into air pouches resulted in a significant ( $P < 0.01$ ) accumulation of leukocytes after 6 h and 12 h compared to that observed with BHI broth alone (Fig. 1). The leukocyte number returned to basal levels after 24 h. After 1, 6 and 12 h, there was a significant increase in the number of neutro-

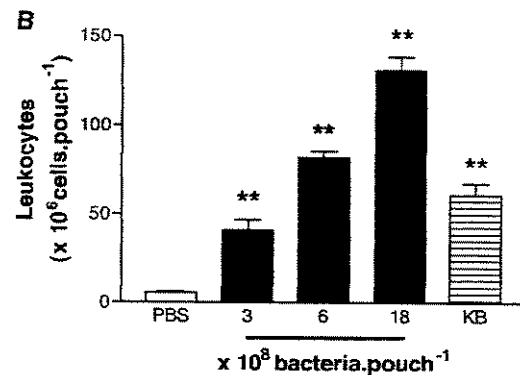
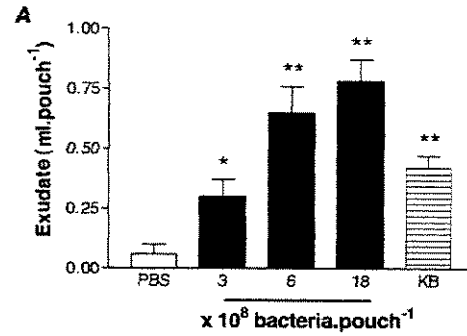


Fig. 2. Volume of exudate collected (A) and leukocyte counts (B) 6 h after the injection of 3, 6 and 18  $\times 10^8$  of *H. pylori* strain 551, 3  $\times 10^8$  of *H. pylori* killed (KB; strain 551) or PBS alone (control) in rat air pouches. The columns represent the means  $\pm$  S.E.M. of five to nine rats. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared to the control group.

phils, when compared to the control group (Table 2), although there was no change in the number of peripheral blood leukocytes at these same times (data not shown). When the responses in PBS and liquid medium control groups were compared, a high level of leukocyte accumulation was observed in the liquid medium group. Thus, suspensions of *H. pylori* collected from solid plate cultures collected in PBS were used in further experiments, due to the fact that the liquid culture medium (BHI broth) was able to induce a significant cellular response when used as a negative control (Fig. 1).

Table 2

The numbers of neutrophils (NE), eosinophils (EO) and mononuclear cells (MN) in air pouches 1, 6, 12 and 24 h after the co-injection of *H. pylori* suspension, strains 109 and 551

Time (h)	BHI broth (control)			<i>H. pylori</i> suspension		
	NE ( $\times 10^6$ )	EO ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )	NE ( $\times 10^6$ )	EO ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )
1	0.42 $\pm$ 0.10	0.13 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.10	1.62 $\pm$ 0.22**	0.29 $\pm$ 0.05	1.32 $\pm$ 0.17
6	26.65 $\pm$ 2.88	0.54 $\pm$ 0.29	6.81 $\pm$ 1.03	44.56 $\pm$ 3.60**	0.22 $\pm$ 0.14	17.62 $\pm$ 2.91
12	6.57 $\pm$ 1.85	0.40 $\pm$ 0.13	4.47 $\pm$ 0.51	37.73 $\pm$ 7.64**	0.79 $\pm$ 0.37	20.94 $\pm$ 9.78
24	5.08 $\pm$ 2.24	0.31 $\pm$ 0.18	5.10 $\pm$ 1.96	7.14 $\pm$ 1.68	0.12 $\pm$ 0.03	3.16 $\pm$ 0.69

The values are the means  $\pm$  S.E.M. of five rats.

\*\* $P < 0.01$  compared to the respective control groups (liquid medium).

Table 3

The numbers of neutrophils (NE), eosinophils (EO) and mononuclear cells (MN) in the air pouches 6 h after the injection of *H. pylori* strain 551 in PBS

Cells ( $\times 10^6$ )	PBS	<i>H. pylori</i> per pouch ( $\times 10^8$ )			
		3	6	18	3 (killed bacteria)
NE	2.53 $\pm$ 0.39	34.92 $\pm$ 5.21**	72.46 $\pm$ 2.91**	114.47 $\pm$ 4.81**	51.62 $\pm$ 6.36**
EO	0.31 $\pm$ 0.09	0.22 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.15	1.68 $\pm$ 0.38**	0.14 $\pm$ 0.14
MN	2.88 $\pm$ 0.49	5.76 $\pm$ 0.94	8.43 $\pm$ 0.30*	14.67 $\pm$ 1.74**	9.28 $\pm$ 1.98

The values are the means  $\pm$  S.E.M. of five to nine rats.

\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared to the respective control groups (PBS).

### 3.2. Leukocyte migration 6 h after the injection of *H. pylori* suspension in PBS

The injection of *H. pylori* suspension ( $3\text{--}18 \times 10^8$  bacteria; strain 551), obtained from solid medium in PBS, increased the formation of exudate, which increased with the number of bacteria (Fig. 2A). An increased migration of inflammatory cells into the pouches was also observed after the injection of *H. pylori* in PBS. This response also varied with the number of bacteria used (Fig. 2B). The killed bacteria ( $3 \times 10^8$  bacteria, strain 551) also induced cellular influx and exudate production (Fig. 2A,B). No statistical difference was seen when the experiments performed with live and killed bacteria were compared. Neutrophils were the predominant inflammatory cells recruited to air pouches in response to  $3 \times 10^8$  *H. pylori* per pouch. The same result was observed when  $3 \times 10^8$  killed bacteria were injected (Table 3). Higher numbers of microorganisms caused significant migration of eosinophils and mononuclear cells, in addition to neutrophils (Table 3). A predominant neutrophil recruitment was seen, compared to PBS, when different strains of *H. pylori* were injected at the same concentrations (Fig. 3). No statistical differences were observed when the experiments were performed with different strains.

### 3.3. Exudate levels of PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$

The results from exudate samples, shown in Table 4, were obtained from groups injected with strains 551, 109 and 320 ( $3 \times 10^8$  bacteria per pouch;  $n = 2\text{--}3$  for each group). A significant increase in the exudate content of PGE<sub>2</sub> was observed 6 h after the injection of *H. pylori* when compared to the PBS group (Table 4). The levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were also greatly increased (Table 4). When individual results of PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production from these strains were compared, no statistical differences were observed. These cytokines were not detected in plasma from control and *H. pylori*-injected rats (data not shown).

## 4. Discussion

The injection of *H. pylori* into rat air pouches evoked a

pronounced infiltration of neutrophils after 6–12 h. No cellular influx was observed after 24 h, indicating that this was an acute inflammatory response. The cellular response was dependent upon the amount of bacteria injected and was observed with different strains, independently of *cagA* and *vacA* genotypes. A similar leukocyte activation induced by *H. pylori* has been reported in vitro, where *H. pylori* strains *cagA*<sup>+</sup> and *cagA*<sup>-</sup> induced neutrophil chemotaxis in Boyden chambers when there was no contact with or interference from epithelial cells [28]. Upregulation of the adherence molecule CD11b and an oxidative burst were observed in neutrophils following exposure to a sonicate from several *H. pylori* strains. Strains without the *cagA* and *picB* genes showed the same ability to upregulate CD11b as strains positive for these genes [29]. In these cases, the virulence factor *cagA*, which depends on epithelial contact for its activity, apparently did not participate in leukocyte migration.

Neutrophil influx was also observed when killed bacteria were injected into the air pouches. The heat treatment used efficiently killed bacteria, demonstrated by the absence of growth on BHI agar plates (data not shown). A previous report has demonstrated the chemotactic activity of crude sonicates from *H. pylori* to be proteinase-sensitive but stable to such heat treatment [30]. Thus, it is possible that small protein fragments retaining biological activity may remain following the heat treatment. Another possibility is that LPS may be responsible for the cellular response observed after heat treatment. *H. pylori* LPS has received limited attention compared with other surface antigens. Nevertheless, this molecule seems to have similar properties to the LPS of other Gram-negative bacteria [13,31]. Future experiments with isogenic mutants (*cagA*, *cagE*, *vacA* and HP-NAP gene) or purified factors (LPS

Table 4

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> levels (pg ml<sup>-1</sup>) in rat air pouches 6 h after the injection of *H. pylori* ( $3 \times 10^8$  bacteria per pouch)

	PBS	<i>H. pylori</i> suspension
IL-1 $\beta$	596.5 $\pm$ 97.5 ( $n = 4$ )	6340 $\pm$ 270*** ( $n = 8$ )
TNF- $\alpha$	0 ( $n = 4$ )	198.5 $\pm$ 36.5*** ( $n = 6$ )
PGE <sub>2</sub>	74.9 $\pm$ 4.5 ( $n = 5$ )	362.4 $\pm$ 61.2** ( $n = 6$ )

The results presented were obtained from exudate samples collected in animals in which strains 551, 320 and 109 were injected in PBS.

\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to the control group (PBS).

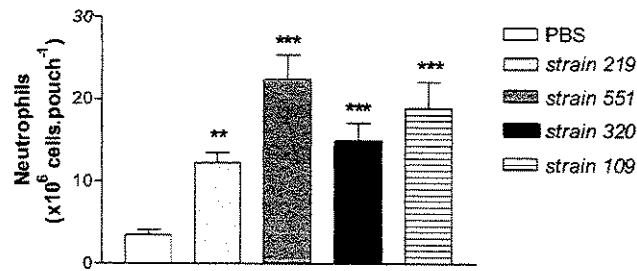


Fig. 3. Neutrophil counts in inflammatory exudates obtained 6 h after the injection of different *H. pylori* strains ( $3 \times 10^8$  bacteria per pouch). The columns represent the means  $\pm$  S.E.M. of five rats. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to the control group.

and HP-NAP) will be required to generate more evidence about which factors are involved in this phenomenon.

COX, also known as prostaglandin H synthase, catalyzes a fundamental reaction in the metabolism of arachidonic acid to PGs and thromboxanes. This enzyme occurs as constitutively expressed COX-1 and inducible COX-2 [32]. In neutrophils from normal subjects, arachidonic acid is metabolized predominantly to leukotrienes by constitutively expressed 5-lipoxygenase [33]. COX-2 is inducible in neutrophils stimulated by LPS or pro-inflammatory cytokines. The expression of COX-2 by neutrophils results in the synthesis and secretion of PGE<sub>2</sub> [34]. Up-regulation of COX-2 mRNA and an increase in PGE<sub>2</sub> synthesis by neutrophils were observed after stimulation of these cells with live *H. pylori* or an aqueous extract of this bacterium [12]. Gastric biopsies from *H. pylori*-infected patients with active gastritis express COX-2 and produce significant amounts of PGE<sub>2</sub> when compared to normal biopsies [35]. An increase in PGE<sub>2</sub> synthesis was detected in rat air pouches treated with *H. pylori*, suggesting that COX-2 may be induced in this model.

Cytokines released by neutrophils, including IL-1 $\alpha$  and  $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$  and others [36], exert pro-inflammatory and immunoregulatory actions. *H. pylori* components can induce the migration of neutrophils to the gastric mucosa and, following extravasation, neutrophils themselves may be a source of cytokines, thereby further amplifying the inflammatory response [37]. We observed a pronounced increase in the levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in air pouches treated with *H. pylori*, showing that neutrophils produced pro-inflammatory cytokines in response to *H. pylori*. These cytokines may play a role in the pathogenesis of the acute inflammation induced by this microorganism. In addition, the production of other cytokines, such as IL-8, in *H. pylori* rat air pouch should be evaluated.

Our results suggest that the rat air pouch model of inflammation induced by *H. pylori* may be useful for evaluating the responses of inflammatory cells to bacteria and the drugs that act upon these cells to attenuate these phenomena, without the disadvantages presented by in vitro models, such as the activation of leukocytes due to separation procedures or by exposure to artificial environments.

## References

- [1] Taylor, D.N. and Blaser, M.J. (1991) The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Epidemiol. Rev. 13, 42–59.
- [2] Wallace, J.L. (1991) Possible mechanisms and mediators of gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection. Scand. J. Gastroenterol. 187, 65–70.
- [3] Kozol, R., Domanowski, A., Jaszewski, R., Czanko, R., McCurdy, B., Prasad, M., Fromm, B. and Calzada, R. (1991) Neutrophil chemotaxis in gastric mucosa. A signal-to-response comparison. Dig. Dis. Sci. 36, 1277–1280.
- [4] Suzuki, M., Miura, S. and Suematsu, M. (1993) *Helicobacter pylori* elicits gastric mucosal cell damage associated with neutrophil-derived toxic oxidants. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 5, S35–S39.
- [5] Ernst, P.B., Crowe, S.E. and Reyes, V. (1997) How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? The inflammatory response. Gastroenterology 113, S35–S42.
- [6] Cover, T.L., Dooley, C.P. and Blaser, M.J. (1990) Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect. Immun. 58, 603–610.
- [7] Papini, E., Satin, B., Norais, N., de Bernard, M., Telford, J.L., Rappuoli, R. and Montecucco, C. (1998) Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. J. Clin. Invest. 102, 813–820.
- [8] Crabtree, J.E., Kersulyte, D., Li, S.D., Lindley, I.J. and Berg, D.E. (1999) Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. J. Clin. Pathol. 52, 653–657.
- [9] Fujiwara, Y., Higuchi, K., Fukuda, T., Watanabe, T., Tominaga, K. and Arakawa, T. (2001) Inhibitory effect of sofalcone on tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 beta production in human monocytes stimulated by *Helicobacter pylori* water extract. Drugs Exp. Clin. Res. 27, 103–106.
- [10] Evans Jr., D.J., Evans, D.G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D.Y., Granger, D.N. and Kvietys, P.R. (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. Infect. Immun. 63, 2213–2220.
- [11] Satin, B., Giudice, G.D., Bianca, V.D., Dusi, S., Laudanna, C., Tonello, F., Kelleher, D., Rappuoli, R., Montecucco, C. and Rossi, F. (2000) The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. J. Exp. Med. 191, 1467–1476.
- [12] Kim, J.S., Kim, J.M., Jung, H.C. and Song, I.S. (2001) Expression of cyclooxygenase-2 in human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins: possible involvement of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathway. Dig. Dis. Sci. 46, 2277–2284.
- [13] Nielsen, H., Birkholz, S., Andersen, L.P. and Moran, A.P. (1994) Neutrophil activation by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. J. Infect. Dis. 170, 135–139.
- [14] Bliss Jr., C.M., Golenbock, D.T., Keates, S., Linevsky, J.K. and Kelly, C.P. (1998) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to

- CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemoattractant protein 1 by human monocytes. *Infect. Immun.* 66, 5357–5363.
- [15] Bylund, J., Karlsson, A., Boulay, F. and Dahlgren, C. (2002) Lipopolysaccharide-induced granule mobilization and priming of the neutrophil response to *Helicobacter pylori* peptide Hp(2–20), which activates formyl peptide receptor-like 1. *Infect. Immun.* 70, 2908–2914.
- [16] Konturek, S.J., Brzozowski, T., Konturek, P.C., Kwicien, S., Karczewska, E., Drozdowicz, D., Stachura, J. and Hahn, E.G. (2000) *Helicobacter pylori* infection delays healing of ischaemia-reperfusion induced gastric ulcerations: new animal model for studying pathogenesis and therapy of *H. pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 1299–1313.
- [17] Konno, S. and Tsurufuji, S. (1983) Induction of zymosan-air-pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anticomplementary and anti-inflammatory agents. *Br. J. Pharmacol.* 80, 269–277.
- [18] Martin, S.W., Stevens, A.J., Brennan, B.S., Davies, D., Rowland, M. and Houston, J.B. (1994) The six-day-old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carageenan. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 32, 139–147.
- [19] Yoshino, S. (1995) Patterns of prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> production in inflammation induced by peptidoglycan-polysaccharide polymers of bacterial cell walls. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 137–144.
- [20] Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M. and Gejyo, F. (1999) The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 25, 313–321.
- [21] Ho, S.A., Hoyle, J.A., Lewis, F.A., Secker, A.D., Cross, D., Mapstone, N.P., Dixon, M.F., Wyatt, J.I., Tompkins, D.S. and Taylor, G.R. (1991) Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2543–2549.
- [22] Bickley, J., Owen, R.J., Fraser, A.G. and Pounder, R.E. (1993) Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J. Med. Microbiol.* 39, 338–344.
- [23] Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z. and Figura, N. (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5791–5795.
- [24] Atherton, J.C., Cao, P., Peck, R.M., Tummuru, M.K., Blaser, M.J. and Cover, T.L. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270, 17771–17777.
- [25] van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Sanna, R., Plaisier, A., Schneeberger, P., de Boer, W. and Quint, W. (1998) Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115, 58–66.
- [26] Satin, B., Dei Giudice, G., Della Bianca, V., Dusi, S., Laudanna, C., Tonello, F., Kelleher, D., Rappuoli, R., Montecucco, C. and Rossi, F. (2000) The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J. Exp. Med.* 191, 1467–1476.
- [27] Edwards, J.C., Sedgwick, A.D. and Willoughby, D.A. (1981) The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J. Pathol.* 134, 147–156.
- [28] Akyon, Y. and Hascelik, G. (1999) The effect of *Helicobacter pylori* on neutrophil chemotaxis is independent of *cagA*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24, 209–213.
- [29] Hansen, P.S., Go, M.F., Varming, K., Andersen, L.P., Graham, D.Y. and Nielsen, H. (1999) Proinflammatory activation of neutrophils and monocytes by *Helicobacter pylori* is not associated with *cagA*, *vacA* or *picB* genotypes. *APMIS* 107, 1117–1123.
- [30] Nielsen, H. and Andersen, L.P. (1992) Chemotactic activity of *Helicobacter pylori* sonicate for human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *Gut* 33, 738–742.
- [31] Bliss Jr., C.M., Golenbock, D.T., Keates, S., Linevsky, J.K. and Kelly, C.P. (1998) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemoattractant protein 1 by human monocytes. *Infect. Immun.* 66, 5357–5363.
- [32] Smith, W.L., Garavito, R.M. and De Witt, D.L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271, 33157–33160.
- [33] Henderson Jr., W.R. (1994) The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Intern. Med.* 121, 684–697.
- [34] Maloney, C.G., Kutchera, W.A., Albertine, K.H., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. and Zimmerman, G.A. (1998) Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J. Immunol.* 160, 1402–1410.
- [35] Franco, L., Talamini, G., Carra, G. and Doria, D. (1999) Expression of COX-1, COX-2, and inducible nitric oxide synthase protein in human gastric antrum with *Helicobacter pylori* infection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 58, 9–17.
- [36] Cassatella, M.A., Gasperini, S. and Russo, M.P. (1997) Cytokine expression and release by neutrophils. *Ann. NY Acad. Sci.* 832, 233–242.
- [37] Kim, J.S., Jung, H.C., Kim, J.M., Song, I.S. and Kim, C.Y. (1998) Interleukin-8 expression by human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *Scand. J. Gastroenterol.* 33, 1249–1255.



## Pantoprazole treatment does not invoke anti-inflammatory properties in vivo

Tagliane Liza Becker, Marta Maróstica, Marcelo Lima Ribeiro, Sérgio de Mendonça, Alessandra Gambero\*, José Pedrazzoli Jr.

Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School,  
Av. São Francisco de Assis 218, 12916-900, Bragança Paulista, SP, Brazil

Received 4 February 2004; received in revised form 24 March 2004; accepted 14 April 2004

### Abstract

**Background and aims:** Proton pump inhibitors (PPIs) are antiulcer agents that have gastric antisecretory and mucosal protective actions. The antisecretory effect of these agents derives from the inhibition of gastric parietal cell proton pump  $H^+/K^+$  ATPase. The exact mechanism of PPI-induced gastric mucosal protection is not known though. It has been suggested that PPI may accumulate, modulating the functions of neutrophils and, thus, may be useful in reducing the gastric mucosal injury caused by these cells. However, these same mechanisms may not be desirable when PPIs are prescribed in prophylaxis and pre-operatively for ill or immunodepressed patients. The present study was designed to examine a possible anti-neutrophil activity of pantoprazole in vivo. A short study with omeprazole and lansoprazole was also performed. **Methods:** Dosages of PPIs able to inhibit basal acid secretion (10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>) were administered intraperitoneally (i.p.) to rats for 7 or 28 days. Cimetidine (100 mg kg<sup>-1</sup>) and dexamethasone (0.75 mg kg<sup>-1</sup>) were used as controls for antisecretory and anti-inflammatory activity, respectively. Air pouches were then developed in these animals, and *Helicobacter pylori* suspension or carrageenan was used as inflammatory stimulus. Exudate formation and leukocyte migration to air pouches were assessed. **Results:** Neither short nor long treatment with pantoprazole modified the ability of neutrophils to migrate in response to carrageenan or *H. pylori*. The same results were obtained when omeprazole or lansoprazole was used. Dexamethasone, alone, a potent anti-inflammatory drug, was able to reduce polymorphonuclear and mononuclear cell migration. **Conclusion:** Based on these observations, pantoprazole and other PPIs seem to have no anti-inflammatory properties in vivo.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Air pouch; *Helicobacter pylori*; Carrageenan; Proton pump inhibitors; Dexamethasone; Neutrophil

### 1. Introduction

Proton pump inhibitors (PPIs) are widely prescribed for the treatment of gastro-oesophageal

reflux disease, as well as gastric and duodenal ulcers, and these agents are now considered the drugs of choice for managing such acid-related disorders. The first generation of PPIs includes omeprazole, pantoprazole and lansoprazole, agents that share a common mechanism of action; dose-dependently inhibiting the  $H^+/K^+$  ATPase gastric parietal cell proton pump, thus reducing basal and stimulated gastric acid secretion and raising intra-

\* Corresponding author. Tel.: +55-11-4034-8024; fax: +55-11-4034-1825.

E-mail address: alessandragambero@saofrancisco.edu.br (A. Gambero).

gastric pH [1]. Conversely, it has been postulated that the success of pharmacological treatments that aim to prevent or heal peptic ulcer disease occurs via mechanisms unrelated to the inhibition of acid secretion [2]. These drugs seem to be able to increase production of prostaglandins and sulfhydryl compounds to the level of the gastric mucosa [3]. Proton pump inhibitors have been proposed to inhibit, in vitro, neutrophil functions such as chemotaxis, superoxide production, degranulation and phagocytosis [4–6]. Additionally, these compounds can attenuate the surface expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells, and subsequent leukocyte adhesion to endothelial cells [7]. These anti-neutrophil properties could be beneficial, since activated neutrophils play a critical role in the gastric mucosal injury associated with *Helicobacter pylori* infection or with administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs [8,9]. However, these same properties may not be desirable in critically ill patients, since these drugs are administered pre-operatively for prophylaxis against aspiration pneumonia or stress ulceration [10].

In the present study, we examined whether short and long pantoprazole treatment exerts an in vivo effect on the inflammatory response induced by *H. pylori* or carrageenan in the rat air pouch model. We also briefly examined the profile of other PPIs, such as omeprazole and lansoprazole.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *H. pylori* culture conditions

In this study, we used the *H. pylori* strain 551 [11]. Bacteria were routinely grown on brain heart infusion supplemented with 2.5 g l<sup>-1</sup> yeast extract and 10% lysed sheep blood, 6 mg l<sup>-1</sup> vancomycin, 20 mg l<sup>-1</sup> nalidixic acid, 2 mg l<sup>-1</sup> amphotericin B, 40 mg l<sup>-1</sup> 2,3,5, triphenyl-tetrazolium chloride, followed by incubation for 48–72 h at 37 °C under microaerophilic conditions (8–10% CO<sub>2</sub>, 5–6% O<sub>2</sub>, 80–85% N<sub>2</sub>, at 98% humidity). The identity of the colony was confirmed by Gram staining and oxidase, catalase and urease production.

### 2.2. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) free of specific pathogens were obtained from CEMIB (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil). The experiments were performed in accordance with the principles outlined by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

### 2.3. Antisecretory action

To determine the ability of antisecretory drugs in the inhibition of gastric acid production, the rats were treated intraperitoneally (i.p.) with pantoprazole (1–100 mg kg<sup>-1</sup>), omeprazole (100 mg kg<sup>-1</sup>), lansoprazole (100 mg kg<sup>-1</sup>), cimetidine (100 mg kg<sup>-1</sup>) or dimethyl sulfoxide vehicle (DMSO 1:10 v/v). After 1 h, under anesthesia, the abdomen was incised and the pylorus was ligated. Rats were sacrificed 4 h after pylorus ligation. The gastric contents were collected and the acidity determined. Acidity was determined with a pH meter by titration against 0.01 M NaOH to pH 7.0 [12].

### 2.4. Air pouch model

Air pouches were produced as described elsewhere [13] in group of animals that had been

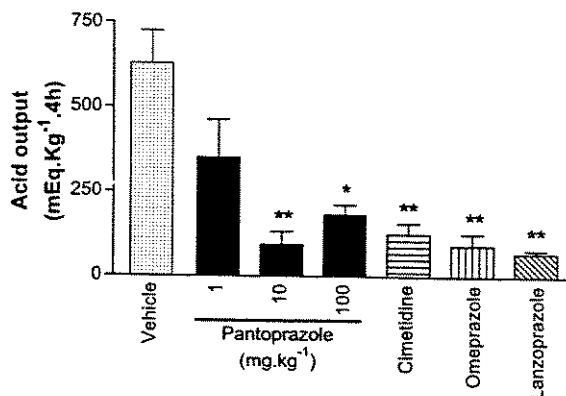


Fig. 1. Effect of pantoprazole 1, 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, omeprazole 100 mg kg<sup>-1</sup>, lansoprazole 100 mg kg<sup>-1</sup> and cimetidine 100 mg kg<sup>-1</sup> administered i.p. on basal secretion in pylorus-ligated rats. The columns represent the means ± S.E.M. of four rats. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 compared to the vehicle group (DMSO).

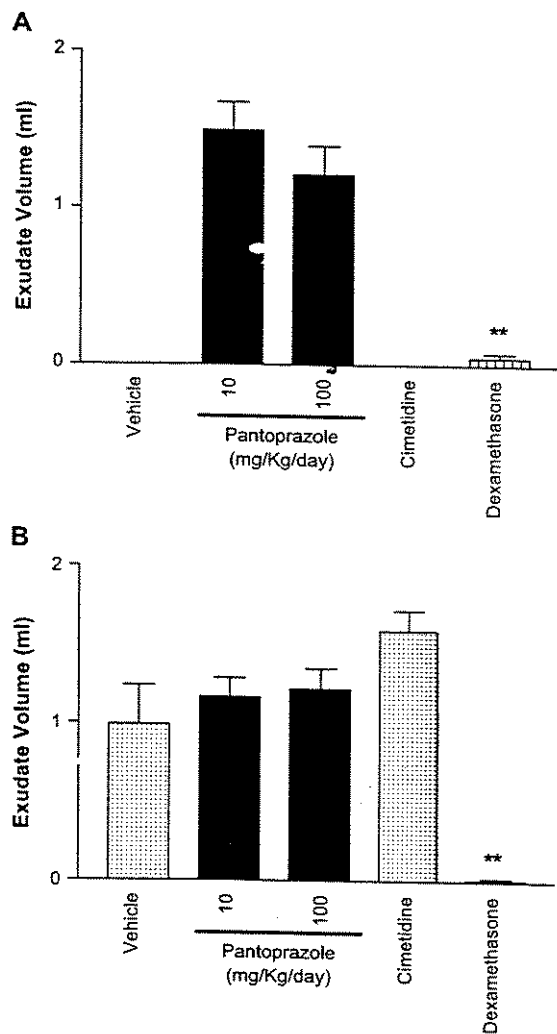


Fig. 2. Volume of exudate collected 6 h after the injection of carrageenan in air pouches of rats previously treated i.p. with vehicle (DMSO), pantoprazole 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, cimetidine 100 mg kg<sup>-1</sup> or dexamethasone 0.75 mg kg<sup>-1</sup> for 7 (panel A) or 28 days (panel B). The columns represent the means  $\pm$  S.E.M. of 5–10 rats. \*\* $p$  < 0.01 compared to the vehicle group.

previously treated for 7 or 28 days with pantoprazole (10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>), cimetidine (100 mg kg<sup>-1</sup>) or dexamethasone (0.75 mg kg<sup>-1</sup>) and 7 days with omeprazole (100 mg kg<sup>-1</sup>) or lansoprazole (100 mg kg<sup>-1</sup>). Briefly, 20 ml of sterile air was injected subcutaneously in the dorsal skin of rats. Three days later, another 10 ml of air was injected at the same site. On the sixth day after the

first injection, the pouch received 2 ml of an *H. pylori* suspension ( $6 \times 10^8$  bacteria ml<sup>-1</sup>) or 2 ml of a 1% solution of carrageenan both dissolved in phosphate-buffered solution (PBS). Six hours after the injection of inflammatory stimulus, the rats were anesthetized and the pouch was carefully

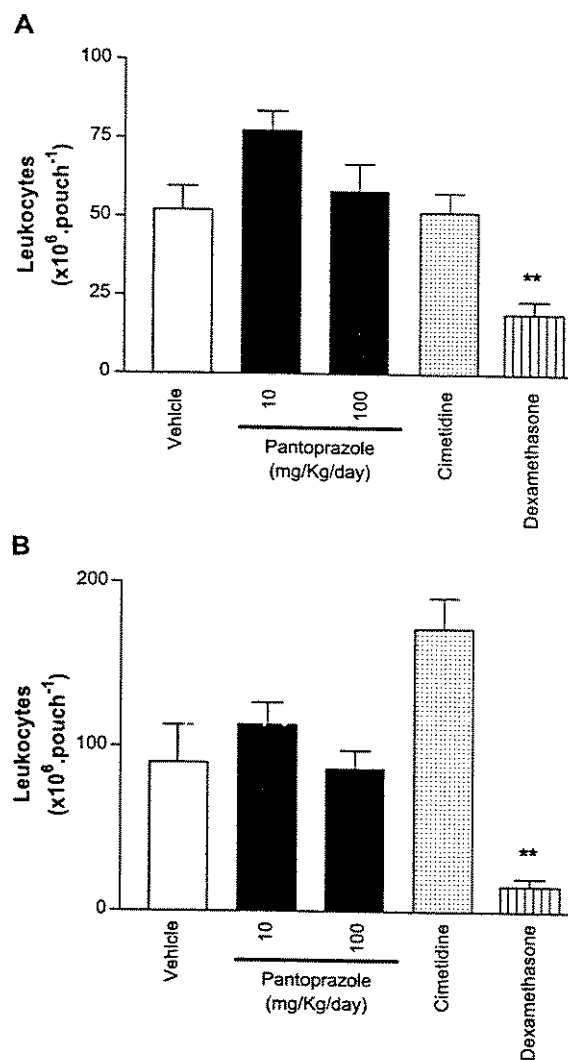


Fig. 3. Leukocyte counts in inflammatory exudates from air pouches injected with carrageenan in rats previously treated i.p. with vehicle (DMSO), pantoprazole 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, cimetidine 100 mg kg<sup>-1</sup> or dexamethasone 0.75 mg kg<sup>-1</sup> for 7 (panel A) or 28 days (panel B). The columns represent the means  $\pm$  S.E.M. of 5–10 rats. \*\* $p$  < 0.01 compared to the vehicle group.

opened by a small incision. The exudate was collected and transferred to a sterile tube and the exudate volume was measured gravimetrically. An aliquot of the exudate was used to determine the leukocyte number in an automatic counter (Celm 550, Brazil). The profile of infiltrated cells was determined in exudate smears stained with May–Grunwald–Giemsa. A sample of blood was drawn from the inferior vena cava for determination of leukocyte numbers. Control rats received only intraperitoneal DMSO (1:10 v/v).

### 2.5. Statistical analysis

All data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Comparisons among groups were performed using one-way analysis of variance followed by the Student *t* test or Dunnett multiple comparisons test, when convenient. An associated probability (*p* value) of less than 5% was considered significant.

### 2.6. Materials

The brain heart infusion and yeast extract were obtained from Difco (Detroit, MI, USA). Sheep blood was purchased from BBV (Campinas, SP, Brazil). Vancomycin, nalidixic acid, amphotericin B, 2,3,5, triphenyl-tetrazolium chloride, cimetidine, DMSO, carrageenan, dexamethasone and May–Grunwald–Giemsa were obtained from Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, MO, USA). Pantoprazole, omeprazole and lansoprazole were purchased from Galena (Campinas, SP, Brazil).

## 3. Results

### 3.1. Characterization of antisecretory action

The i.p. administration of pantoprazole followed by pylorus ligation in rats results in a dose-dependent inhibition of basal acid secretion at 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup> (*p* < 0.01 and *p* < 0.05, respectively). Other PPIs, such as omeprazole and lansoprazole at a dose of 100 mg kg<sup>-1</sup>, efficiently reduced the acid gastric content (*p* < 0.01). Cimetidine at a dosage of 100 mg kg<sup>-1</sup>, used as a comparative antisecretory drug, was also able to inhibit the same parameter (Fig. 1). The effective dosages of pantoprazole (10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>) and cimetidine (100 mg kg<sup>-1</sup>) were used for further experiments. One set of experiment was carried out with omeprazole and lansoprazole at doses of 100 mg kg<sup>-1</sup>.

### 3.2. Effects of antisecretory drugs on the inflammatory response

The inflammation induced by subcutaneous injection of carrageenan solution in the back of animals results in a significant plasma exudation reaching 1.51  $\pm$  0.2 ml, whilst the injection of sterile PBS formed 0.09  $\pm$  0.06 ml. These values are significantly different (*p* < 0.001). The treatment with 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup> pantoprazole or 100 mg kg<sup>-1</sup> cimetidine (i.p.) for 7 or 28 days did not modify the volume of plasma exudation (Fig. 2). A steroidal anti-inflammatory drug, dexamethasone was used as a positive control for anti-inflammatory properties. The treat-

Table 1

The numbers of polymorphonuclear cells (PMN) and mononuclear cells (MN) in air pouches 6 h after the injection of carrageenan in rats previously treated with vehicle (DMSO), pantoprazole 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, cimetidine 100 mg kg<sup>-1</sup> or dexamethasone 0.75 mg kg<sup>-1</sup> for 7 or 28 days

Treatment	7 days		28 days	
	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )
Vehicle	46.04 $\pm$ 6.79	5.96 $\pm$ 1.20	82.19 $\pm$ 20.59	8.07 $\pm$ 1.93
Pantoprazole 10 mg kg <sup>-1</sup>	69.30 $\pm$ 5.64	7.47 $\pm$ 1.18	97.64 $\pm$ 8.87	15.66 $\pm$ 4.78
Pantoprazole 100 mg kg <sup>-1</sup>	46.75 $\pm$ 9.26	5.56 $\pm$ 1.01	79.73 $\pm$ 10.42	7.07 $\pm$ 1.55
Cimetidine 100 mg kg <sup>-1</sup>	45.72 $\pm$ 5.87	5.82 $\pm$ 0.72	156.72 $\pm$ 13.60	15.49 $\pm$ 3.55
Dexamethasone 0.75 mg kg <sup>-1</sup>	17.49 $\pm$ 3.18**	1.85 $\pm$ 1.15**	14.65 $\pm$ 4.18**	1.10 $\pm$ 0.46**

Values are the means  $\pm$  S.E.M. of 5–10 rats.

\*\**p* < 0.01 compared to the respective vehicle group (DMSO).

ment with  $0.75 \text{ mg kg}^{-1}$  of dexamethasone (i.p.) during 7 and 28 days exerted a potent anti-exudative effect ( $p < 0.01$ ).

The injection of carrageenan resulted in an influx of a mean of  $52.00 \pm 7.78 \times 10^6$  cells, whilst PBS resulted in a influx of a mean of  $6.93 \pm 1.09 \times 10^6$  cells. These values are also significantly different ( $p < 0.001$ ). Treatment with pantoprazole for 7 or 28 days was not able to modify the carrageenan-induced leukocyte accumulation in rat air pouches. Short- and long-term treatments with dexamethasone effectively reduced the number of cells present 6 h after carrageenan administration ( $p < 0.01$ ; Fig. 3). Neutrophils are the predominant type of leukocyte found 6 h after carrageenan injection (Table 1) and dexamethasone was able to reduce polymorphonuclear neutrophil and mononuclear cells migration ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). The carrageenan injection was performed at 7 days in omeprazole and lansoprazole-treated groups, and these PPIs were unable to reduce the exudation and leukocyte migration (data not shown).

When *H. pylori* was used as an inflammatory stimulus, there was no exudate formation into air pouches (data not shown), but a significant leukocyte migration may be observed (Fig. 4). In this set of experiments, only the treatment with  $0.75 \text{ mg kg}^{-1}$  dexamethasone for 7 and 28 days was able to inhibit the leukocyte migration induced by *H. pylori* ( $p < 0.05$ ). The treatment with pantoprazole and cimetidine did not modify the profile of cells that migrated into the air pouches after *H. pylori* administration. Neutrophils are also the predominant type of leukocyte found 6 h after *H. pylori* injection (Table 2) and short and long dexamethasone administration was able to reduce the content of polymorphonuclear neutrophils and mononuclear cells (Table 2).

The amount of leukocytes in the peripheral blood of all groups was assessed and a differential count was performed. No significant changes were observed in the number of leukocytes present in the peripheral blood of groups treated with pantoprazole, omeprazole, lansoprazole, cimetidine or dexamethasone (data not shown). The differential count demonstrates a reduced number of mononuclear cells present in the peripheral blood of animals treated with dexamethasone for 7 days ( $2.77 \pm 0.32 \times 10^6$  leukocytes  $\text{ml}^{-1}$  and  $0.71 \pm 0.12 \times 10^6$  leukocytes  $\text{ml}^{-1}$  for control and treated

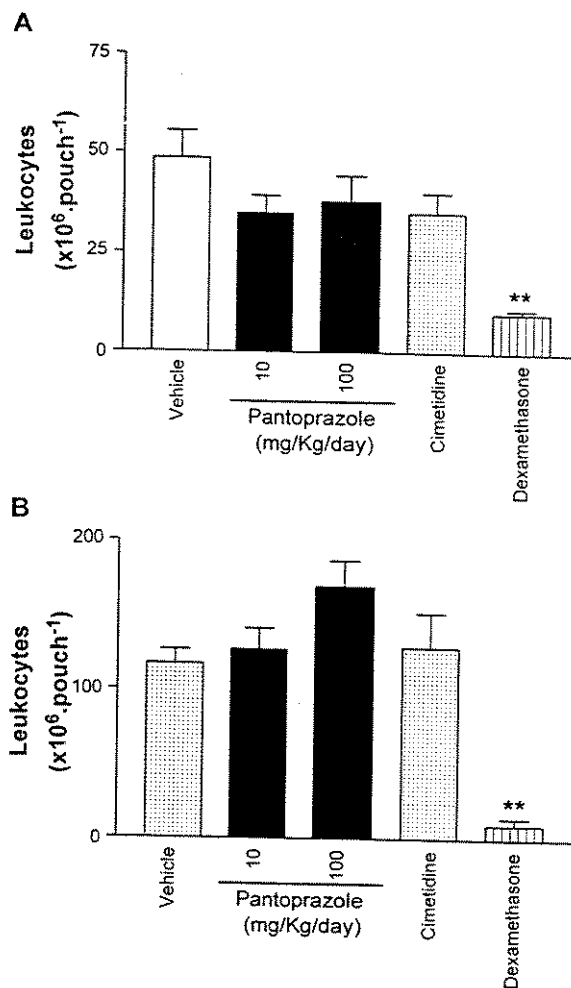


Fig. 4. Leukocyte counts in inflammatory exudates from air pouches injected with *H. pylori* suspension in rats previously treated i.p. with vehicle (DMSO), pantoprazole 10 and 100  $\text{mg kg}^{-1}$ , cimetidine 100  $\text{mg kg}^{-1}$  or dexamethasone 0.75  $\text{mg kg}^{-1}$  for 7 (panel A) or 28 days (panel B). The columns represent the means  $\pm$  S.E.M. of five rats. \*\* $p < 0.01$  compared to the vehicle group.

with dexamethasone, respectively,  $p < 0.01$ ) and 28 days ( $1.73 \pm 0.14 \times 10^6$  leukocytes  $\text{ml}^{-1}$  and  $0.49 \pm 0.11 \times 10^6$  leukocytes  $\text{ml}^{-1}$  for control and treated with dexamethasone, respectively,  $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The migration of PMN cells, in vivo, is dependent upon their interaction with endothelial cells, and this

Table 2

The numbers of polymorphonuclear cells (PMN) and mononuclear cells (MN) in air pouches 6 h after the injection of *H. pylori* suspension in rats previously treated with vehicle (DMSO), pantoprazole 10 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, cimetidine 100 mg kg<sup>-1</sup> or dexamethasone 0.75 mg kg<sup>-1</sup> for 7 or 28 days

Treatment	7 days		28 days	
	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )	PMN ( $\times 10^6$ )	MN ( $\times 10^6$ )
Vehicle	41.91 $\pm$ 6.36	6.59 $\pm$ 0.62	111.00 $\pm$ 8.44	7.81 $\pm$ 1.34
Pantoprazole 10 mg kg <sup>-1</sup>	30.23 $\pm$ 3.95	4.60 $\pm$ 0.89	178.89 $\pm$ 58.25	6.78 $\pm$ 1.93
Pantoprazole 100 mg kg <sup>-1</sup>	32.35 $\pm$ 5.89	5.69 $\pm$ 1.14	162.34 $\pm$ 15.96	7.12 $\pm$ 1.64
Cimetidine 100 mg kg <sup>-1</sup>	30.26 $\pm$ 4.39	4.65 $\pm$ 0.68	87.97 $\pm$ 13.60	5.54 $\pm$ 2.13
Dexamethasone 0.75 mg kg <sup>-1</sup>	7.56 $\pm$ 0.95**	2.29 $\pm$ 0.45**	9.86 $\pm$ 4.41**	0.63 $\pm$ 0.24**

Values are the means  $\pm$  S.E.M. of 5–10 rats.

\*\* $p < 0.01$  compared to the respective vehicle group (DMSO).

process is facilitated by various coordinately regulated adhesion complexes that initiate ligand receptor interactions in response to appropriate inflammatory stimuli [14]. The CD11/CD18 integrin family plays a major role in the adhesion and transendothelial migration of PMN in vitro and in vivo, whilst intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) are expressed on activated endothelial cells [15]. Several reports have been published demonstrating the accumulation of proton pump inhibitors, mainly omeprazole, in PMN cells and their modulation of cell function. A reduced PMN migration, in vitro, in response to chemoattractants such as fMLP- or zymosan-activated serum was observed when cells were previously incubated with omeprazole [4]. Omeprazole and lansoprazole also prevented, in vitro, the surface expression of CD11b and CD18 on PMN and PMN adherence to endothelial cells stimulated with *H. pylori* extract [7,16]. Therefore, the present study demonstrates that short- and long-duration treatments with the proton pump inhibitor, pantoprazole, at doses high enough to suppress acid gastric secretion, do not modify the ability of PMN cells to migrate to inflammatory foci nor do they reduce the exudation in response to carrageenan, a non-specific inflammatory stimulus. The same results were observed following short treatments with omeprazole and lansoprazole. The irritant, carrageenan, is widely used in different experimental models of inflammation, resulting in exudation and leukocyte migration dependent upon generation of several mediators of inflammation [17].

We have previously demonstrated that the injection of *H. pylori* in rat air pouches evokes a pronounced

neutrophil migration after 6 h parallel to increased prostaglandin, interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor production. This neutrophil migration is dependent upon the amount of bacteria injected but independent of strain genotype, suggesting that this response is mediated by LPS or small protein fragments from *H. pylori* [11]. Although *H. pylori* was not able to colonize rat stomachs, this experimental model may represent a useful tool for studying the leukocyte–bacteria interaction and the activity of drugs that may modulate this interaction. Again, treatment with pantoprazole was unable to reduce the ability of leukocytes to migrate in response to *H. pylori*. Only dexamethasone, a classical anti-inflammatory drug, was able to reduce the number of cells present in the air pouches after both inflammatory stimulus and exudation induced by carrageenan. Steroidal anti-inflammatory drugs are powerful inhibitors of leukocyte trafficking in inflammation. Multiple mechanisms have been proposed to account for this action, including inhibition of adhesion molecule expression on endothelial cells and PMN [18]. The administration of these drugs induces synthesis and surface expression of lipocortin-1 on PMN and monocyte cells, and it has been suggested that lipocortin-1 acts as a second messenger for the inhibition of leukocyte migration [18].

A case of leukopenia associated with omeprazole therapy was reported as the result of an autoimmune reaction. The leukopenia began 72 h after omeprazole treatment and was maximal on day 22 [19]. In addition, lansoprazole was able to decrease the number of monocyte cells by a mechanism independent of its antisecretory action [20]. In contrast to this reports, in the animals treated for 7 and 28 days with pantoprazole

or for 7 days with other PPIs, we did not observe changes in the total number of leukocytes counted in the peripheral blood at the end of treatment.

Based on our observations, we suggest that pantoprazole and other PPIs do not possess desirable or undesirable anti-inflammatory actions in vivo.

### Acknowledgements

We thank FAPESP, Brazil, for supporting this work.

### References

- [1] Caro JJ, Salas M, Ward A. Healing and relapse rates in gastroesophageal reflux disease treated with the newer proton-pump inhibitors lansoprazole, rabeprazole, and pantoprazole compared with omeprazole, ranitidine, and placebo: evidence from randomized clinical trials. *Clin Ther* 2001;23:998–1017.
- [2] Konturek SJ, Brzozowski T, Radecki T. Protective action of omeprazole, a benzimidazole derivative, on gastric mucosal damage by aspirin and ethanol in rats. *Digestion* 1983;27:59–64.
- [3] Biandizzi C, Natale G, Gherardi G, Lazzeri G, Marveggio C, et al. Gastroprotective effects of pantoprazole against experimental mucosal damage. *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14:89–99.
- [4] Wandall JH. Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, super oxide production, degranulation, and translocation of cytochrome *b*-245. *Gut* 1992;33:617–21.
- [5] Suzuki M, Mori M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, et al. Omeprazole attenuates oxygen-derived free radical production from human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1996;21:727–31.
- [6] Agastya G, West BC, Callahan JM. Omeprazole inhibits phagocytosis and acidification of phagolysosomes of normal human neutrophils in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000;22:357–72.
- [7] Yoshida N, Yoshikawa T, Tanaka Y, Fujita N, Kassai K, et al. A new mechanism for anti-inflammatory actions of proton pump inhibitors—inhibitory effects on neutrophil–endothelial cell interactions. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:74–81.
- [8] Crabtree JE. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10:29–37.
- [9] Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol* 1990;259:G462–7.
- [10] Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Niwa Y. Effects of pirenzepine, omeprazole, lansoprazole, and rabeprazole on human neutrophil functions. *Can J Anaesth* 2001;48:421–2.
- [11] Gambero A, Becker TL, Gurgueira SA, Benvengo YH, Ribeiro ML, et al. Acute inflammatory response induced by *Helicobacter pylori* in the rat air pouch. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:193–8.
- [12] Shay H, Komarov AS, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Sipler H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rats. *Gastroenterology* 1945;5:43–61.
- [13] Edwards JC, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol* 1981;134:147–56.
- [14] Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:485–516.
- [15] Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte–endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068–101.
- [16] Suzuki M, Mori M, Fukumura D, Suzuki H, Miura S, Ishii H. Omeprazole attenuates neutrophil–endothelial cell adhesive interaction induced by extracts of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:27–31.
- [17] Salvemini D, Manning PT, Zweifel BS, Seibert K, Connor J, et al. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. *J Clin Invest* 1995;96:301–8.
- [18] Perretti M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte–endothelium interaction. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:418–25.
- [19] Odou P, Martin P, Membre S, Gressier B, Tamiji L, et al. Omeprazole-induced leukopenia. A case report. *J Clin Pharm Ther* 1999;24:317–21.
- [20] Ohara T, Arakawa T. Lansoprazole decreases peripheral blood monocytes and intercellular adhesion molecule-1-positive mononuclear cells. *Dig Dis Sci* 1999;44:1710–5.



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 734-1, sobre "ESTUDO "IN VIVO" DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA INDUZIDA POR INIBIDORES DE SECREÇÃO ÁCIDA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Pedrazzoli Junior / Tagliari Liza Becker está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 07 de Outubro de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 734-1, entitled "ANTI-INFLAMMATORY ACTION INDUCED BY ANTI-SECRETORY DRUGS" is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 7, 2004.

Campinas, 07 de outubro de 2004.

Prof. Dra. Liene Verinacci  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP