

MARTA CONTIERI MARÓSTICA

**“EFEITO DO TRATAMENTO COM INIBIDORES DE
SECREÇÃO ÁCIDA NA INFECÇÃO POR *HELICOBACTER*
PYLORI EM CAMUNDONGOS”**

CAMPINAS

2007

MARTA CONTIERI MARÓSTICA

**“EFEITO DO TRATAMENTO COM INIBIDORES DE
SECREÇÃO ÁCIDA NA INFECÇÃO POR *HELICOBACTER
PYLORI* EM CAMUNDONGOS”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas, área de concentração em Patologia Clínica.*

Orientadora: Prof^a. Dr^a Nelci Fenalti Hoehr

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Alessandra Gambero

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M347e Maróstica, Marta Contieri
Efeito do tratamento com inibidores de secreção ácida na infecção por *Helicobacter Pylori* em camundongos / Marta Contieri Maróstica. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Nelci Fenalti Höer, Alessandra Gambero
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Omeprazol. 3. Apoptose. I. Höer, Nelci Fenalti. II. Gambero, Alessandra. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Effects of a one-week treatment with acid gastric inhibitors on *Helicobacter pylori*-infected mice

Keywords: • *Helicobacter pylori*
• Omeprazole
• Apoptosis

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Patologia Clínica

Banca examinadora:

Profa. Dra Nelci Fenalti Höer
Profa. Dra. Nicola Conran
Profa. Dra. Carla Fernanda Franco Penteado

Data da defesa: 30 - 08 - 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M347e

Maróstica, Marta Contieri

Efeito do tratamento com inibidores de secreção ácida na infecção por *Helicobacter Pylori* em camundongos / Marta Contieri Maróstica. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Nelci Fenalti Höer, Alessandra Gambero

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Omeprazol. 3. Apoptose. I. Höer, Nelci Fenalti. II. Gambero, Alessandra. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	UNICAMP
V	Ex.
TOMBO FUCL	15230
PROC.	16.145-07
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	11/12/07
BIB-ID	418701

Título em inglês : Effects of a one-week treatment with acid gastric inhibitors on *Helicobacter pylori*-infected mice

Keywords: • *Helicobacter pylori*

• Omeprazole

• Apoptosis

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Patologia Clínica

Banca examinadora:

Profa. Dra Nelci Fenalti Höer

Profa. Dra. Nicola Conran

Profa. Dra. Carla Fernanda Franco Penteado

Data da defesa: 30 - 08 - 2007

200454605

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Nelci Fenalti Höehr

Membros:

1. Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr – *Nelci Fenalti Höehr*
 2. Profa. Dra. Nicola Conran Zorzetto – *N. C.*
 3. Profa. Dra. Carla Fernanda Franco Penteado – *Carla Penteado*
-

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional em todas as minhas decisões.

Ao Marcos, pelo amor, paciência e compreensão durante todo esse longo processo, além das discussões científicas que enriqueceram este trabalho.

À Vilma e Mário, meus sogros, que sempre estiveram do meu lado.

À Tais, Léo e Laís, pelos momentos de descontração quando eu estava muito estressada.

Ao Paulo, pelas conversas durante a madrugada que me relaxavam.

À minha primeira orientadora Alessandra, por sempre acreditar e confiar na minha capacidade, por seus conselhos e amizade.

À minha orientadora Nelci, que me recebeu na UNICAMP e acreditou no meu trabalho.

Aos membros da banca, prof^a Nicola, prof^a Carla e prof^a Soraia pelos comentários que enriqueceram meu trabalho.

Às amigas Angela e Thaís, pelas conversas e discussões sobre ciências.

A todos os colegas da UNIFAG, em especial Tagliane, por me mostrar como ser uma pesquisadora; Anita e Fernanda, pelas conversas sempre animadas; Wlad e Demétrius, pela ajuda nos experimentos.

Às minhas colegas da FCM, em especial Fernanda, por me ajudar muito durante as aulas e durante o processo de qualificação.

Ao prof. José Pedrazzoli Jr, por permitir o desenvolvimento dos experimentos na UNIFAG.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende".*

Leonardo da Vinci

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- <i>Helicobacter pylori</i>	19
1.1.1- Histórico da descoberta.....	19
1.1.2- Epidemiologia.....	20
1.1.3- Aspectos gerais.....	20
1.1.4- Colonização.....	20
1.1.5- Patogenicidade e virulência.....	22
1.2- Processo inflamatório e apoptose	23
1.3- Tratamentos clínicos	25
1.3.1- Antagonistas de receptor de histamina H ₂	26
1.3.2- Inibidores de bomba protônica.....	26
1.4- Modelo experimental	28
2- OBJETIVOS	30
3- MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1- Animais	33
3.2- Cultura de <i>H. pylori</i>	33
3.3- Determinação da atividade anti-secretora por ligadura de piloro	33
3.4- Modelo experimental de infecção por <i>H. pylori</i> e tratamento com os inibidores de secreção ácida	34

3.5- Determinação das Lesões Macroscópicas.....	34
3.6- Análise histológica.....	35
3.7- Determinação da atividade de mieloperoxidase na mucosa gástrica..	35
3.8- Extração de DNA e Avaliação dos níveis de colonização por PCR em Tempo Real.....	36
3.9- Extração de proteínas e <i>Western blot</i>.....	37
3.10- Avaliação de dano ao DNA através do Ensaio do Cometa.....	38
3.11- Análise estatística.....	39
4- RESULTADOS.....	40
4.1- Determinação da atividade anti-secretora por ligadura de piloro.....	41
4.2- Avaliação dos níveis de colonização por PCR em Tempo Real.....	43
4.3- Determinação das Lesões Macroscópicas.....	44
4.4- Análise histológica.....	45
4.5- Determinação da atividade de mieloperoxidase na mucosa gástrica..	46
4.6- Expressão de Interleucina-1β na mucosa gástrica.....	47
4.7- Expressão de proteínas apoptóticas na mucosa gástrica.....	48
4.8- Avaliação de dano ao DNA através do Ensaio do Cometa.....	50
5- DISCUSSÃO.....	51
6- CONCLUSÃO.....	56
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8- ANEXOS.....	69

<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
SS1	Sydney strain 1 (cepa de <i>Helicobacter pylori</i>)
26695	Cepa de <i>Helicobacter pylori</i>
J99	Cepa de <i>Helicobacter pylori</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
HP-NAP	Proteína ativadora de neutrófilos de <i>Helicobacter pylori</i>
PAF	Fator de ativação plaquetária
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
IFN-γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
COX-2	Ciclooxigenase-2
VacA	Citotoxina vacuolizante
<i>vacA</i>	Gene <i>vacA</i>
CagA	Proteína associada a citotoxina VacA
cagPAI	Ilha de patogenicidade cag
s	Região que codifica o sinal peptídico do gene <i>vacA</i>
s1 e s2	Alelos da região s
s1a, s1b e s1c	Subtipos do alelo s1
m	Região média do gene <i>vacA</i>
m1 e m2	Alelos da região m
<i>iceA</i>	Gene <i>iceA</i>

<i>picA</i>	Gene picA
<i>picB</i>	Gene picB
IL-8	Interleucina-8
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
DNA	Ácido desoxirribonucléico
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i> (linfoma tipo MALT)
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
ILU	Índice de lesão ulcerativa
PPIs	Inibidores de bomba protônica (proton pump inhibitors)
EPM	Erro padrão da média
ANOVA	Análise de variância
MPO	Mieloperoxidase
HE	Hematoxilina e Eosina
PBS	Tampão Fosfato Salina
HTAB	Hexadeciltrimetil brometo de amônia
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
HBSS	Hank's balanced salt solution
TCC	2,3,5, triphenyl-tetrazolium chloride
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
DTT	Dithiothreitol

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Parâmetros utilizados na determinação do índice de lesão ulcerativa.....	35

	PÁG.
Figura 1- Foto representando os possíveis danos ao DNA.....	39
Figura 2- Efeito do tratamento com omeprazol ou ranitidina sobre a secreção ácida avaliada através de ligadura de piloro.....	42
Figura 3- Níveis de colonização por <i>Helicobacter pylori</i> em animais não-infectados e infectados tratados com omeprazol ou ranitidina.	43
Figura 4- Índice de Lesão Ulcerativa nos animais não-infectados e infectados tratados com omeprazol ou ranitidina.....	44
Figura 5- Corte histológico de mucosa gástrica de animal não-infectado e presença de <i>H. pylori</i> em animais infectados.....	45
Figura 6- Atividade de mieloperoxidase na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados omeprazol ou ranitidina.....	46
Figura 7- Expressão de IL-1 β na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados omeprazol ou ranitidina.....	47
Figura 8- Níveis de expressão das proteínas Bcl-2 e Bax na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados com omeprazol ou ranitidina.....	49
Figura 9- Nível do dano ao DNA na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados com omeprazol ou ranitidina.....	50

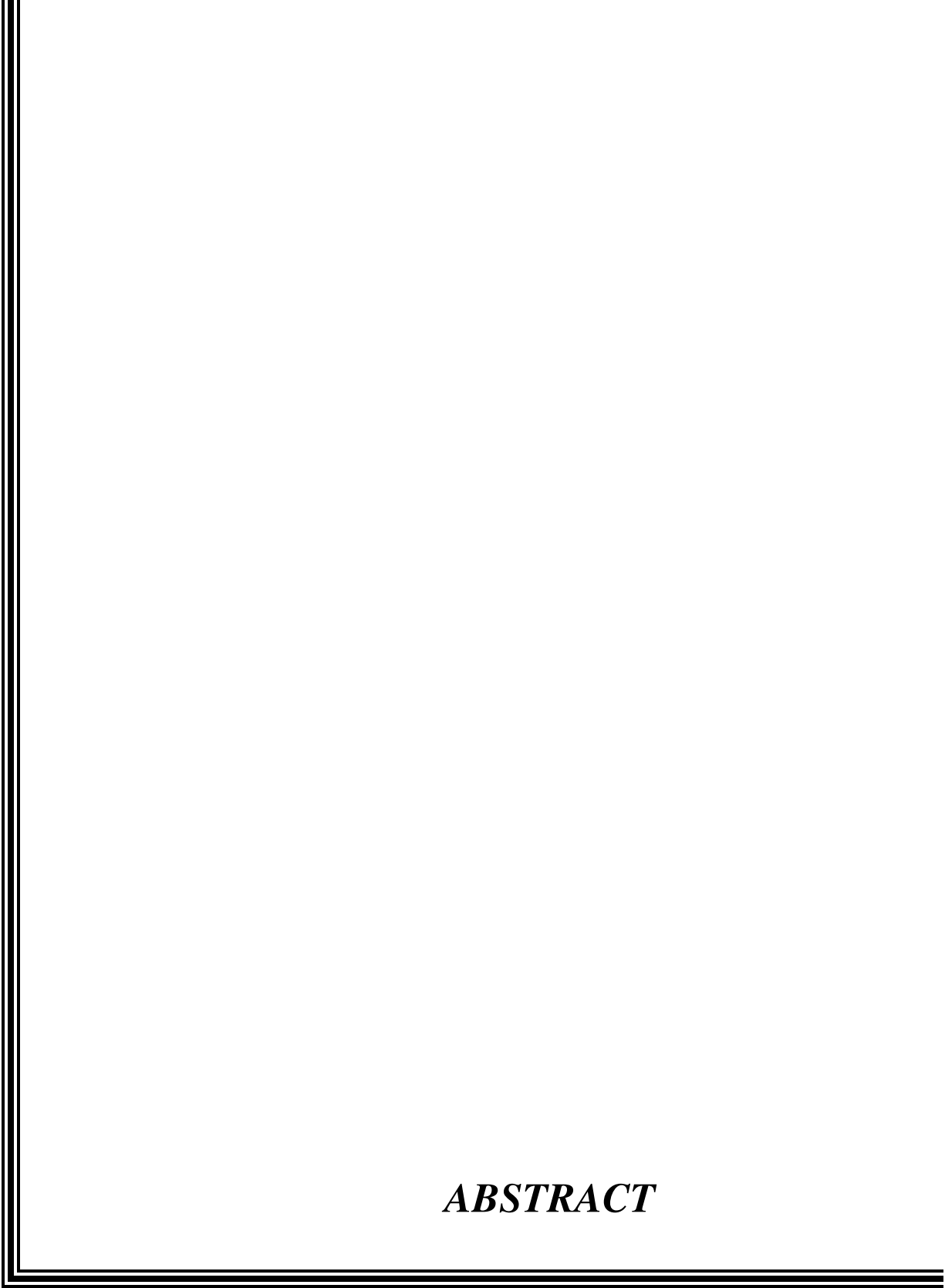
RESUMO

O mecanismo pelo qual o *H. pylori* provoca a inflamação gástrica inclui a secreção de substâncias pró-inflamatórias pela bactéria e a estimulação da liberação de citocinas induzida pelo contato direto entre a bactéria e as células epiteliais gástricas. A resposta inicial à infecção por *H. pylori* é predominantemente neutrofílica e estas, liberam mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas que induzem o dano gástrico. Estresse oxidativo ocorre em pacientes infectados com *H. pylori* onde a expressão de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), superóxido dismutase e catalase encontram-se aumentadas. A iNOS participa da resposta inflamatória e promove a apoptose de células na mucosa gástrica. Durante a infecção por *H. pylori*, observa-se níveis reduzidos da expressão de Bcl-2 e o aumento da expressão de Bax na mucosa gástrica, sugerindo que uma tendência pró-apoptótica na infecção. A erradicação pode ser alcançada pela combinação de antibióticos associada a uma droga anti-ácida. As duas maiores classes de inibidores de secreção ácida são: os inibidores de bomba protônica, como o omeprazol, e os antagonistas de receptor de histamina H₂, como a ranitidina. Várias evidências experimentais têm mostrado que o omeprazol apresenta efeitos anti-ulcerogênicos adicionais. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com omeprazol e ranitidina em um modelo animal de infecção por *H. pylori*, enfocando possíveis propriedades adicionais destes fármacos.

Para este estudo foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 4 semanas de idade. Os camundongos receberam por via oro-gástrica suspensão de *H. pylori*. Na 11ª semana de inóculo, os animais foram tratados (i.p.) com omeprazol (100 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg) ou veículo (PBS) durante 7 dias sempre no mesmo horário.

As duas drogas inibiram a produção de ácido gástrico no tratamento agudo, porém no tratamento por uma semana, apenas o omeprazol inibiu a secreção ácida. Os animais tratados com omeprazol apresentaram um aumento significativo nos níveis de colonização gástrica e elevado nível de MPO. Ambas as drogas diminuíram as lesões da mucosa provocada pela infecção. O tratamento com omeprazol restaurou a produção de Bcl-2 na mucosa gástrica e não alterou a produção de Bax. O omeprazol não protegeu a mucosa gástrica contra o dano ao DNA gerado pela infecção e o tratamento com ranitidina aumentou os níveis de dano oxidativo ao DNA.

Não observamos a presença de propriedades anti-neutrófilas, atribuídas ao omeprazol, após uma semana de tratamento, sugerindo que essas propriedades são restrita a ensaios *in vitro*. Entretanto, o omeprazol restaurou a produção de Bcl-2 na mucosa gástrica, sugerindo uma atividade anti-apoptótica dessa droga.



ABSTRACT

H. pylori induces gastric inflammation characterized by secretion of pro-inflammatory substances by bacteria and the stimulation of cytokine release by the gastric epithelial cells. The initial response to the *H. pylori* infection is predominantly by neutrophils and these cells liberate inflammatory mediators and enzymes that induce the gastric damage. Oxidative stress also occurs in infected patients where induced nitric oxide sintase (iNOS), superoxide dismutase and catalase expression were increased. Nitric oxide participates in the inflammatory response and promotes apoptosis of gastric mucosa cells. Eradication therapy can be achieved with antibacterial agents in association with anti-acid drugs. There are two major classes of gastric acid inhibitors: the proton pump inhibitors, such as omeprazole, and the histamine H₂ receptor antagonists, such as ranitidine. Some experimental evidence demonstrates that omeprazole has additional pharmacological properties. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of omeprazole and ranitidine treatment on *H. pylori*-infected mice, focusing on possible additional pharmacological properties. For this study, male C57BL/6 mice that received *H. pylori* suspension were used. After the 11th week, the mice were treated intraperitoneally (i.p.) with omeprazole (100 mg/kg), ranitidine (100 mg/kg) or vehicle (PBS) for 7 days. Both drugs inhibited the gastric acid production after acute administration; however after one week of treatment just omeprazole inhibited gastric acid secretion. Omeprazole-treated mice presented an increase in *H. pylori* and MPO levels in gastric mucosa. Both drugs reduced the mucosa damage provoked by *H. pylori* infection. Omeprazole treatment restored the Bcl-2 production in the gastric mucosa and did not modify Bax production. Omeprazole did not reduce the DNA damage in the gastric mucosa while ranitidine treatment increased it. We conclude that some additional omeprazole-related properties, such as antineutrophil properties, were not observed in *H. pylori*-infected mice after one week of treatment. However, the antiapoptotic activity of omeprazole could be attributed to an ability to modify the protein expression of Bcl-2, decreased by *H. pylori* infection.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Helicobacter pylori*

1.1.1- Histórico da descoberta

Um dos avanços mais importantes na Gastroenterologia foi o isolamento da bactéria *Helicobacter pylori*, por Warren e Marshall, em 1983. Warren já estudava esta bactéria desde 1979 e a descrevia como uma bactéria curva em amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia e submetidas a exame histológico (Goodwin et al., 1987; Dunn et al., 1997; Blaser, 1993). Warren descobriu que organismos similares tinham sido descritos por patologistas europeus no século XIX; mas, por nunca terem sido isolados, foram ignorados e esquecidos (Dunn et al., 1997).

Assim que foi isolado, o *H. pylori* foi classificado como pertencente ao gênero *Campylobacter*, que são bactérias gram-negativas em forma de vírgula, oxidase e catalase positivas, que se locomovem por meio de um flagelo polar. A princípio recebeu as seguintes denominações: “gastric *Campylobacter* like organism”, *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (Goodwin e Armstrong, 1990).

A partir de 1989, a bactéria recebeu a denominação de *Helicobacter pylori* (Dunn et al., 1997), sendo que foi a análise da sequência de ácidos nucleicos da bactéria que permitiu sua diferenciação do gênero *Campylobacter* (bastão curvado), para o novo gênero denominado *Helicobacter* (forma helicoidal). A espécie foi denominada *pylori* pelo fato de a bactéria ser mais comumente encontrada na mucosa do antro gástrico próximo ao piloro (Goodwin e Armstrong, 1990).

Warren e Marshall (1984) isolaram esse microorganismo e, através da ingestão de bactérias desenvolvidas em cultura, demonstraram sua relação com o desenvolvimento de gastrites e de úlceras gástricas e duodenais; além de relacioná-lo ao surgimento de câncer gástrico. (Sullivan et al., 1990; Parsonnet et al., 1991). Eles também observaram que diferentes cepas apresentavam virulências variáveis provavelmente causadas pela produção de citotoxinas distintas (Dev et al., 1998).

1.1.2- Epidemiologia

Acredita-se que quase a metade da população mundial encontra-se infectada por esta bactéria (Go, 2002), sendo considerado um importante problema de saúde pública. A infecção pelo *H. pylori* é adquirida principalmente na infância e se caracteriza por sua cronicidade, fato que predispõe ao desenvolvimento de carcinoma gástrico e úlcera péptica em adultos (Dunn et al., 1997).

A prevalência do *H. pylori* varia de acordo com uma série de fatores, dentre os quais área geográfica, idade, raça e fatores sócio-econômicos. Estudos epidemiológicos nas diferentes regiões geográficas são baseados na soroprevalência, já que é praticamente impossível identificar quando a contaminação ocorre (Brown, 2000).

1.1.3- Aspectos gerais

O *H. pylori* é um organismo relativamente simples, sua seqüência genômica foi publicada em 1997, com cerca de 1,7 milhões de nucleotídeos (dependendo da linhagem), os quais representam aproximadamente 1600 genes (Tomb, 1997). Dos genes codificados, 55% são encontrados em outros organismos e 45% são considerados exclusivos (Dorrel, 1998).

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa, não esporulada, de forma curva ou espiralada, de crescimento lento e microaerofílico, ou seja, com concentrações de O₂ que variam de 2 a 8% (Goodwin e Armstrong, 1990). A temperatura ótima para o seu desenvolvimento é de 37° C e ela não sobrevive em pH menor que 4 (Sachs et al., 2003). Sua principal característica bioquímica é a produção abundante da enzima urease; além disso, apresenta positividade para as reações de catalase e oxidase (Dunn et al., 1997).

1.1.4- Colonização

O *H. pylori* tem seu nicho ecológico restrito ao estômago humano e, ocasionalmente habita outros mamíferos (Crabtree e Figura, 1999). Sua sobrevivência no ambiente gástrico pode ser atribuída ao desenvolvimento de características especializadas,

sendo a mais importante delas a capacidade de colonizar a superfície do epitélio gástrico abaixo da camada do muco (McGowan et al., 1996).

Os mecanismos de colonização desta bactéria são determinados por três passos: penetração, ajuste ao meio e aderência (Beachey, 1981). Os fatores de penetração são aqueles que possibilitam a infecção da bactéria no organismo. Sua forma espiralada e a presença de cinco ou seis flagelos unipolares permitem que o *H. pylori* se movimente rapidamente da luz do estômago, onde o pH é muito baixo, através da mucosa, para uma área onde o pH esteja próximo do neutro, tornando as condições favoráveis para seu crescimento. Seus flagelos são compostos por subunidades de flagelina e cobertos por uma dupla camada de fosfolipídeos, que tem como finalidade protegê-los da acidez gástrica (Eaton et al., 1989; Suerbaum et al., 1993).

Como citado anteriormente, o *H. pylori* produz grande quantidade de urease. Esta enzima tem o papel de hidrolisar a uréia da mucosa gástrica, transformando-a em dióxido de carbono e amônia, a qual tampona a acidez gástrica e otimiza o pH ao redor da bactéria, permitindo o seu crescimento (McGowan et al., 1994). A transformação da uréia em amônia também funciona como fonte de nitrogênio para a síntese de proteínas, necessárias para a aderência bacteriana (Eaton e Krakowka, 1995).

O *H. pylori* apresenta amidases que também contribuem para a produção de amônia (Skouloubris, 1997) que é de grande importância na colonização. Conforme Bury-Mone et al. (2003), as amidases são encontradas principalmente em espécies muito hábeis na colonização.

Outra enzima que exerce papel importante na colonização é a catalase que protege a bactéria contra os efeitos danosos dos metabólitos de peróxido de oxigênio produzidos pelos neutrófilos (Marshall, 1991), permitindo assim a sobrevivência da bactéria na superfície da mucosa gástrica inflamada (McGowan et al., 1996). As adesinas do *H. pylori* são descritas como responsáveis pela associação específica da bactéria com a superfície celular gástrica, sendo essencial para a colonização (Lee e Hazell, 1993).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um produto bacteriano que tem a função de estimular várias funções biológicas. O LPS do *H. pylori* parece estar bem adaptado à mucosa gástrica, permitindo que a bactéria permaneça por muito tempo no hospedeiro (Muotiala et al., 1992).

A infecção crônica pelo *H. pylori* está associada à depleção da camada de muco que recobre as células gástricas pela atividade da mucinase. Essa diminuição do muco pode decorrer tanto da inibição da secreção quanto da sua degradação depois de secretada. A degradação do muco pode romper a função normal de barreira, facilitando a penetração do *H. pylori* na mucosa gástrica (Smith et al., 1994).

1.1.5- Patogenicidade e virulência

Além dos fatores de colonização, o *H. pylori* causa danos aos tecidos através da liberação de toxinas. Na década passada, foram identificados alguns genes do *H. pylori* relacionados ao desenvolvimento de doenças gástricas (Cover et al., 1994).

São considerados fatores de virulência a citotoxina vacuolizante (vacuolating cytotoxin – VacA) e a proteína associada a esta citotoxina (cytotoxin-associated protein – CagA), que são codificadas respectivamente pelos genes *vacA* e *cagA* (Cover et al., 1990).

A produção de VacA é um importante fator de virulência do *H. pylori* por induzir a vacuolização citoplasmática em células eucariontes. Os diferentes alelos que expressam VacA determinam a habilidade das cepas de *H. pylori* em expressar toxinas ativas. As cepas que expressam níveis de toxinas mais altos estão relacionadas com doenças gástricas mais severas (Salama et al., 2001).

A descrição de Cover et al. (1990) mostra que existem duas regiões variáveis no gene *vacA*. Uma denominada s que apresenta os subtipos s1 e s2; o alelo s1 pode ser classificado em s1a, s1b, s1c. E outra que apresenta uma grande heterogeneidade, chamada de m, localizada na região mediana do gene e que apresenta os subtipos m1 e m2.

As bactérias conseguem transmitir segmentos de seu material genético para outras linhagens, aumentando a diversidade entre elas; este fato foi observado em relação à ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*), contida nas cepas mais virulentas (Marchetti e Rappuolli, 2002). Conforme Tummuru et al. (1993), o gene *cagA* está presente em aproximadamente 70% das cepas de *H. pylori*.

Há evidências de que dois genes, *picA* e *picB*, são exclusivamente encontrados em cepas de *Helicobacter pylori* possuidoras do *cagA*, os quais estão envolvidos na indução de interleucina-8 (IL-8) nas células epiteliais gástricas, facilitando a resposta inflamatória (Tummuru, 1995). Segundo Weel (1996), apenas as cepas *cagA* podem estar associadas com doença ulcerosa péptica, sendo essa infecção um fator de risco para o adenocarcinoma gástrico. Um outro gene, denominado *iceA*, pode também estar associado com doença ulcerosa péptica (Peek et al., 1998).

1.2- Processo inflamatório e apoptose

A integridade funcional da mucosa gástrica depende do balanço entre mecanismos agressivos e defensivos. A presença de ácido gástrico e enzimas digestivas é contrabalanceada pela síntese de muco e pela regulação das células epiteliais. Se esse delicado balanço é perdido, ocorrem lesões gástricas (Abdel-Salam et al., 2001).

Na infecção por *H. pylori*, as bactérias colonizam a camada de muco do epitélio gástrico e causam inflamação. O mecanismo pelo qual o *H. pylori* provoca a inflamação gástrica inclui a secreção de substâncias pró-inflamatórias pela bactéria e a estimulação da liberação de citocinas induzida pelo contato direto entre a bactéria e as células epiteliais gástricas (Penta, 2005).

A infecção gástrica por esta bactéria está associada a gastrites crônicas, úlceras pépticas, linfoma MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) e câncer gástrico (Wang et al., 2003). Embora, segundo Roth et al. (1999), esta cascata de eventos ocorra claramente, pouco se sabe sobre o papel da resposta imune do hospedeiro no decorrer da doença.

A resposta inicial à infecção por *H. pylori* é predominantemente neutrofílica e estes, liberam mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas que induzem o dano gástrico. Os mecanismos de defesa falham, ou seja, neutrófilos recrutados para o sítio da infecção são incapazes de erradicar bactérias presentes e, desta forma, estabelece-se uma infecção crônica, resultando em produção contínua aumentada de IL-8 e ativação constante de neutrófilos. Neutrófilos ativados no local da infecção produzem radicais livres e liberam enzimas lisossomais contribuindo para a lesão gástrica (Crabtree e Lindley, 1994; Conlan et al., 1999; Harris et al., 2003). Os neutrófilos também geram espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio que podem induzir dano oxidativo ao DNA, via de formação de dutos no DNA (Baik et al, 1996; Knaapen et al, 1999).

Acredita-se que as cepas de *H. pylori cagA* positiva induzem a produção direta de IL-8 pelas células epiteliais (Eaton et al., 2001), por ativação de NF-kappa B (Philpott et al., 2002). Além disto, outros mediadores inflamatórios como a IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon gama- γ (IFN- γ) e fator de ativação plaquetária (PAF), assim como o oxigênio reativo presente no processo inflamatório podem atuar nas células epiteliais aumentando a síntese de IL-8 (Suzuki et al., 1993).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória e um potente inibidor da secreção ácida. Acredita-se que a infecção pelo *H. pylori* leve a uma vigorosa resposta inflamatória com produção de IL-1 β , o que pode ser benéfico inicialmente. Contudo, o potente efeito anti-secretor pode levar à extensão da infecção, produzindo maior lesão na mucosa gástrica (El-Omar, 2001).

Além da produção endógena aumentada de IL-8, muitos componentes do *H. pylori* são capazes de induzir ativação e quimiotaxia de neutrófilos, incluindo a estimulação da mieloperoxidase neutrofílica, geração de metabólitos reativos de oxigênio e expressão de moléculas de adesão (Montecuco et al., 1999). Vários estudos *in vitro* têm fornecido evidências da presença de um componente protéico em extratos aquosos de *H. pylori*, denominado proteína ativadora de neutrófilos (HP-NAP). A HP-NAP é capaz de induzir a adesão a células endoteliais e quimiotaxia de neutrófilos por modular a expressão de CD11b/CD18 (Evans et al., 1995), bem como estimular a produção de espécies reativas

de oxigênio nestas células (Satin et al., 2000) e estimular a expressão de COX-2 em neutrófilos (Kim et al., 2001). *In vivo*, a administração de diferentes cepas de *H. pylori* em uma cavidade artificialmente formada no dorso de animais (bolsa de ar) também é capaz de induzir a migração de leucócitos para o local, além de estimular a produção de citocinas como o TNF- α e IL-1 β (Gambero et al., 2003).

Estresse oxidativo ocorre em pacientes infectados com *H. pylori* onde a expressão de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), superóxido dismutase e catalase encontram-se aumentadas (Felley et al., 2002). A iNOS participa da resposta inflamatória e promove a apoptose de células na mucosa gástrica (Touati et al., 2003; Miyazawa, 2003).

A integridade do tecido é mantida pelo equilíbrio entre a morte celular e a produção de novas células. Quando a proliferação celular não é balanceada pela morte celular, há uma maior chance de ocorrer proliferação maligna e esse desequilíbrio pode ser um importante mecanismo da carcinogênese (Peek et al., 1997). Acredita-se que o *H. pylori* esteja diretamente relacionado às alterações desses mecanismos, pois estudos mostram que após sua erradicação os níveis de proliferação e apoptose voltam ao normal (Moss et al., 2001). A apoptose é regulada pelas proteínas da família Bcl-2, sendo que elas podem inibir (por exemplo, Bcl-2) ou promover (por exemplo, Bax) a morte celular. O balanço entre as proteínas pró e anti-apoptóticas regula a morte celular (Martin e Elkon, 2004). A infecção experimental por *Helicobacter pylori* resulta no aumento da expressão de Bax (Liu et al, 2005) e na diminuição da expressão de Bcl-2 na mucosa gástrica, sugerindo que há uma tendência pró-apoptótica na infecção por *H. pylori* (Nam et al., 2004).

1.3- Tratamentos clínicos

Embora numerosas drogas antibacterianas têm atividade contra o *H. pylori*, *in vitro*, as terapias apenas com antibiótico não são efetivas na prática clínica. Então, a erradicação pode ser alcançada pela combinação de dois antibióticos (claritromicina, amoxicilina ou metronidazol) associada com uma droga anti-ácida, porque a alta acidez intragástrica prejudica a ação dos antibióticos (Ulmer, 2003).

As duas maiores classes de inibidores de secreção ácida são: os inibidores de bomba protônica (*proton pump inhibitors* - PPIs), como o omeprazol, e os antagonistas de receptor de histamina H₂, como a ranitidina. Omeprazol ou ranitidina são utilizados combinados com antibióticos na terapia de erradicação do *H. pylori* ou sozinhos para aliviar desconfortos provocados pela acidez gástrica (Koivisto et al., 2005; Robinson, 2005).

1.3.1- Antagonistas de receptor de histamina H₂

A histamina é o principal estimulante parácrino da secreção ácida gástrica e, ao ser liberada a partir da mucosa fúndica, estimula a secreção ácida por interação com receptor H₂ localizado na membrana da célula parietal ativando a bomba H⁺,K⁺-ATPase (Vuyyuru et al., 1997).

As drogas antagonistas H₂ parecem ser capazes de reduzir o número de leucócitos circulantes no sangue, reduzindo o fluxo de células da medula óssea para o sangue e deste, para a mucosa gástrica (Kawamura et al., 2000). Os antagonistas de H₂ parecem também induzir apoptose em células Caco-2 (carcinoma de cólon humano) e inibir a proliferação da mesma linhagem celular, sugerindo que a ranitidina pode ser utilizada para induzir a regressão tumoral (Rajendra et al., 2004).

Na mucosa gástrica, a ranitidina produz apenas uma pequena redução da apoptose de células epiteliais induzida por indometacina (Slomiany et al., 1999). Propriedades anti-neutrófilicas também são relatadas para a ranitidina, porque ela reduz injúrias hepáticas em modelos de isquemia/perfusão por inibir direta ou indiretamente a ativação de neutrófilos. Entretanto, estudos *in vitro*, não mostraram nenhum efeito sobre funções neutrófilicas, como quimiotaxia, fagocitose ou produção de superóxido (Mikawa et al, 1999).

1.3.2- Inibidores de bomba protônica

O omeprazol age bloqueando a subunidade α da H⁺,K⁺-ATPase gástrica, que é a enzima responsável pelo passo final na secreção do ácido hidrocloreídrico pelas células parietais (Fellenius et al., 1981). São muito utilizados em pacientes com úlcera péptica não

controlada pelos antagonistas H_2 . Em pH neutro, o omeprazol é quimicamente estável, lipossolúvel, base fraca, sem atividade inibidora. São estas bases fracas neutras que atingem as células parietais através da circulação sanguínea e se difundem para os canalículos secretores, onde se tornam protonadas e, desta forma, são retidas. O agente protonado se rearranja para formar um ácido sulfênico e uma sulfenamida. A sulfenamida interage de forma covalente com os grupamentos sulfidríla em pontos críticos no domínio extracelular (luz) da H^+,K^+ -ATPase, da superfície da membrana (Langtry e Wilde, 1998).

Assim, o omeprazol deve ser considerado pró-droga que precisa ser ativada para ser eficaz. A sua administração resulta na inibição permanente da atividade *in vivo* da enzima e a secreção de ácido retorna apenas após a inserção de novas moléculas de H^+,K^+ -ATPase na membrana luminal (McTavish et al., 1991). Como é um inibidor irreversível de H^+,K^+ -ATPase, provoca uma inibição dose-relacionada da secreção gástrica do ácido, que persiste após o seu desaparecimento no plasma (McTavish et al., 1991).

Os efeitos farmacológicos do omeprazol resultam da redução da secreção gástrica através de mecanismo de ação altamente seletivo, não possuindo ação sobre receptores da acetilcolina e histamina. Portanto, produz apenas alterações pequenas no volume de suco gástrico, na secreção de pepsina e fator intrínseco e não afetam a motilidade gástrica.

Várias evidências experimentais têm mostrado que o omeprazol apresenta efeitos anti-ulcerogênicos adicionais. O omeprazol bloqueia o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, a associação de peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas, indicando propriedades antioxidantes; também previne o estresse que induz a fragmentação do DNA durante a ulceração, sugerindo propriedades anti-apoptóticas (Biswas et al., 2003).

Estudos *in vitro* têm sugerido que PPIs inibem inúmeras funções neutrofílicas como a quimiotaxia, a produção de superóxido e desgranulação (Wandall, 1992; Ritter et al., 1998; Capodicasa et al., 1999), a fagocitose e acidificação de fagolisossomas (Agastya et al, 2000), a expressão de moléculas de adesão e conseqüente adesão estimulada por IL-1 β 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). *In vivo*, há relatos de que a administração oral de omeprazol, durante 7 dias à voluntários saudáveis, promove uma redução da capacidade de geração de radicais livres por neutrófilos (Suzuki et al., 1996) e um caso descrito de leucopenia severa após tratamento com omeprazol (Odou et al., 1999). No entanto, o tratamento com pantoprazol por 7 ou 28 dias não reduz a capacidade de neutrófilos migrarem em resposta a carragenina ou *H. pylori* para a bolsa de ar em ratos (Becker et al., 2004). A hipótese de que PPI possam modular diretamente a migração e ativação leucocitária poderia representar benefícios adicionais no controle do processo inflamatório gástrico induzido por *H. pylori*, visto que este processo é neutrófilo-dependente.

1.4- Modelo experimental

Os estudos que envolvem infecção e inflamação gástrica induzida por *H. pylori* são limitados pela escassez de modelos animais. Vários trabalhos relatam a infecção por diferentes espécies de *Helicobacter*, como o *H. mustelae*, *H. felis* e *H. heilmanii* em camundongos, carneiros, gatos, porcos, macacos e gerbilos. Porém, a maioria destas espécies geralmente não expressa os mesmos fatores de virulência (VacA ou CagA, entre outros) necessários para a inflamação da mucosa e formação de úlcera gástrica como acontece no homem; existe também a dificuldade de manutenção de algumas destas espécies em biotérios (Konturek et al., 2000).

A administração de suspensão de *H. pylori* por via oral a ratos promove apoptose celular em estômagos previamente ulcerados (lesões produzidas por ligadura da artéria seguida de reperusão) e torna sua cicatrização mais lenta; porém, poucas ou nenhuma bactéria permanece aderida à mucosa ou ao epitélio, mostrando que não ocorreu a colonização (Konturek et al., 2000).

No entanto, o mesmo procedimento em camundongos tem mostrado que algumas cepas humanas podem colonizar particularmente os camundongos C57BL/6. (van Dorn et al., 1999; Wang et al., 2003, Thompson et al., 2004).

A cepa denominada Sydney strain (SS1), isolada por Lee et al. (1997), possui uma alta capacidade de colonizar os camundongos C57BL/6. A SS1 é *cagA* positiva e *vacA* positiva e também coloniza, mas não em altos níveis, outras linhagens de camundongos, como BALB/c, DBA/2 e C3H/He. Essa cepa tem sido utilizada amplamente em modelos animais para o estudo da patogenicidade da doença, bem como no estudo de fármacos utilizados nas terapias de erradicação.

Considerando o exposto, drogas como os inibidores de bomba protônica apresentam supostamente propriedades farmacológicas adicionais, em relação aos antagonistas de receptores de histamina H₂. Assim, justifica-se o presente estudo, para que estas supostas propriedades adicionais destes compostos sejam avaliadas na infecção por *H. pylori*.

2- OBJETIVOS

Avaliar o efeito do tratamento com os inibidores de secreção gástrica, omeprazol e ranitidina, no modelo experimental de infecção por *H. pylori* em camundongos C57BL/6, considerando:

1. Características da infecção pela quantificação das bactérias presentes;
2. Alterações inflamatórias através da análise macroscópica das lesões, análise histológica, da determinação do infiltrado de neutrófilos na mucosa gástrica e da síntese de interleucinas;
3. A modificação na expressão de fatores anti- e pró-apoptóticos na mucosa gástrica;
4. A avaliação dos níveis de fragmentação de DNA em células isoladas da mucosa gástrica.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 4 semanas de idade, pesando 10-15 g, livres de patógenos específicos, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas coletivas e mantidos no Biotério da Universidade São Francisco (USF), com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e se serviram *ad libitum* de água e ração.

3.2- Cultura de *H. pylori*

A cepa de *H. pylori* SS1 foi cultivada em placas contendo Columbia Ágar, sangue desfibrinado de carneiro 10%, 6 µg/mL vancomicina, 20 µg/mL ácido nalidíxico, 2 µg/mL anfotericina B e 40 µg/mL 2,3,5 TCC (2,3,5, triphenyl-tetrazolium chloride). As placas foram incubadas por 48-72 horas a 37° C, utilizando-se condições microaerófilas - 5-6 % de O₂, 8-10% CO₂, 80-85% N₂, 98% de umidade relativa (Godoy et al., 2003).

A identificação das colônias foi confirmada por coloração de Gram, produção de oxidase, catalase e urease. As bactérias foram coletadas da placa e colocadas em PBS (Tampão Fosfato Salina) contendo Cloreto de Sódio 0,15 M, Fosfato de Sódio Dibásico 0,0072 M e Fosfato de Sódio Monobásico 0,00 28M.

3.3- Determinação da atividade anti-secretora por ligadura de piloro

Para determinar a inibição da produção de ácido gástrico das drogas anti-secretora, após jejum de 24 horas, os animais foram tratados intra-peritonalmente (i.p.) com omeprazol (Sigma Chemical Co., MO, USA; 100 mg/kg), ranitidina (Galena, Campinas, Brasil; 100 mg/kg) ou veículo (NaCl 0,09%).

Após 1 hora, os animais foram anestesiados (Ketalar/Diazepan – 4:1, 2 µl/g de peso do animal), a cavidade abdominal aberta e o piloro ligado. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical após 4 horas, tendo o esôfago ligado e o estômago removido. O conteúdo gástrico foi coletado e a acidez determinada através de uma titulação até pH 7,0 com NaOH 0,01M (Shay et al., 1945).

Em outro experimento, os animais foram tratados (i.p.) por uma semana com omeprazol (100 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg) ou veículo (NaCl 0,09%). As drogas foram administradas no mesmo horário e 20 horas após a última administração, os camundongos foram submetidos ao mesmo procedimento descrito acima.

3.4- Modelo experimental de infecção por *H. pylori* e tratamento com os inibidores de secreção ácida

Para a inoculação, os camundongos permaneceram em jejum por 24 horas e receberam por via oro-gástrica 0,15 mL de suspensão de *H. pylori* contendo aproximadamente 10^9 bactérias/mL em PBS, três vezes num intervalo de 5 dias. Um grupo controle recebeu somente o PBS (Lee et al, 1997).

Na 11ª semana de inóculo, os animais foram tratados (i.p.) com omeprazol (100 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg) ou veículo (PBS) durante 7 dias sempre no mesmo horário. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical no oitavo dia, quando completaram 12 semanas pós-inóculo e seus estômagos foram removidos para a realização de diferentes ensaios.

3.5- Determinação das Lesões Macroscópicas

Os estômagos foram abertos cuidadosamente pela grande curvatura, lavados com solução fisiológica, e observados quanto a características, número e tamanho das ulcerações.

O índice de lesão ulcerativa (ILU) de cada animal foi calculado pela soma de cada item observado, conforme mostrados na Tabela 1 (Shay et al., 1945).

Tabela 1- Parâmetros utilizados na determinação do índice de lesão ulcerativa (ILU).

Perda da morfologia normal	1 ponto
Descoloração da mucosa	1 ponto
Edema mucosal	1 ponto
Hemorragias	1 ponto
Pontos de petéquia (até 9)	2 pontos
Pontos de petéquia (> 10)	3 pontos
Úlceras até 1 mm	*n x 2 pontos
Úlceras acima de 1 mm	*n x 3 pontos
Úlceras perfuradas	*n x 4 pontos

* número de úlceras encontradas.

3.6- Análise histológica

Um quarto de cada estômago foi armazenado em formalina tamponada 10% e, após 24 horas, processados em banhos de formol, etanol e xilol, seguido por inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram feitos com secções de 4 a 7 µm de espessura, colocados em lâminas de vidro e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) ou com Giemsa, para a avaliação das alterações inflamatórias e presença da bactéria, respectivamente. As lâminas foram analisadas em colaboração com a Dra. Miriam Trevisan do Laboratório Multpat de Campinas.

3.7- Determinação da atividade de mieloperoxidase na mucosa gástrica

Amostras da mucosa gástrica foram previamente pesadas e armazenadas a -70°C. Após descongelamento, foram homogeneizadas em tampão HTAB (Hexadeciltrimetil brometo de amônia 0,5 % – Sigma –diluído em Tampão Fosfato de Potássio 50 mM, pH 6) e centrifugadas (10 minutos, 14000 rpm e 4° C).

Em seguida, 15 µl do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços e foram adicionados 200 µl o-dianisidine (0,167 mg/mL de o-dianisidine – Sigma; água oxigenada 0,0005% em Tampão Fosfato de Potássio 50 mM; pH 6,0). Imediatamente foram realizadas leituras de absorbância em 460 nm por 5 minutos utilizando um leitor de multiplaca (Multiscan MS, Labsystems) (Bradley et al., 1982).

3.8- Extração de DNA e Avaliação dos níveis de colonização por PCR em Tempo Real

As biópsias da mucosa gástrica foram armazenadas em 300 µl de tampão de extração (Tris-HCl 20 mM - pH 8, Tween 20 0,5%) e Proteinase K para atingir concentração final de 0,5 mg/mL (Sigma Chemical Co., MO, USA) . Após uma incubação de 12 horas (*overnight*) a 37°C, o DNA foi extraído pelo método Fenol-Clorofórmio. A concentração de cada amostra foi determinada por absorbância 260/280 nm.

A Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) em Tempo Real das amostra de DNA obtidas foi realizada no iCycler IQ™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a obtenção e análise dos dados foi obtida utilizando-se o programa Real-Time Detection System Software (Bio-Rad).

Utilizou-se o gene *napA* e o corante *SybrGreen I*, que se liga de maneira inespecífica ao DNA em fita dupla. A mistura (50 µl) para a reação foi preparada da seguinte maneira: 25 µl de *iQ™ SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad), 50 nM de cada *primer* (F: 5'- GAATGTGAAAGGCACCGATT-3'; R: 5'- TCCTTTCAGCGAGATCATCA-3'), e 1 µl do DNA extraído (200 ng).

Os ciclos da reação foram: denaturação de 5 minutos a 95 °C seguida por 45 ciclos de 30 segundos a 95°C; anelamento por 30 segundos a 65°C e extensão do *primer* por 30 segundos a 72°C. Estas etapas foram seguidas pela amplificação da fita dupla que consistiu de 40 ciclos de 45 segundos cada com temperaturas decrescentes (iniciando em 95°C e terminando em 1°C).

Como controle positivo, foi utilizado o DNA de *H. Pylori* das cepas 26695 e J99. E como controle negativo, foi utilizado o DNA isolado da mucosa gástrica de camundongos (C57BL/6) não infectados.

3.9- Extração de proteínas e *Western blot*

As biópsias do tecido gástrico foram imediatamente homogeneizadas em tampão de extração (Triton X-100 1%, Tris·HCl 100 mM (pH 7.4), Pirofosfato de Sódio 100 mM, Fluoreto de Sódio 100 mM, EDTA 10 mM, Ortovanadato de Sódio 10 mM, PMSF 2,0 mM, e 0,1 mg/ml de aprotinina) e centrifugadas (20 minutos, 12000 rpm, 4° C). A concentração de proteínas presente no sobrenadante foi determinada pelo método de Biureto (Gornall et al, 1949), onde 20 µl do sobrenadante foram adicionados a 1 ml de reagente de Biureto (Labtest). Após 30 minutos, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (modelo Hitachi U-2001) em 595 nm. As amostras receberam Tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50%; SDS - dodecil sulfato de sódio – 10%) contendo DTT (dithiothreitol) 100 mM; foram aquecidas em banho-maria por 5 minutos e estocadas a -70° C.

Nos ensaios de *Western Blot*, alíquotas contendo 0,2 mg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida e separadas por eletroforese em gel de policrílamida contendo SDS (SDS-PAGE) em cubas para eletrofores (Bio-Rad). Após separação, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com solução contendo anticorpo anti-Bax, anti-BCL-2, anti-IL1β e anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) *overnight* a 4° C.

As membranas foram reveladas utilizando Kit comercial de quimioluminescência (GE Healthcare, UK). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria ótica utilizando o programa *Scion Image Software* (ScionCorp, Frederick, MD).

3.10- Avaliação de dano ao DNA através do Ensaio do Cometa

As células das biópsias gástricas foram isoladas de acordo com Pool-Zobel et al. (1994). As amostras foram incubadas com 5,5 mg de proteinase K (Sigma-Aldrich) e 3 mg de collagenase I (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) em 3 mL de Hank's (HBSS - Hank's balanced salt solution; Invitrogen) por 45 minutos a 37°C para liberar as células; que foram suspensas em 10 mL de HBSS. A suspensão resultante foi centrifugada (750 g por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado.

O Ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações: 15 µl de suspensão celular (aproximadamente, 2×10^4 células) foi misturada em agarose *low-melting-point* 0,5% (Promega Co. Madison, WI, USA) e espalhadas sobre lâminas de microscopia pré-tratadas com agarose.

As lâminas foram imersas (overnight, 4°C) em solução gelada (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM; Tris 10 mM; pH 10; com Triton X-100 1% e DMSO 10%; todos da Sigma-Aldrich). Depois, as células foram expostas a um tampão alcalino (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM, pH 13,4) por 40 minutos a 4°C para permitir o desenrolamento do DNA e a expressão de sítios álcali-lábeis.

A eletroforese foi realizada na mesma solução (20 minutos, a 4°C), utilizando corrente elétrica de 350 mA e 25 V. Depois da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5), coradas com 40 µl EtBr (20 µg/ml) e analisadas com microscópio fluorescente (Eclipse E400; Nikon, Melville, NY, USA), utilizando um sistema de análise de imagem (Komet 5.5; Kinetic Imaging, Nottingham, UK).

Foram analisadas 200 células, selecionadas randomicamente, de cada amostra (sendo 100 células de cada lâmina da duplicata) e a média do tamanho da cauda do DNA foi determinada de acordo com o grau do dano (Figura 1).

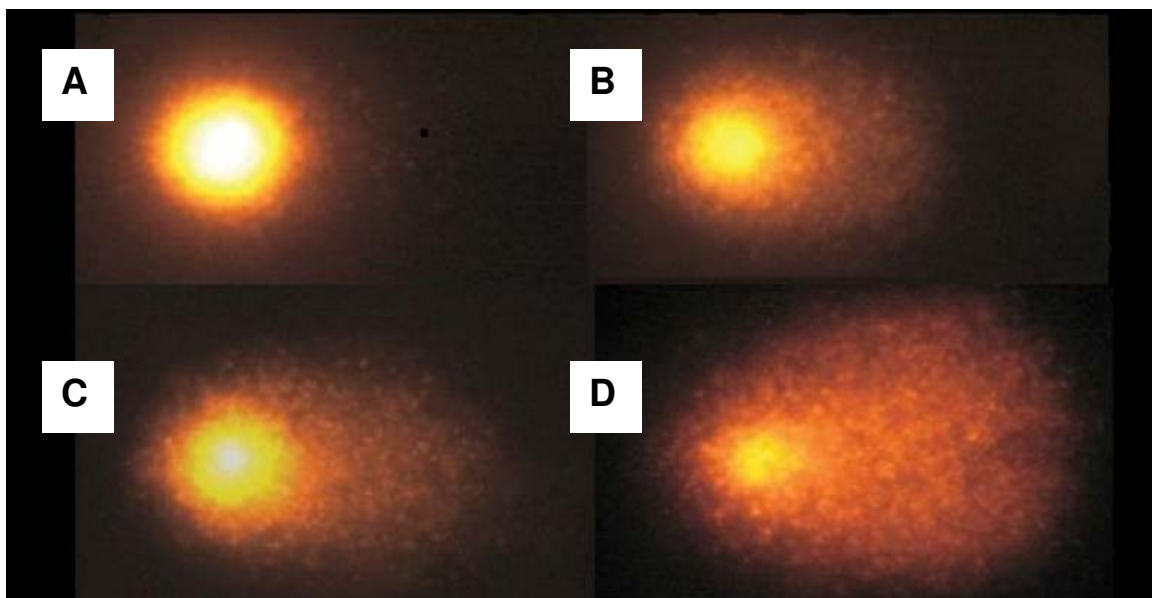


Figura 1- Foto representando os possíveis danos ao DNA: nenhum dano (A), dano de grau 1 (B), grau 2 (C) e grau 3 (D).

3.11- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média, acompanhado do respectivo erro padrão da média (EPM) de n experimentos. Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), teste t de Student não-pareado ou teste de Dunnett para comparações múltiplas. Os resultados não paramétricos foram expressos como mediana ou média e analisados pelo teste de Mann-Whitney. Os dados de dano ao DNA foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4- RESULTADOS

4.1- Determinação da atividade anti-secretora por ligadura de piloro

Após 4 horas da administração de 100 mg/Kg de omeprazol e 100 mg/Kg de ranitidina foi observado um bloqueio efetivo da produção de ácido gástrico quando comparado com os animais que receberam somente solução salina (Figura 2A). Após 7 dias de tratamento, onde os animais receberam (i.p.), sempre no mesmo horário, omeprazol (100 mg/Kg), ranitidina (100 mg/Kg) ou veículo (salina). Os animais foram sacrificados no oitavo dia e apenas o grupo tratado com omeprazol apresentou redução de secreção ácida. A produção de secreção ácida nos animais tratados com ranitidina foi semelhante a dos animais que receberam apenas veículo (Figura 2B).

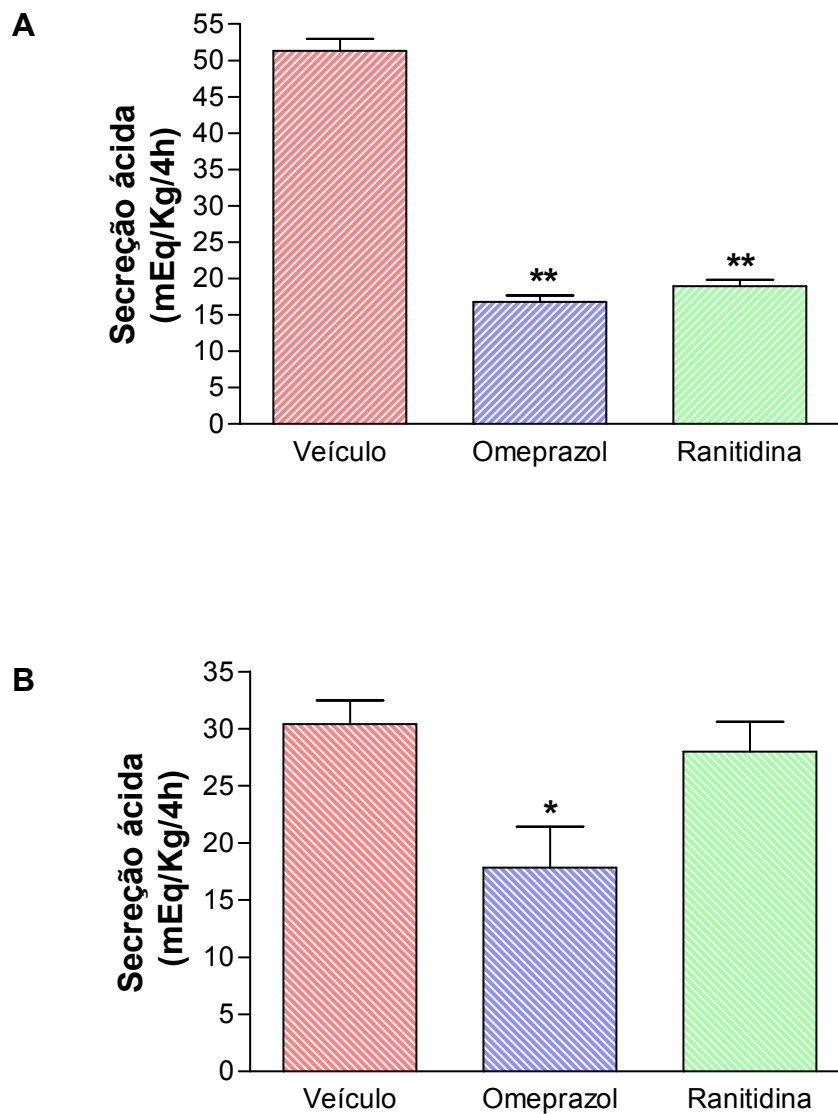


Figura 2- Efeito do tratamento com omeprazol (100 mg//Kg) e ranitidina (100 mg/Kg) sobre a secreção ácida avaliada através de ligadura de piloro em camundongos, após 4 horas da administração das drogas (A) e após uma semana de tratamento (B). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n=5). * $p<0,05$ ** $p<0,01$ quando comparado ao grupo veículo.

4.2- Avaliação dos níveis de colonização por PCR em Tempo Real

Os animais tratados com omeprazol durante 7 dias apresentaram um aumento na colonização, avaliada por PCR em tempo real, quando comparados com os animais tratados com veículo e com ranitidina (Figura 3). Não foi detectada a presença de material genético de *H. pylori* nos animais não-infectados.

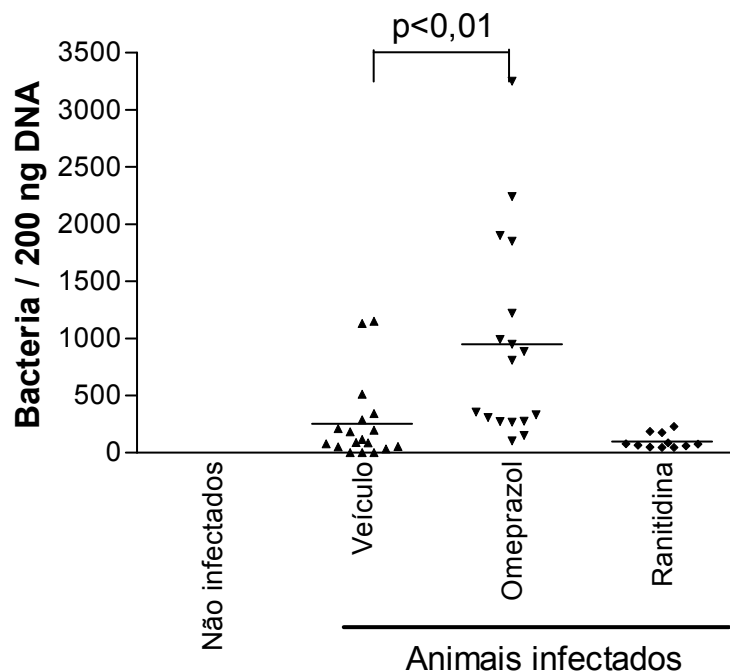


Figura 3- Níveis de colonização por *Helicobacter pylori* em animais não-infectados e infectados tratados com 100 mg/kg de omeprazol ou 100 mg/kg de ranitidina ou veículo. Os dados individuais foram marcados e as linhas representam a média (11-18 animais). $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo.

4.3- Determinação das Lesões Macroscópicas

A infecção por *H. pylori* provocou alterações macroscópicas na mucosa gástrica dos animais, como descoloração, pequenas úlceras e pontos de petéquias, o que resultou em um índice de lesão ulcerativa significativamente diferente dos animais não-infectados. O tratamento com omeprazol e ranitidina por uma semana reduziu o índice de lesão ulcerativa dos animais, sendo observado apenas alguns pontos de petéquias, quando comparados com os animais tratados apenas com veículo (Figura 4).

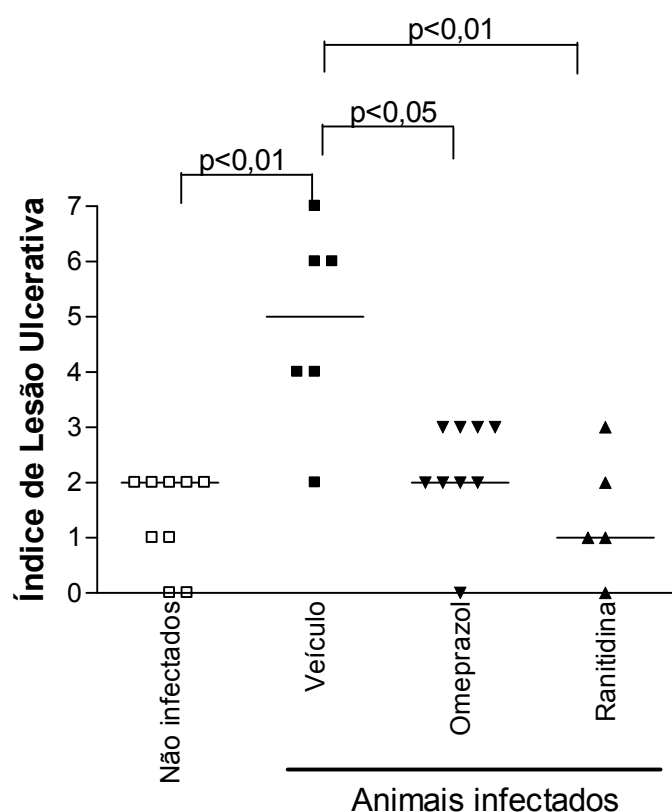


Figura 4- Índice de Lesão Ulcerativa nos animais não-infectados e infectados tratados com omeprazol (100 mg/Kg), ranitidina (100 mg/Kg) ou veículo. Os dados individuais foram marcados e as linhas representam a média (5-9 animais). $p<0,05$ ou $p<0,01$ quando comparado ao grupo veículo ou aos animais não-infectados.

4.4- Análise histológica

Na análise histológica, não foi observada a presença de bactérias nos animais não-infectados (Figura 5A), mas foi possível observar a presença de *H. pylori* na forma de gaivota nos animais infectados (Figura 5B). Histologicamente, não foi possível observar alterações inflamatórias após 12 semanas de infecção dos animais com *H. pylori*

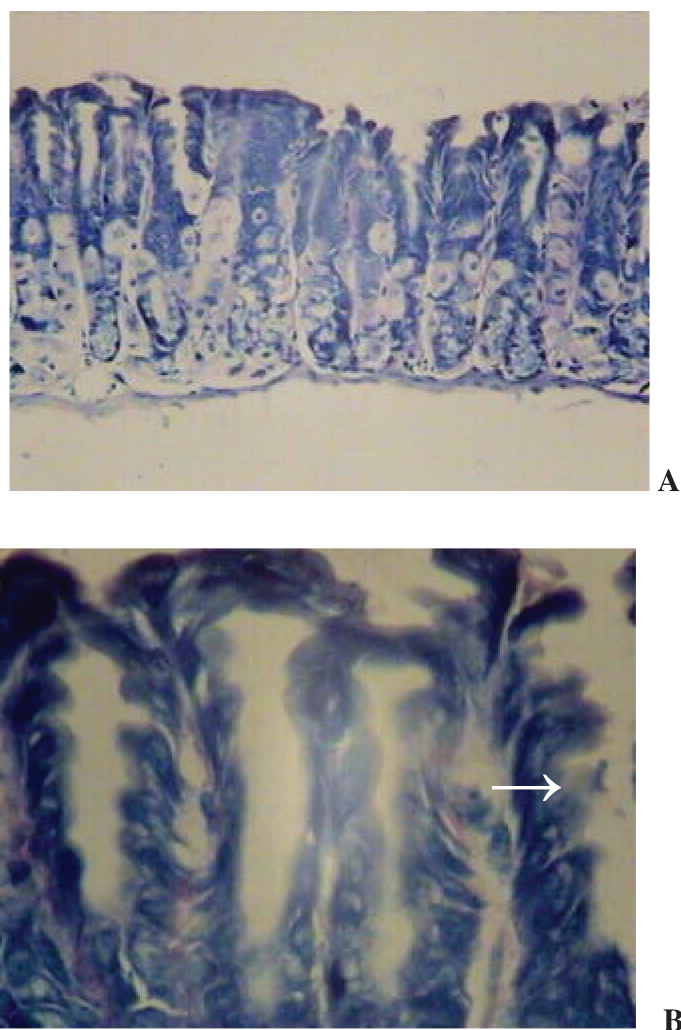


Figura 5- Corte histológico de mucosa gástrica de animal não-infectado (A) e presença de *H. pylori* em forma de gaivota na mucosa gástrica de animais infectados (B). Aumento 100x (A) e 400x (B). Coloração Giemsa.

4.5- Determinação da atividade de mieloperoxidase na mucosa gástrica

Não houve diferenças significativas da atividade de MPO na mucosa dos animais não-infectados e, dos infectados e tratados com veículo. Entretanto, houve um aumento significativo na atividade de MPO nos animais tratados por uma semana com omeprazol quando comparados com os animais tratados com veículo. O tratamento com ranitidina não modificou a atividade de MPO na mucosa gástrica dos animais (Figura 6).

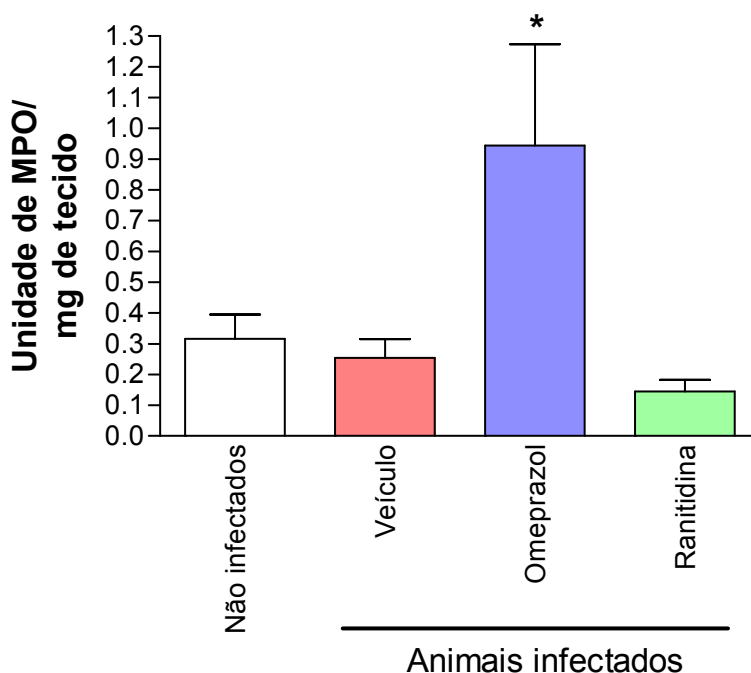


Figura 6- Atividade de mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados com 100 mg/kg de omeprazol ou 100 mg/kg de ranitidina ou veículo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n=6). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo.

4.6- Expressão de Interleucina-1 β na mucosa gástrica

A expressão de IL-1 β nos animais não-infectados e infectados foi semelhante como pode ser observado na Figura 7. Adicionalmente, o tratamento com as drogas anti-ácidas omeprazol e ranitidina não alterou significativamente a expressão de IL-1 β (Figura 7)

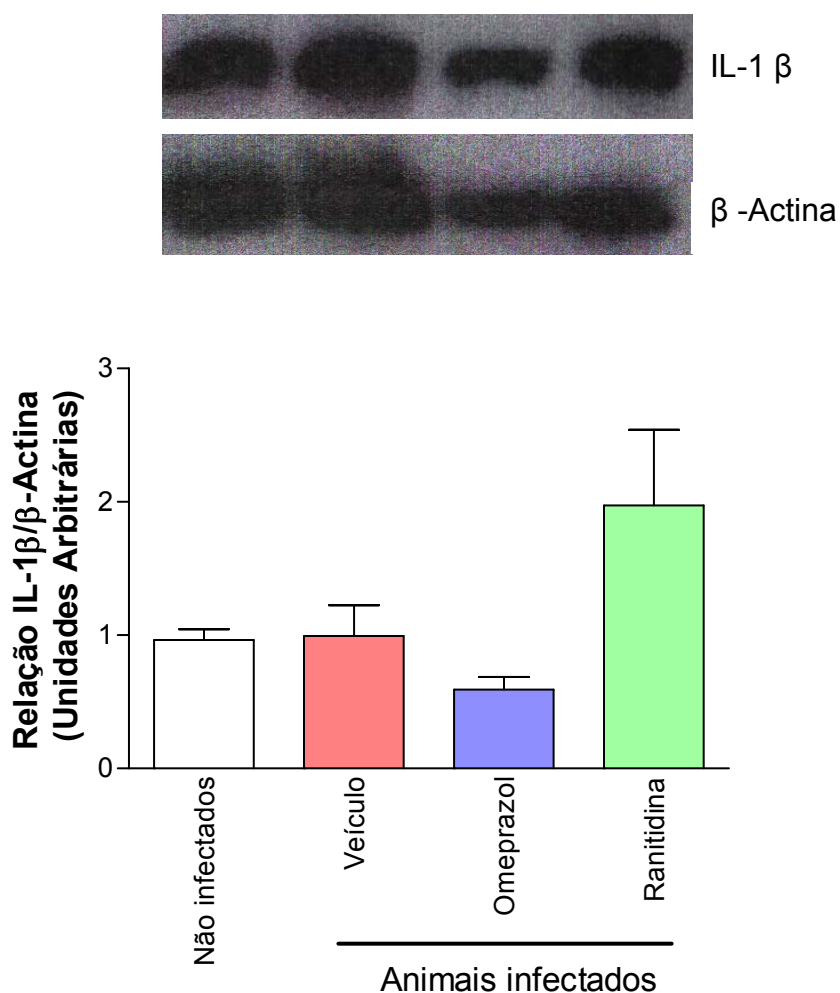


Figura 7- Expressão de IL-1 β na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados com 100 mg/kg de omeprazol ou 100 mg/kg de ranitidina ou veículo. As proteínas foram analisadas por *Western Blot*. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n=3). *p<0,05 quando comparado ao grupo veículo.

4.7- Expressão de proteínas apoptóticas na mucosa gástrica

A apoptose é regulada pelo balanço entre as expressões das proteínas Bcl-2, que é anti-apoptótica, e Bax, que é pró-apoptótica. A infecção por *H. pylori* induziu nos animais a redução da expressão da proteína Bcl-2 e o aumento da expressão da proteína Bax na mucosa gástrica, quando comparado aos animais não-infectados. O tratamento com omeprazol por uma semana induziu o aumento da expressão de Bcl-2, mas não modificou os níveis de Bax no mesmo animal. O tratamento com ranitidina não modificou a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax nos animais (Figura 8A e 8B, respectivamente).

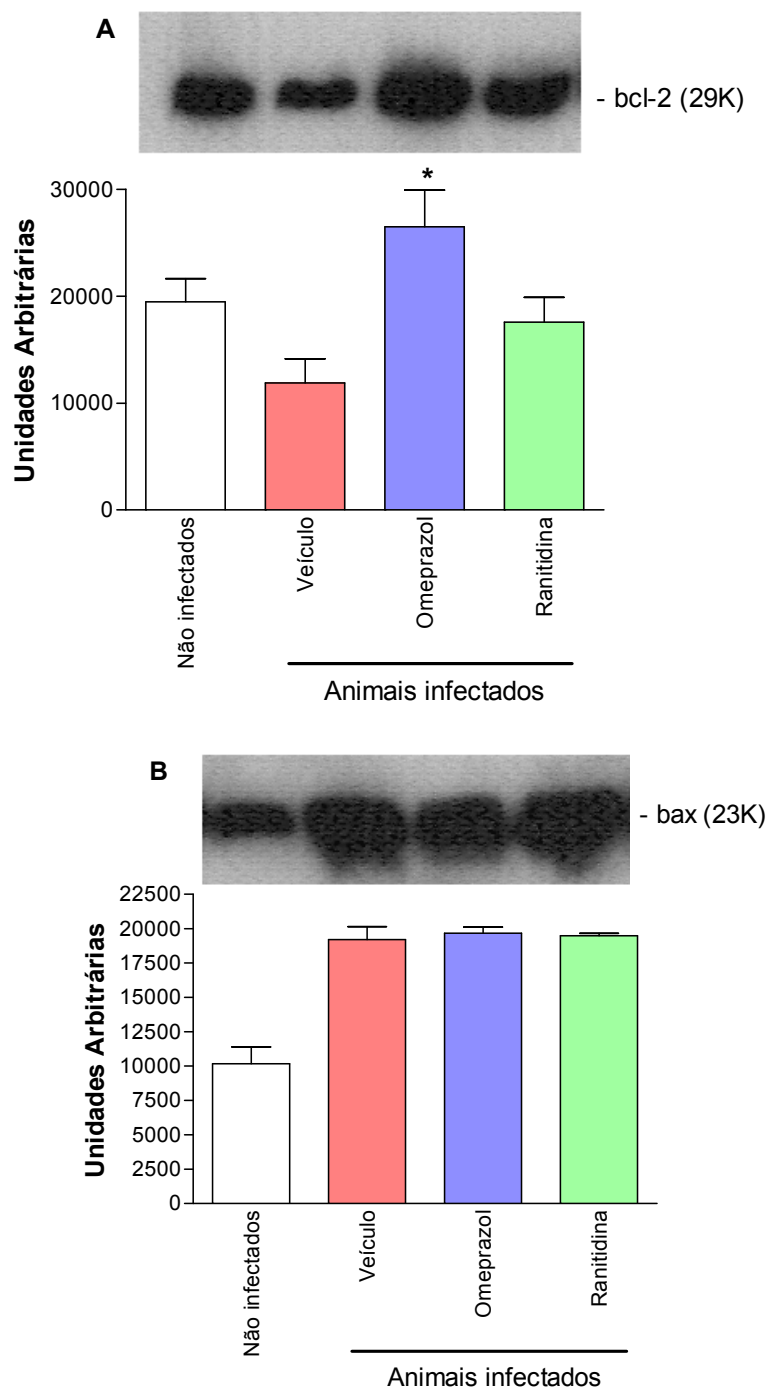


Figura 8- Níveis de expressão das proteínas Bcl-2 (A) e Bax (B) na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados com 100 mg/kg de omeprazol ou 100 mg/kg de ranitidina ou veículo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n=3). *p<0,05 quando comparado ao grupo veículo. Imagem representativa de um experimento.

4.8- Avaliação de dano ao DNA através do Ensaio do Cometa

Os animais infectados com *H. pylori* apresentaram um aumento de dano ao DNA quando comparados com os animais não infectados. O tratamento com omeprazol não modificou o dano causado pela infecção. No entanto, o nível de dano ao DNA nos animais tratados com ranitidina foi significativamente maior quando comparado aos animais não-infectados (Figura 9).

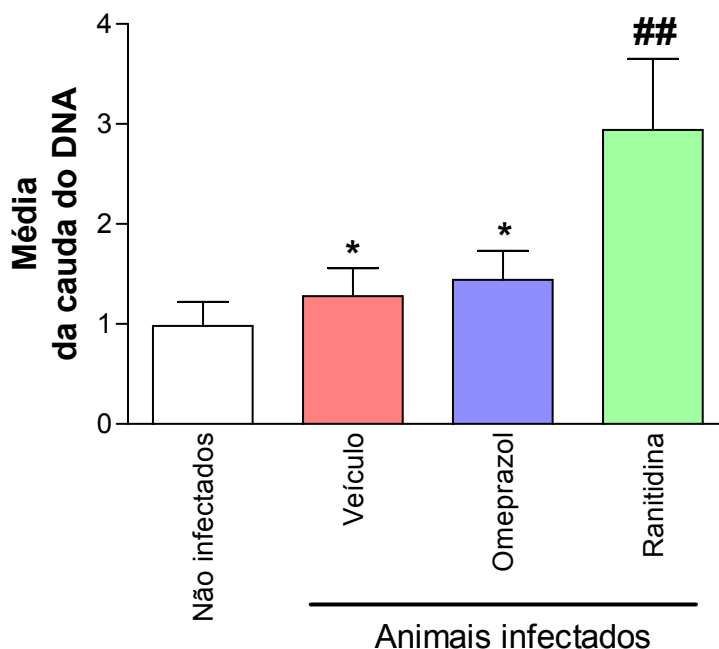


Figura 9- Nível do dano ao DNA na mucosa gástrica de animais não-infectados e infectados tratados com 100 mg/kg de omeprazol ou 100 mg/kg de ranitidina ou veículo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ S.D (n=6). *p<0,05 quando comparado ao grupo não-infectado e ## p<0,01 quando comparado ao grupo veículo.

5- DISCUSSÃO

Em terapias de erradicação ou simplesmente para alívio do desconforto gástrico em pacientes com infecção causada por *H. pylori* são utilizados inibidores de secreção ácida, como omeprazol ou ranitidina. Relatos da literatura sugerem propriedades adicionais do omeprazol, como efeitos anti-inflamatórios, anti-ulcerogênicos e anti-apoptóticos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com omeprazol e ranitidina em um modelo animal de infecção por *H. pylori*, enfocando possíveis propriedades adicionais destes fármacos. Para isso, inicialmente avaliamos o efeito agudo da administração da dose de 100 mg/Kg de omeprazol e de ranitidina sobre a produção de secreção ácida. As duas drogas inibiram de maneira efetiva a produção de ácido gástrico. Entretanto, após uma semana de tratamento, apenas o omeprazol apresentou inibição significativa de secreção ácida; sugerindo que o tratamento com omeprazol resulta em bloqueio sustentado do ácido gástrico, enquanto que o tratamento com a ranitidina resulta em períodos de bloqueio de secreção ácida intercalados com períodos de produção de ácido gástrico.

O tratamento com as drogas anti-ácidas foi capaz de modificar o nível de colonização pelo *H. pylori* na mucosa gástrica dos camundongos, avaliado por PCR em tempo real. Os animais tratados com omeprazol apresentaram um aumento significativo nos níveis de colonização gástrica quando comparados com os animais tratados com veículo e com ranitidina. Esses resultados estão de acordo com relatos de literatura onde a administração oral única de omeprazol em camundongos infectados com SS1 resulta em um aumento significativo da quantidade de bactérias (determinada histologicamente) na porção de transição entre o corpo e antro; entretanto, após 29 dias de tratamento, ocorre uma normalização do número de bactérias no antro (van Zanten et al., 2003). Este aumento na colonização é atribuído à redução sustentada da secreção de ácido gástrico contribuindo para um ambiente mais favorável a proliferação das bactérias. Ainda, de acordo com Danon et al. (1995), o bloqueio de secreção ácida pelo omeprazol também produz um aumento da colonização por *H. felis* em camundongos, principalmente no corpo do estômago, enquanto o tratamento com ranitidina é responsável por uma supressão ácida parcial e produz um aumento sem importância na colonização.

O *H. pylori* pode ser observado quando corado com HE, no entanto, essa coloração pode ser imperceptível quando poucas bactérias estiverem presentes, além de poderem ocorrer erros na identificação devido a restos de tecido da superfície do epitélio (Dunn *et al.*, 1997). Além de confirmar a presença da bactéria *H. pylori* nas amostras de tecido gástrico, a histologia tem importância na avaliação do processo inflamatório (Thijs *et al.*, 1996). As alterações inflamatórias descritas na literatura para modelo experimental de infecção por *H. pylori* (SSI) em camundongos C57BL/6 são caracterizadas por um pequeno infiltrado de neutrófilos (Lee *et al.*, 1997; van Doorn *et al.*, 1999). Após 12 semanas de infecção foi possível observar a presença de *H. pylori* nos cortes histológicos, entretanto, não foi possível observar nenhuma alteração inflamatória nestes animais. Acreditamos que a ausência de inflamação nestes animais pode estar relacionada ao baixo nível de colonização observado após 12 semanas.

A ausência de alterações inflamatórias foi confirmada pelo fato de que os animais infectados e não-infectados apresentaram o mesmo nível de atividade de MPO na mucosa gástrica. Estes dados estão de acordo com Elizalde *et al.* (2003) que não observaram diferenças na atividade de MPO entre animais infectados com *H. pylori* por quatro semanas quando comparados com os animais controles. Adicionalmente, observamos que não houve modificação significativa no conteúdo de IL-1 β em nenhum grupo, corroborando os dados da literatura que sugerem um baixo grau de inflamação na mucosa gástrica neste modelo experimental (Wadstrom *et al.*, 1994).

Entretanto, o aumento da colonização nos animais tratados com omeprazol foi associado com o aumento do nível de MPO, sugerindo que o aumento do nível de colonização é responsável pelo aumento do infiltrado de neutrófilos. Relatos de experimentos *in vitro*, mostram que o omeprazol diminui a capacidade dos neutrófilos migrarem em resposta a estímulos, como a indometacina e a presença do *H. pylori* (Suzuki *et al.*, 1999; Martins de Oliveira *et al.*, 2007). Porém, *in vivo*, essa capacidade do omeprazol de inibir a migração não é observada (Becker *et al.*, 2004). Deste modo, nossos dados confirmam que a capacidade anti-migratória do omeprazol é restrita aos ensaios *in vitro*, provavelmente devido à utilização de altas concentrações de droga nestes ensaios.

A infecção por *H. pylori* provocou alterações macroscópicas na mucosa gástrica dos animais e, apesar do elevado nível de MPO observado nos animais tratados com omeprazol, ambas as drogas diminuíram as lesões, sugerindo que o bloqueio total ou parcial pelo omeprazol e ranitidina, respectivamente, é essencial para a cicatrização das lesões desenvolvidas pela bactéria.

A integridade do tecido é mantida pelo equilíbrio da morte celular por apoptose e a produção de novas células pela proliferação celular. Quando ocorre a hiperproliferação não balanceada pela morte celular, há uma maior chance de transformação maligna, podendo ser esse desequilíbrio um importante mecanismo da carcinogênese (Peek et al., 1997). O *H. pylori* parece estar diretamente associado às alterações desses mecanismos, sendo que estudos mostram que após sua erradicação os níveis de proliferação e apoptose voltam ao normal (Moss et al., 2001). A apoptose é regulada pelas proteínas da família Bcl-2, sendo que elas podem inibir (por exemplo, Bcl-2, Bcl-X_L) ou promover (por exemplo, Bax, Bcl-X_S, Bak) a morte celular. O balanço entre as proteínas pró e anti-apoptóticas regula a morte celular (Martin e Elkon, 2004). A infecção experimental por *Helicobacter pylori* resulta no aumento da expressão de Bax (Liu et al., 2005) e na diminuição da expressão de Bcl-2 na mucosa gástrica, sugerindo que há uma tendência pró-apoptótica na infecção por *H. pylori* (Nam et al., 2004). Nossos dados confirmaram esses relatos e mostraram que o tratamento com omeprazol restaura a produção de Bcl-2 na mucosa gástrica; contudo não há alteração na produção de Bax, sugerindo uma atividade anti-apoptótica nos animais infectados e tratados com omeprazol.

Evidências experimentais mostram que o omeprazol previne a fragmentação do DNA e deste modo previne a apoptose das células do epitélio gástrico, contribuindo para a proliferação das células e a recuperação das lesões na mucosa gástrica (Biswas et al., 2003). O ensaio do cometa é um teste simples e sensível para avaliar o dano oxidativo ao DNA, incluindo quebras de fita única de DNA, lesões em sítios álcali-lábeis, reparo incompleto dos sítios e *cross links* para células individuais (Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003). A extensão da migração da cauda é proporcional ao número de quebras no DNA e a sua análise permite medir indiretamente esse número de quebras no DNA por célula. Embora o dano oxidativo ao DNA parece ser reduzido pelo tratamento com omeprazol durante o

estresse induzido pela ulceração gástrica (Biswas et al., 2003), em nossos experimentos não pudemos observar nenhuma proteção gástrica contra o dano ao DNA gerado pela infecção por *H. pylori* após do tratamento com omeprazol. Em relação ao tratamento com ranitidina, nossos dados demonstraram um aumento nos níveis de dano oxidativo ao DNA nos animais tratados. Esses dados confirmam os achados de Brambilila et al (1983) que relataram também um aumento no dano ao DNA na mucosa gástrica após uma única administração de ranitidina por via oral a ratos e camundongos, sugerindo um efeito genotóxico dessa droga.

6- CONCLUSÃO

1. Os animais tratados com omeprazol apresentaram um aumento significativo nos níveis de colonização gástrica quando comparados aos animais tratados com veículo e com ranitidina. Este aumento na colonização é atribuído à redução sustentada da secreção de ácido gástrico contribuindo para um ambiente mais favorável à proliferação das bactérias.
2. O aumento da colonização nos animais tratados com omeprazol foi associado ao aumento do nível de MPO, sugerindo que o aumento do nível de colonização é responsável pelo aumento do infiltrado de neutrófilos. Assim, sugerimos que a capacidade anti-migratória do omeprazol é restrita aos ensaios *in vitro*, provavelmente devido à utilização de altas concentrações de droga nestes ensaios.
3. A infecção por *H. pylori* provocou alterações macroscópicas na mucosa gástrica dos animais e, apesar do elevado nível de MPO observado nos animais tratados com omeprazol, ambas as drogas diminuíram as lesões, sugerindo que o bloqueio total ou parcial pelo omeprazol e ranitidina, respectivamente, é essencial para a cicatrização das lesões desenvolvidas pela bactéria.
4. Nossos dados confirmaram que a infecção por *H. pylori* aumenta a expressão de Bax e diminui a expressão de Bcl-2 na mucosa gástrica e mostraram que o tratamento com omeprazol restaura a produção de Bcl-2 na mucosa gástrica; contudo não há alteração na produção de Bax, sugerindo uma atividade anti-apoptótica nos animais infectados e tratados com omeprazol.
5. Não observamos nenhuma proteção gástrica contra o dano ao DNA gerado pela infecção por *H. pylori* após do tratamento com omeprazol. Em relação ao tratamento com ranitidina, nossos dados demonstraram um aumento nos níveis de dano oxidativo ao DNA nos animais tratados, sugerindo um efeito genotóxico dessa droga.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debreceni A, Szolcsanyi J, Mozsik G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. J Physiol Paris 2001;95:105-27.

Agastya G, West BC, Callahan JM. Omeprazole inhibits phagocytosis and acidification of phagolysosomes of normal human neutrophils in vitro. Immunopharmacol Immunotoxicol 2000; 22(2):357-72.

Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. Cancer Res 1996;56:1279-82.

Beachey EH. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacterial to mucosal surface. Infect Dis 1981; 143: 325-45.

Becker TL, Maróstica M, Ribeiro ML, de Mendonça S, Gambero A, Pedrazzoli J Jr. Pantoprazole treatment does not invoke anti-inflammatory properties in vivo. Int Immunopharmacol 2004;4:1051-7.

Biswas K, Bandyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E, Banerjee RK. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. J Biol Chem 2003; 278(13): 10993-11001.

Blaser M J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a slow bacterial infection. Trends Microbiol 1993; 1: 255-260.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol 1982;78:206-9.

Brambilla G, Cavanna M, Faggin P, Maura A, Pino A, Ricci R, Robbiano L. Genotoxic effects in rodents given high oral doses of ranitidine and sodium nitrite. Carcinogenesis 1983;4:1281-5.

Brown L M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. Epidemiol Rev 2000; 22 (2): 283-297.

Bury-Mone S, Skouloubris S, Dauga C, Thiberge JM, Dailidiene D, Berg DE, Labigne A, De Reuse H. Presence of active amidases in *Helicobacter* species able to colonize the stomach. Infect Immun 2003; 71(10): 5613-22.

Capodicasa E, De Bellis F, Pelli MA. Effect of lansoprazole on human leukocyte function. Immunopharm. Immunotoxicol 1999; 21:357-77.

Conlan JW, KuoLee R, Webb A, Perry MB. Imunosuppression by a corticosteroid fails to exacerbate *Helicobacter pylori* infection in a mouse model of gastric colonization. J Microbiol 1999; 45:975-80.

Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activit. Infect Immun 1990; 58:603-10.

Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem 1994; 269(14):10566-73.

Crabtree JE, 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 1999; Basel, Karger, 11:21-43.

Crabtree JE, Lindley IJ. Mucosal interleukin-8 and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 1994; 1:33-8.

Danon SJ, O'Rourke JL, Moss ND, Lee A. The importance of local acid production in the distribution of *Helicobacter felis* in the mouse stomach. Gastroenterology 1995; 108: 1386-95.

Dev A, Yokota K, Kobayashi K, Oguma K, Hirai Y, Akagi T. Antibody and cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected various mouse strains. Acta Med Okayama 1998; 52(1):41-8.

Dorrel N, Wren BW. From genes to genome biology: a new era in *Helicobacter pylori* research. GUT 1998; 42: 451-53.

- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997; 10:720-41.
- Eaton KA, Kersulyte D, Mefford M, Danon SJ, Krakowka S, Berg DE. Role of *Helicobacter pylori* cag region genes in colonization and gastritis in two animal models. Infect Immun 2001; 69:2902-8.
- Eaton KA, Krakowka S. Avirulent urease-deficient *Helicobacter pylori* colonises gastric epithelial explants ex vivo. Scand J Gastroenterol 1995; 30: 434-437.
- Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. Infect Immun 1989; 57:1119-25.
- El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. Gut 2001; 48(6):743-7.
- Elizalde JJ, Mendez A, Gomez J, del Rivero M, Gironella M, Closa D, Quintero E, Pique JM. Gastric mucosal blood flow changes in *Helicobacter pylori* infection and NSAID-induced gastric injury. Helicobacter 2003; 8(2):124-31.
- Evans DJ, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN, Kvietys PR. Characterization of a *Helicobacter pylori* Neutrophil-activating protein. Infection Immunity 1995; 63:2213-20.
- Fellenius E, Berglindh T, Sachs G, Olbe L, Elander B, Sjosstrand SE, Wallmark B. Substituted benzimidazole block gastric acid secretion by blocking H⁺-K⁺ ATPase. Nature 1981; 290:159-61.
- Felley CP, Pignatelli B, Van Melle GD, Crabtree JE e col. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with *Helicobacter pylori*: effects of bacterial eradication. Helicobacter 2002; 7:342-8.
- 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.
- Go MF. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2002; 1:3-15.

- Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L, Miranda Md MB, Mendonca S, Pedrazzoli J Jr. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Gastroenterol* 2003; 11:3-20.
- Goodwin CS, Armstrong, JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:1-13.
- Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol* 1987; 19: 257-267.
- Gornall AG, Bardawill CJ, Maxima D. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; (177): 751-66.
- Harris AG, Wilson JE, Danon SJ, Dixon MF, Donegan K, Hazell SL. Catalase (KatA) and KatA-associated protein (KapA) are essential to persistent colonization in the *Helicobacter pylori* SS1 mouse model. *Microbiology* 2003; 149:665-72.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.
- Kawamura T, Miyaji C, Toyabe S, Fukuda M, Watanabe H, Abo T. Suppressive effect of antiulcer agents on granulocytes – a role for granulocytes in gastric ulcer formation. *Dig Dis Sci* 2000; 45:1786-91.
- Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. 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* 2001; 46: 2277-84.
- Knaapen AM, Seiler F, Schilderman PA, Nehls P, Bruch J, Schins RP, Borm PJ. Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:234-40.
- Koivisto TT, Rautelin HI, Voutilainen ME, Heikkinen MT, Koskenpato JP, Farkkila MA. First-line eradication therapy for *Helicobacter pylori* in primary health care based on antibiotic resistance: results of three eradication regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:773-82.

Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Karczewska E, Drozdowicz D, Stachura J, Hahn EG. *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 2000; 12:1299-313.

Langtry HD, Wilde MI. Omeprazole. A review of its use in *Helicobacter pylori* infection, gastro-oesophageal reflux disease and peptic ulcers induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Drugs 1998; 56(3):447-86.

Lee A, Fox J, Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. Infect Immun 1993; 61: 1601-10.

Lee A, O'Rourke J, de Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. Gastroenterology 1997; 112:1386-97.

Liu HF, Liu WW, Wang GA, Teng XC. Effect of *Helicobacter pylori* infection on Bax protein expression in patients with gastric precancerous lesions. World J Gastroenterol 2005; 7;11(37):5899-901.

Marchetti M, Rappuolli R. Isogenic mutants of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* in the mouse model of infection: effects on colonization efficiency. Microbiology 2002; 148:1447-56.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984; 8390:1311-5

Martin DA, Elkon KB. Mechanisms of apoptosis. Rheum Dis Clin North Am 2004; 0(3):441-54, vii.

Martins de Oliveira, R, Antunes, E, Pedrazzoli, J. Jr, Gambero A. The inhibitory effects of H⁺K⁺ATPase inhibitors on human neutrophils in vitro: Restoration by a K⁺ ionophore. Inflamm Res 2007; 56(3):105-11.

McGowan CC, Cover TL, Blaser MJ. The proton pump inhibitor omeprazole inhibits acid survival of *Helicobacter pylori* by a urease-independent mechanism. Gastroenterology 1994; 107(5): 1573-8.

- McGowan CC, Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric acid: biological and therapeutic implications. *Gastroenterology* 1996; 110: 926-38.
- McTavish D, Buckley MM, Heel RC. Omeprazole - An updated review of its pharmacology and therapeutic use in acid-related disorders. *Drugs* 1991; (42):138-70.
- Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y. The effects of cimetidine, ranitidine, and famotidine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1999; 89:218-24.
- Miyazawa M, Suzuki H, Masaoka T, Kai A, Suematsu M, Nagata H, Miura S, Ishi H. Suppressed apoptosis in the inflamed gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-colonized iNOS-knockout mice. *Rad Biol Med* 2003; 34(12):1621-30.
- Montecucco C, Papini E, Bernard M, Zoratti M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. *FEBS Letters* 1999; 452:16-21
- Moss SF, Sordillo EM, Abdalla AM, Makarov V, Hanzely Z, Perez-Perez GI, Blaser M, Holt PR. Increased gastric epithelial cell apoptosis with colonization with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 2001; 61:1406-11.
- Muotiala A, Helander IM, Pyhala L, Kosunen TU, Moran AP. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1992; 60:1714-6.
- Nam KT, Hahm KB, Oh SY, Yeo M, Han SU, Ahn B, Kim YB, Kang JS, Jang DD, Yang KH, Kim DY. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide prevents *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer development in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2004;10:8105-13.
- Odou P, Martin P, Membre S, Gressier B, Tamiji L, Dine T, Luyckx MM, Brunet C, Dehee D, Moulron S. Omeprazole-induced leukopenia. A case report. *J Clin Pharm Ther* 1999; 24:317-21.
- Ohara T, Arakawa T. Lansoprazole decreases peripheral blood monocytes and intercellular adhesion molecule-1-positive mononuclear cells. *Dig Dis Sci* 1999; 44:1710-15.
- Parsonnet J, Friedman G D, Vandersteen D P, Chang Y, Vogelmann T H, Orentreich N, Sibley R K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131.

Peek RM Jr, Moss SF, Tham KT, Wang S, Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. J Natl Inst 1997; (863):68-89.

Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham TK, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. Proc. Assoc. Am. Phys 1998, 110:531-44.

Penta R, De Falco M, Iaquinto G, De Luca A. *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells: from gastritis to cancer. J Exp Clin Cancer Res 2005; 24:337-45.

Philpott DJ, Belaid D, Troubadour P, Thiberge JM, Tankovic J, Labigne A, Ferrero RL. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. Cell Microbiol 2002; 4:285-96.

Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schroder HG, Schmezer P. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. Environ Mol Mutagen 1994;24:23-45.

Rajendra S, Mulcahy H, Patchett S, Kumar P. The effect of H₂ antagonists on proliferation and apoptosis in human colorectal cancer cell lines. Dig Dis Sci 2004;49:1634-40.

Ritter M, Schratzberger P, Rossmann H, Woll E, Seiler K, Seidler U, Reinisch N, Kahler CM, Zwierzina H, Lang HJ, Paulmichl M, Wiedermann CJ. Effect of inhibitors of Na⁺-H⁺ ATPase on cell volume, intracellular pH and migration of human polymorphonuclear leucocytes. Br J Pharmacol 1998, 124:627-38.

Robinson M. Proton pump inhibitors: update on their role in acid-related gastrointestinal diseases. Int J Clin Pract 2005; 59:709-15.

Roth KA, Kapadia SB, Martin SM, Lorenz RG. Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. J Immunol 1999; 163:1490-7.

Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. Annu Rev Physiol 2003; 65:349-69.

Salama NR, Otto G, Tompkins L, Falkow S. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun* 2001; 69: 730-6.

Satin B, Giudice GD, Bianca VD, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000; 191:1467-76.

Shay H, Komarov AS, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rats. *Gastroenterology* 1945; 5:43-61.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;184-91.

Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1997; 25(5): 989-98.

Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Endothelin-1, interleukin-4 and nitric oxide synthase modulators of gastric mucosal injury by indomethacin: effect of antiulcer agents. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50(2):197-210.

Smith AW, Chahal B, French GL. The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 1994; 13:153-60.

Sullivan PB, Thomas JE, Wight DGD, Neale G, Easham EJ, Corrah T, Lloyd-Evans N, Greenwood BM. *Helicobacter pylori* in Gambia children with chronic diarrhea and malnutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65: 189-191.

Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 1993; 175(11): 3278-88.

Suzuki M, Miura S, Suematsu M. *Helicobacter pylori* elicits gastric mucosal cell damage associated with neutrophil-derived toxic oxidants. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993; 5: S35-39.

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,.

Suzuki M, Mori M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, Kimura H, Ishii H. Omeprazole attenuates oxygen-derived free radical production from human neutrophil. Free Rad Biol Med 1996; 21:727-31.

Thijs JC, Van Zwet AA, Thijs WJ, Oey HB, Karrenbeld A, Stellaard F, Luijt DS, Meyer BC, Kleibeuker JH. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. Am J Gastroenterol 1996; 91 (10): 2125-29.

Thompson LJ, Danon SJ, Wilson JE, O'Rourke JL, Salama NR, Falkow S, Mitchell H, Lee A. Chronic *Helicobacter pylori* Infection with Sydney Strain 1 and a Newly Identified Mouse-Adapted Strain (Sydney Strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c Mice. Infect Immun 2004; 72:4668-79.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000;35:206-21.

Tomb JF, White O, Kerlavage A. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997; 388: 539-47.

Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. Gastroenterology 2003; 124(5): 1408-19.

Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun 1993; 61:1799-809.

Tummuru MKR, Sharma AS, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. Mol Microbiol 1995; 18: 867-76.

Ulmer HJ, Beckerling A, Gatz G. Recent use of proton pump inhibitor-based triple therapies for the eradication of *Helicobacter pylori*: a broad data review. *Helicobacter* 2003; 8:95-104.

van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, Stoof J, van Rees EP, van Doorn LJ, Vandenbroucke-Grauls CM. *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun* 1999; 67:3040-6.

van Zanten SJ, Kolesnikow T, Leung V, O'Rourke JL, Lee A. Gastric transitional zones, areas where *Helicobacter* treatment fails: results of a treatment trial using the Sydney strain mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(7):2249-55.

Vuyyuru L, Schubert ML, Harrington L, Arimura A, Makhlouf GM. Dual inhibitory pathways link antral somatostatin and histamine secretion in human, dog, and rat stomach. Gastroenterology 1995;109(5):1566-74.

Wadstrom T, Rydberg J, Rozalska B, Lelwala-Guruge J. Intravenous *Helicobacter pylori* induces low levels of TNF-alpha and IL-1 alpha in a murine model. *APMIS* 1994;102: 49-52.

Wandall JH. Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, super oxide production, degranulation and translocation of cytochrome b-245. *Gut* 1992; 33:617-21.

Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003; 111:514-22.

Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 16: 1311-5.

Weel JFL, Van der Hulst RWM, Gerrits Y. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 1996; 173: 1171-75.

Yoshida N, Yoshikawa T, Tanaka Y, Fujita N, Kassai K, Naito Y, Kondo M. A new mechanism for anti-inflammatory actions of proton pump inhibitors--inhibitory effects on neutrophil-endothelial cell interactions. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14, 1:74-81.

ANEXOS



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **733-1**, sobre "**EFEITO DO TRATAMENTO COM PANTOPRAZOL SOBRE A LESÃO OXIDATIVA E INFLAMATÓRIA DECORRENTE DA INFECÇÃO POR HELICOBACTER PYLORI EM CAMUNDONGOS**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr/Marta Contieri Maróstica** 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.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **733-1**, entitled "**EFFECTS OF PANTOPRAZOL TREATMENT IN THE OXIDATIVE AND INFLAMMATORY REACTION INDUCED BY HELICOBACTER PYLORI INFECTION IN MICE**", 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, 27 de agosto de 2007.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

AUTHOR'S QUERY SHEET

Author(s): M. Maróstica et al. SGAS 251306

Article title:

Article no:

Dear Author

The following queries have arisen during the editing of your manuscript and are identified on the proofs. Unless advised otherwise, please submit all corrections using the CATS online correction form.

AQ1 **Reference 11:** Please check page range.

AQ2 **Reference 42: Brambilla** – this is taken as the correct spelling and the text reference has been amended accordingly. Please confirm that this is correct.

ORIGINAL ARTICLE

Effects of a one-week treatment with acid gastric inhibitors on *Helicobacter pylori*-infected miceMARTA MARÓSTICA¹, DEMETRIUS PAIVA ARÇARI¹,
WALDEMAR BARTCHEWSKY JR¹, NELCI FENALTI HOEHR², MIRIAM TREVISAN³,
MARCELO LIMA RIBEIRO¹, JOSÉ PEDRAZZOLI JR¹ & ALESSANDRA GAMBERO¹¹Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil,²Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, SP, Brazil, and ³Multpat, Campinas, SP, Brazil

Abstract

Objective. Antacid drugs, including omeprazole and ranitidine, were prescribed to *Helicobacter pylori*-infected subjects in combination with antibiotics during eradication treatment. Several reports suggest that these drugs have additional pharmacological properties, such as antineutrophil, antiapoptotic and antioxidant characteristics. The aim of this work was to study the effects of acid suppressive medication treatment in the *H. pylori* infection experimental model, focusing on possible additional pharmacological properties. **Material and methods.** The ability of gastric acid suppression was assessed in pylorus-ligated animals. Gastric *H. pylori* colonization levels, myeloperoxidase (MPO) activity, macroscopic damage, Bax and Bcl-2 expression and DNA damage levels were assessed in C57BL/6-infected mice after treatment for one week with omeprazole (100 mg.kg⁻¹) or ranitidine (100 mg.kg⁻¹). **Results.** Omeprazole treatment increased bacteria colonization and MPO activity in mice stomachs. Both antacid drugs efficiently improved macroscopic damage, although only omeprazole restored the expression of the antiapoptotic Bcl-2 protein in gastric mucosa of infected animals. **Conclusions.** Some additional omeprazole-related properties, such as antineutrophil properties, were not observed in *H. pylori*-infected mice after one week of treatment, suggesting that this property is restricted to *in vitro* approaches. However, the antiapoptotic activity of omeprazole could be attributed to an ability to modify the protein expression of Bcl-2, decreased by *H. pylori* infection.

Key Words: Apoptosis, comet assay, DNA damage, neutrophil, omeprazole, ranitidine

Introduction

The functional integrity of gastric mucosa depends on the balance between aggressive and defensive mechanisms. The presence of gastric acid and digestive enzymes is counterbalanced by mucus synthesis and the regulated kinetics of epithelial cells. If this delicate balance is lost, the result will be gastric lesions [1]. *Helicobacter pylori* infection is a major cause of chronic gastritis and peptic ulcer disease. In *H. pylori* infection, the bacterium colonizes the mucus layer overlying the gastric surface epithelium and causes inflammation. The mechanism by which *H. pylori* provokes gastric inflammation includes the secretion of pro-inflammatory

substances by the bacteria and stimulation of cytokine release, induced by the direct contact between bacteria and gastric epithelial cells [2]. One of the consequences of persistent inflammation may be alterations in cellular turnover. Several studies have reported increased levels of gastric epithelial apoptosis among *H. pylori*-infected individuals, despite low levels of epithelial cell necrosis [3,4]. Other forms of epithelial injury involve activated neutrophils, which generate reactive oxygen or nitrogen species that may induce oxidative DNA damage via the formation of DNA adducts [5,6].

Although, *in vitro*, numerous antibacterial drugs have activity against *H. pylori*, therapy with a single

Correspondence: Alessandra Gambero, Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, São Francisco University Medical School, Av. São Francisco de Assis 218, 12916-900 Bragança Paulista, SP, Brazil. Tel: +55 11 4034 8135. Fax: +55 11 4034 1825. E-mail: alessandragambero@saofrancisco.edu.br

(Received 1 March 2007; accepted 6 June 2007)

ISSN 0036-5521 print/ISSN 1502-7708 online © 2007 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/00365520701514396

antibiotic is generally ineffective in clinical practice. Thus, eradication may be achieved by the combination of two antibiotics plus an acid gastric inhibitor drug [7]. There are two major classes of gastric acid inhibitors, the proton-pump inhibitors (PPIs), such as, omeprazole, which act upon the blockade of the α -subunit of the gastric H^+, K^+ -ATPase, the enzyme responsible for the final step in the secretion of hydrochloric acid by parietal cells, and the histamine H_2 -receptor antagonists, such as ranitidine, which block the histamine stimulation of parietal cells. These drugs are also prescribed alone to relieve gastric discomfort in undiagnosed individuals, as well as to treat acid-related disorders of the upper gastrointestinal tract [8,9].

The more potent antisecretory effects of PPIs, in comparison with histamine H_2 -antagonists, are claimed to account for their efficacy in the treatment of gastric disease [10]. However, experimental evidence demonstrates that omeprazole presents additional antiulcer effects. Omeprazole blocks stress-induced increased generation of reactive oxygen species and is associated with lipid peroxidation and protein oxidation, indicating a putative antioxidant role. Omeprazole also prevents stress-induced DNA fragmentation, suggesting an antiapoptotic role and blocking of cell death during ulceration [11]. The gastroprotective effect of lansoprazole, another PPI, also seems to be involved in the reduction of gastric oxidative stress and inflammatory injury [12,13]. *In vitro* data show that omeprazole is able to inhibit several neutrophil functions, such as chemotaxis, superoxide production, degranulation and phagocytosis, and some investigators have suggested that these actions could contribute to its antiulcer properties [14–17].

Conversely, H_2 -antagonist drugs seem to induce apoptosis in Caco-2 cancer cells, inhibiting cell proliferation and suggesting that ranitidine can be used to induce tumor regression [18]. In gastric mucosa, ranitidine produces only a slight reduction in indomethacin-induced epithelial cell apoptosis [19]. Antineutrophil properties have also been reported for ranitidine, since this drug reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury by inhibiting neutrophil activation, directly or indirectly, through the production of TNF- α , which is a potent activator of neutrophils [20]. However, *in vitro* data have not demonstrated any effect on neutrophil function, such as chemotaxis, phagocytosis or superoxide production [21].

Thus, our aim was to study the effects of a 1-week treatment with gastric acid inhibitors, omeprazole and ranitidine, on gastric responses in *H. pylori*-infected mice, focusing on the level of *H. pylori* colonization, ulcerative response, neutrophil pre-

sence, antiapoptotic activity and oxidative DNA damage.

Material and methods

Animals

Specific pathogen-free male C57BL/6 mice (4 weeks old, 10–15 g) were obtained from CEMIB (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil). The experiments were conducted in accordance with the principles outlined by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). The mice were maintained in a humidity and temperature-controlled room and in 12-h light-dark cycles. The animals had free access to tap-water and food.

Antisecretory action assessed in pylorus ligation

To determine the ability of antisecretory drugs to inhibit gastric acid production, the mice were treated intraperitoneally (i.p.) with omeprazole (Sigma Chemical Co., Mo., USA; 100 mg.kg^{-1}), ranitidine (Galena, Campinas, Brazil; 100 mg.kg^{-1}) or vehicle (0.09% NaCl). After 1 h, with the mice under anesthesia, the abdomen was incised and the pylorus was ligated. The mice 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 [22]. In other experiments, mice were treated with omeprazole for one week (100 mg.kg^{-1} i.p.), ranitidine (100 mg.kg^{-1} i.p.) or vehicle (NaCl 0.09%) and always at 2000 h. Twelve hours after the last treatment with gastric acid inhibitor, the animals were anesthetized and the same procedure as that described above was performed.

Helicobacter pylori preparation and inoculation of mice

In this study, the *H. pylori* Sydney Strain 1 (SS1) was used. Bacteria were routinely grown on brain heart infusion supplemented with 2.5 g.l^{-1} yeast extract and 10% lysed sheep blood, 6 mg.l^{-1} vancomycin, 20 mg.l^{-1} nalidixic acid, 2 mg.l^{-1} amphotericin B, 40 mg.l^{-1} 2,3,5, triphenyl-tetrazolium chloride, followed by incubation for 48–72 h at 37°C under microaerophilic conditions (8–10% CO_2 , 5–6% O_2 , 80–85% N_2 , at 98% humidity). The identity of the colony was confirmed by Gram staining and oxidase, catalase and urease production. Bacteria were collected from solid medium in phosphate-buffered saline (PBS).

After 24 h of food deprivation, the mice were given 0.15 ml *H. pylori* suspension in PBS ($10^9 \text{ CFUs.ml}^{-1}$) orally via a gavage needle. Oral inoculation was repeated 2 and 4 days later. Control

animals received only PBS by the same route. Eleven weeks after *H. pylori* inoculation, the mice were treated intraperitoneally for one week with omeprazole (100 mg.kg⁻¹), ranitidine (100 mg.kg⁻¹) or vehicle (NaCl 0.09%), always at 2000 h, and were sacrificed the day after the last dose, corresponding to 12 weeks post-inoculation. The group that was inoculated with PBS only (non-infected) also received vehicle treatment (0.09% NaCl).

DNA extraction and quantitative real-time PCR

The biopsy samples were transferred to microcentrifuge tubes and 300 µl extraction buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% Tween20) and proteinase K (final concentration of 0.5 mg.ml⁻¹ (Sigma Chemical Co.)) was added. After overnight incubation at 37°C, DNA was extracted using a phenol-chloroform method. The absorbance at 260/280 nm was determined for each sample. The DNA samples obtained were subjected to real-time polymerase chain reaction (PCR), performed in an iCycler IQ (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA), data acquisition and analysis were carried out using the Real-Time Detection System Software (Bio-Rad). Real-time PCR was targeted at the *napA* gene and a double-stranded DNA-specific dye SYBR Green I was used. The 50 µl reaction mixture was prepared as follows: 25 µl iQ SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad), 50 nM of each primer (F: 5'- GAATGTGAAAGGCACCGATT-3'; R: 5'- TCCTTTCAGCGAGATCATCA-3'), and 1 µl extracted DNA (200 ng). The reaction was cycled with preliminary denaturation for 5 min at 95°C, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 65°C for 30 s, and primer extension at 72°C for 30 s. This was followed by melting-point analysis of the double-stranded amplicons consisting of 40 cycles of 1°C decrement (45 s each) beginning at 95°C. As positive controls, genomic DNA from *H. pylori* reference strains 26695 and J99 were used. Additionally, DNA isolated from gastric mucosa of uninfected mice (C57BL/6) was used as a negative control. The first derivative of this plot, dF/dT, is the rate of change of fluorescence in the reaction, and a significant change in fluorescence accompanies the melting curve of the double-stranded PCR products. A plot of -dF/dT versus temperature displays these changes as distinct peaks. To evaluate the detection limit of this reaction, serially diluted samples of *H. pylori* DNA, ranging from 10⁻¹ to 10⁶ fg, were used as a template. The efficiency was determined by standard curves on the basis of 10-fold serial dilutions of *H. pylori* DNA in a background of 200 ng human DNA. Each sample was tested in triplicate, and the results were averaged to obtain the final cycle

Acid gastric inhibitors on *H. pylori* infection 3

threshold (Ct), i.e. the point at which sample fluorescence rises above the background level. A standard curve, constructed by plotting the log of the initial DNA concentration versus the Ct, was used to determine *H. pylori* DNA concentrations.

Macroscopic damage assessment and histological findings

Stomachs were opened along the greater curvature and the ulcerative lesion index of each animal was calculated by adding the following values, as described by Gamberini et al. [23]: loss of normal morphology (1 point), discoloration of mucosa (1 point), hemorrhages (1 point), petechial points (1-3 points), ulcers up to 1 mm (n × 2 points), ulcers > 1 mm (n × 3 points).

Myeloperoxidase (MPO) activity in the gastric mucosa

Biopsy samples were defrosted and homogenized in 0.5% (w/v) hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0. Fifty microliters of each sample was added to 200 µl o-dianisidine solution (0.167 mg/ml o-dianisidine dihydrochloride, 0.0005% hydrogen peroxide in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0) immediately prior to reading a change in absorbance at 460 nm over 5 min using a microplate reader (Multiscan MS, Labsystems) [24].

Protein extraction and Western blot analysis

Mucosal stomach fragments were excised and immediately homogenized in solubilization buffer at 4°C (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF, and 0.1 mg aprotinin/ml). Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min, at 9000g, at 4°C. The protein concentration of the supernatants was determined by the Biuret method. The protein extracts were treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol and heated in a boiling water bath for 5 min. For immunoblot experiments, 0.2 mg protein extract from each sample was separated by SDS-PAGE in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean), transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-IL1β and anti-β-actin antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Calif., USA). The nitrocellulose membranes were developed using a chemoluminescent commercial kit (GE Healthcare, UK). Band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image Software; ScionCorp, Frederick, Md., USA) of the developed autoradiographs.

DNA damage assessed by comet assay

The cells from gastric biopsies were isolated as described by Pool-Zobel et al. [25]. Briefly, the biopsies were pooled and incubated with 5.5 mg proteinase K (Sigma-Aldrich) and 3 mg collagenase I (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA) in 3 ml Hank's balanced salt solution (HBSS; Invitrogen) for 45 min at 37°C to liberate the cells; the cells were then resuspended in 10 ml HBSS. The resulting suspensions were centrifuged at 750g for 5 min and the supernatant was discarded.

Since the comet assay should be performed only on samples with a cell viability of more than 75%, the cell viability was determined using the fluorescein-diacetate (FDA/ethidium bromide (EtBr); (Sigma-Aldrich)) assay [26]. Briefly, a fresh staining solution was prepared containing 30 µl FDA in acetone (5 mg/ml), 200 µl EtBr in PBS (PBS; 200 µg/ml), and 4.8 ml PBS (Invitrogen); 25 µl single-cell suspension was then mixed with 25 µl staining solution, spread onto a slide, and covered with a coverslip. Viable cells appeared green-fluorescent, whereas red-stained nuclei indicated dead cells. At least 200 cells were counted per sample.

The alkaline comet assay was performed according to Singh et al. [27] with some modifications. Briefly, 15 µl single-cell suspension ($\approx 2 \times 10^4$ cells) was mixed with molten 0.5% low-melting-point agarose (Promega Co., Madison, Wis., USA) and spread on agarose-precoated microscope slides. The slides were immersed overnight at 4°C in freshly prepared cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% sodium salt N-Lauryl sarcosine, pH 10, with 1% Triton X-100 and 10% DMSO; all from Sigma-Aldrich). Subsequently, the cells were exposed to alkaline buffer (1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH ≈ 13.4) at 4°C for 40 min to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was then done in the same solution at 4°C for 20 min using 25 V and 300 mA. After electrophoresis, the slides were neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with 40 µl EtBr (20 µg/ml) and analyzed with a fluorescence microscope (Eclipse E400; Nikon, Melville, N.Y., USA), using an image analysis system (Komet 5.5; Kinetic Imaging, Nottingham, UK). Two hundred randomly selected cells (100 from each of two replicate slides) were evaluated from each sample and the mean of the tail DNA was determined. Tail moment is defined as the product of DNA in the tail and the mean distance of migration in the tail and is calculated by multiplying tail intensity/sum comet intensity according to the tail center of gravity – peak position.

Statistical analysis

All data are expressed as means $\pm$ SEM. Comparisons among groups of data were done using one-way ANOVA followed by the Dunnett Multiple Comparisons test. Score values were expressed as individual data with respective medians and were analyzed using the Mann-Whitney test. The DNA damage data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. An associated probability (*p*-value) of less than 5% was considered significant.

Results*Characterization of antisecretory effects*

The dosage of 100 mg/kg omeprazole and ranitidine effectively promoted a gastric acid blockade, evaluated 5 h after the intraperitoneal administration (Figure 1A). Since these dosages were effective, they were used in the further experiments. The animals were given omeprazole, ranitidine or vehicle, intraperitoneally, daily at 2000 h for 7 days, and

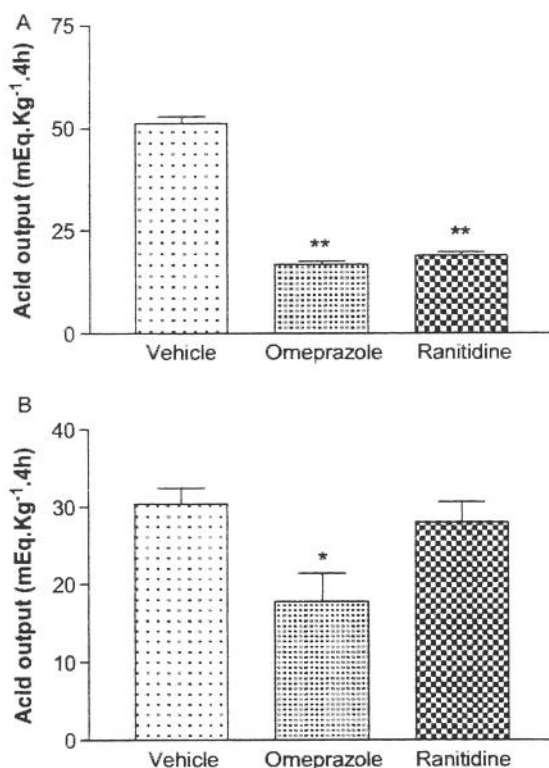


Figure 1. Effect of omeprazole (100 mg.kg⁻¹) and ranitidine (100 mg.kg⁻¹) treatment on basal gastric acid secretion in pylorus-ligated mice, evaluated after acute administration (A) and after the 1-week protocol, as described in the Material and methods section. The columns represent the means $\pm$ SEM of five mice. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared to the vehicle-treated group.

were evaluated on the 80th day. Seventeen hours after the last treatment, only the omeprazole group presented a reduced gastric acid content, while there was no difference in the values obtained from the ranitidine-treated group and those from the vehicle group (Figure 1B).

Level of *H. pylori* colonization

After one week of acid-suppressing medication, the bacteria colonization level was evaluated by assessing the amount of *H. pylori* DNA in samples of gastric biopsies by quantitative real-time PCR. Omeprazole-treated mice presented an increased level of *H. pylori* when compared with non-treated and ranitidine-treated mice (Figure 2). In non-infected animals, no detectable *H. pylori* DNA was observed.

Antiulcerogenic response

The animals infected with *H. pylori* (vehicle-treated group) presented macroscopic alterations, such as mucosa discoloration, small ulcers and petechial points, resulting in an Ulcerative Lesion Index that was significantly different from that of the non-infected animals. After one week of treatment with omeprazole and ranitidine, the Ulcerative Lesion Index obtained was reduced in comparison with that of the vehicle-treated animals (Figure 3). In these animals only some petechial points were observed.

MPO activity in the gastric mucosa

No significant differences were observed between the MPO activity in the mucosa of non-infected animals and those infected with *H. pylori* (vehicle-treated group). However, after one week of omeprazole

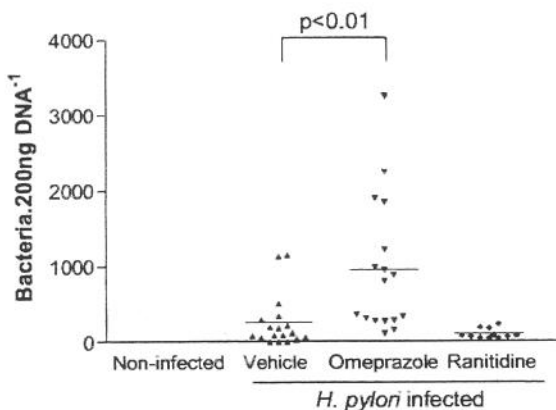


Figure 2. *H. pylori* colonization levels in non-infected and infected mice treated with omeprazole (100 mg.kg⁻¹), ranitidine (100 mg.kg⁻¹) or vehicle. Individual data are plotted and trace represents the mean value of 11–18 mice. $p < 0.01$ compared to the vehicle-treated group.

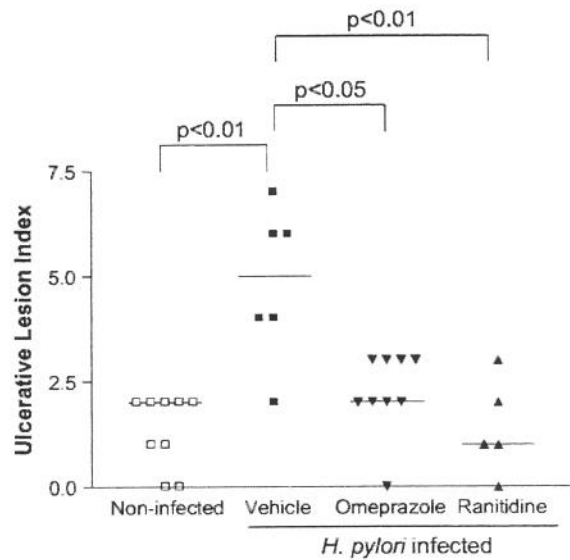


Figure 3. Ulcerative lesion index in non-infected mice and *H. pylori* infected mice treated with omeprazole (100 mg.kg⁻¹), ranitidine (100 mg.kg⁻¹) or vehicle. Individual data are plotted and trace represents the median value of 5–9 mice. $p < 0.05$ or $p < 0.01$ compared to the vehicle-treated group or non-infected animals.

treatment, there was a significant increase in the level of MPO activity in these animals in comparison with the vehicle-treated group. Ranitidine treatment did not modify the MPO activity in the gastric mucosa (Figure 4). Furthermore, there were no significant differences in gastric mucosal IL-1 β content in all groups (data not shown).

Bax and Bcl-2 expression in the gastric mucosa

H. pylori infection induces reduced expression of the Bcl-2 protein and increased expression of Bax

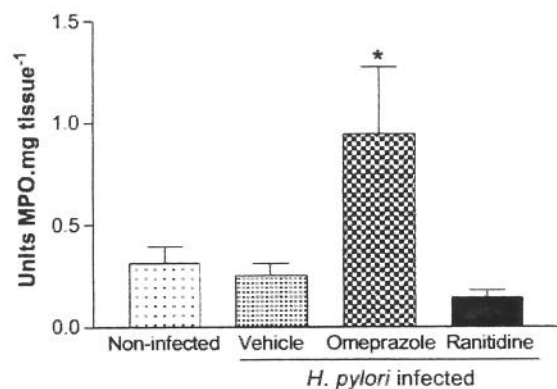


Figure 4. Myeloperoxidase activity (MPO) in gastric mucosa from non-infected mice and *H. pylori* infected mice treated with omeprazole (100 mg.kg⁻¹), ranitidine (100 mg.kg⁻¹) or vehicle. The columns represent the means $\pm$ SEM of six mice. * $p < 0.05$ compared to the vehicle-treated group.

protein in gastric mucosa, as evaluated by Western blot, when compared with non-infected animals. The one week of treatment with omeprazole led to an increase in the level of Bcl-2 expression, but did not modify the Bax levels in the same animals. No differences were observed in expressions of the Bax and Bcl-2 proteins in ranitidine-treated animals (Figure 5).

DNA damage in gastric cells

Animals infected with *H. pylori* had higher gastric levels of DNA damage compared with non-infected animals. There was no difference in the level of DNA damage in omeprazole-treated mice compared with

that of infected animals. Conversely, the level of DNA damage in ranitidine-treated mice was significantly higher than that observed in infected animals (Figure 6).

Discussion

PPIs, such as omeprazole, and histamine H_2 -receptor antagonists, such as ranitidine, are extensively used for the therapeutic control of acid-related disorders and for peptic-ulcer disease. PPIs inhibit the gastric acid secretion by irreversibly interacting with $H^+K^+ATPase$, the terminal proton pump of the parietal cell [28]. This mechanism of action provides a prolonged duration of acid suppression

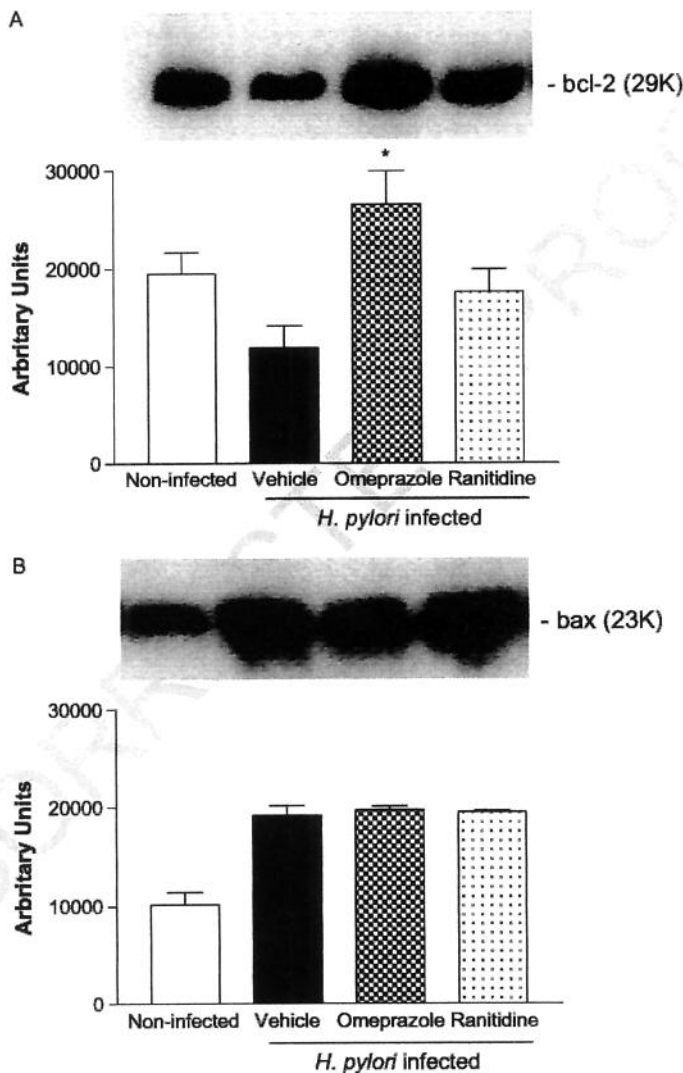


Figure 5. Bcl-2 (Panel A) and Bax (Panel B) protein expression in gastric mucosa of non-infected mice and *H. pylori* infected mice treated with omeprazole (100 mg.kg^{-1}), ranitidine (100 mg.kg^{-1}) or vehicle. Proteins were extracted and then subjected to Western blot analysis. The blot is representative of one experiment. Data are presented as means $\pm$ SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$ compared to the vehicle-treated group.

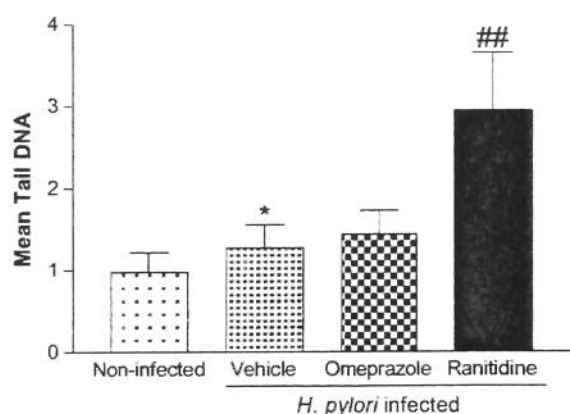


Figure 6. Levels of DNA damage in gastric mucosa of non-infected mice and infected mice treated with omeprazole (100 mg.kg^{-1}), ranitidine (100 mg.kg^{-1}) or vehicle. The columns represent the means $\pm$ SD of six mice. * $p < 0.05$; compared to the non-infected group, and ## $p < 0.01$ compared to the vehicle-treated group.

and a shorter nocturnal acid breakthrough in healthy volunteers when compared with histamine H_2 -receptor antagonists [29]. Experimental data also show that omeprazole provides a superior acid blockade than that observed with ranitidine after pylorus ligation [30]. We therefore first evaluated the effects of acute administration of 100 mg.kg^{-1} upon acid suppression; both omeprazole and ranitidine effectively inhibited gastric acid production. However, after one week of treatment, only omeprazole provided significant gastric acid inhibition one day after cessation of treatment, suggesting that omeprazole treatment results in a sustained acid gastric blockade while ranitidine treatment results in a daily period of acid blockade interchanged with a period of acid production.

The data presented here show a significant increase in *H. pylori* gastric colonization levels by omeprazole, whereas ranitidine treatment did not modify the number of bacteria. It has been shown that blockade of gastric acid with omeprazole produces a greater *H. felis* colonization in mice, mainly in the body part of the stomach, while ranitidine treatment is responsible for partial acid suppression and produces a slight increase in colonization [31]. Omeprazole treatment for 2 months also increased *H. pylori* infection in mice, suggesting that hypochlorhydria induced by PPI predisposes the stomach to bacterial overgrowth [32].

The mouse model of *H. pylori* infection by SS1 is characterized by a low neutrophilic infiltration [33,34]. Our data show that infected and non-infected mice present the same level of MPO activity in gastric mucosa. This is in agreement with previous reports by Elizalde et al. [35] who did not observe

any differences in MPO activity between animals infected with *H. pylori* for 4 weeks and control animals. However, the higher *H. pylori* colonization in omeprazole-treated mice was associated with an increased MPO level, suggesting that increased colonization evoked greater neutrophil infiltration. *In vitro* data suggest that omeprazole decreases the ability of neutrophils to migrate in response to classical stimuli and to *H. pylori* presence [14,15,36], but this ability was not observed *in vivo* [37]. Thus, we provide additional data to support the hypothesis that the anti-migratory ability of omeprazole is restricted to the *in vitro* assay, probably due to the higher concentration achieved in this situation.

Despite the higher MPO level observed in omeprazole-treated animals, both of these acid suppressive drugs were able to decrease the macroscopic lesions caused by *H. pylori* infection, suggesting that total or partial acid blockade provided by omeprazole and ranitidine, respectively, is essential to the healing of lesions developed by the bacteria. The lack of IL-1 β induction could be related to the fact that *H. pylori* infection often causes low-grade inflammation in the gastric mucosa [38].

Apoptosis is regulated by proteins from the Bcl-2 family, encoding proteins that can either inhibit (for example, Bcl-2, Bcl-X_L) or promote (for example, Bax, Bcl-X_S, Bak) cell death. The fine balance between pro- and antiapoptotic Bcl-2 family members regulates the cell fate in response to many (but not all) stress or signaling pathways [39]. *H. pylori* experimental infection results in a marked increase in Bax and a decrease in Bcl-2 expression in gastric mucosa, suggesting that a significant proapoptotic tendency is induced by *H. pylori* infection [40]. Our data confirm this previous report and show that omeprazole treatment restores gastric mucosa Bcl-2 production; however, no alterations were observed in Bax production, suggesting an antiapoptotic activity in *H. pylori*-infected stomachs.

The comet assay is a simple and sensitive test for evaluation of oxidative DNA damage, including double- and single-strand breaks, incomplete repair sites, alkali-labile sites, and crosslinks, at the individual cell level [26,41]. Thus, the extent of migration is proportional to the number of breaks in DNA, and its analysis allows indirect measurement of the number of DNA breaks at the single-cell level. Although the oxidative DNA damage seems to be reduced by omeprazole treatment during cold stress- and indomethacin-induced gastric ulceration [11], we did not find any gastric protection against the DNA damage generated by *H. pylori* infection after omeprazole treatment. Thus, we suggest that, in the experimental model of *H. pylori* infection in mice,

omeprazole did not reduce DNA damage, probably owing to an increase in the colonization rates generated after the treatment. With regard to the ranitidine treatment, our data show an increase in the oxidative DNA damage levels among treated animals. These data confirm earlier findings from Brambilla et al. [42] who found an increase in DNA fragmentation damage in gastric mucosa after ranitidine administration.

Thus, we conclude that omeprazole promotes a sustained acid blockade in comparison with ranitidine, which results in a higher level of *H. pylori* colonization that correlates with high MPO levels; therefore, both drugs are able to improve the macroscopic damage induced by *H. pylori* infection. The additional antineutrophil properties ascribed to omeprazole were not observed in this *in vivo* animal model, corroborating with the idea that this action can only be observed with *in vitro* dosages. Furthermore, omeprazole may restore Bcl-2 production in gastric mucosa, decreased by *H. pylori* colonization, suggesting an antiapoptotic activity of this drug.

Acknowledgement

We thank the FAPESP for financial support.

References

- [1] Abdel-Salam OM, Czimmer J, Debrececi A, Szolcsanyi J, Mozsik G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. *J Physiol Paris* 2001; 95:105–27.
- [2] Penta R, De Falco M, Iaquinio G, De Luca A. *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells: from gastritis to cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24:337–45.
- [3] Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996;38:498–501.
- [4] Mizuki I, Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, Munakata A. Association of gastric epithelial apoptosis with the ability of *Helicobacter pylori* to induce a neutrophil oxidative burst. *J Med Microbiol* 2000;49:521–4.
- [5] Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, et al. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res* 1996;56:1279–82.
- [6] Knaapen AM, Seiler F, Schilderman PA, Nehls P, Bruch J, Schins RP, et al. Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;27: 234–40.
- [7] Ulmer HJ, Beckerling A, Gatz G. Recent use of proton pump inhibitor-based triple therapies for the eradication of *Helicobacter pylori*: a broad data review. *Helicobacter* 2003;8:95–104.
- [8] Koivisto TT, Rautelin HI, Voutilainen ME, Heikkinen MT, Koskenpato JP, Farkkila MA. First-line eradication therapy for *Helicobacter pylori* in primary health care based on antibiotic resistance: results of three eradication regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:773–82.
- [9] Robinson M. Proton pump inhibitors: update on their role in acid-related gastrointestinal diseases. *Int J Clin Pract* 2005; 59:709–15.
- [10] Huggins RM, Scates AC, Latour JK. Intravenous proton-pump inhibitors versus H₂-antagonists for treatment of GI bleeding. *Ann Pharmacother* 2003;37:433–7.
- [11] Biswas K, Bandyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E, Banerjee RK. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J Biol Chem* 2003;278:10993–1001.
- [12] Natale G, Lazzeri G, Lubrano V, Colucci R, Vassalle C, Fornai M, et al. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:62–72.
- [13] Kuroda M, Yoshida N, Ichikawa H, Takagi T, Okuda T, Naito Y, et al. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, reduces the severity of indomethacin-induced rat enteritis. *Int J Mol Med* 2006;17:89–93.
- [14] Wandall JH. Effects of omeprazole on neutrophil chemotaxis, super oxide production, degranulation, and translocation of cytochrome B-245. *Gut* 1992;33:617–21.
- [15] Suzuki M, Mori M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, Kimura H, et al. Omeprazole attenuates oxygen-derived free radical production from human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1999;21:727–31.
- [16] Yoshida N, Yoshikawa T, Tanaka Y, Fujita N, Kassai K, Naito Y, 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.
- [17] 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.
- [18] Rajendra S, Mulcahy H, Patchett S, Kumar P. The effect of H₂ antagonists on proliferation and apoptosis in human colorectal cancer cell lines. *Dig Dis Sci* 2004;49:1634–40.
- [19] Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Endothelin-1, interleukin-4 and nitric oxide synthase modulators of gastric mucosal injury by indomethacin: effect of antiulcer agents. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:197–210.
- [20] Okajima K, Harada N, Uchiba M. Ranitidine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301: 1157–65.
- [21] Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, et al. The effects of cimetidine, ranitidine, and famotidine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1999;89:218–24.
- [22] 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.
- [23] Gamberini MT, Skorupa LA, Souccar C, Lapa AJ. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86:137–9.
- [24] Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78:206–9.
- [25] Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambert R, Leucht U, et al. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ Mol Mutagen* 1994;24:23–45.
- [26] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for

AQ1

Acid gastric inhibitors on *H. pylori* infection 9

- in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–21.
- [27] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;184–91.
- [28] Fellenius E, Berglindh T, Sachs G, Olbe L, Elander B, Sjostrand SE, et al. Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H⁺/K⁺)ATPase. *Nature* 1981;290:159–61.
- [29] Ozawa T, Yoshikawa N, Tomita T, Akita Y, Mitamura K. The influence of feeding on gastric acid suppression in *Helicobacter pylori*-positive patients treated with a proton pump inhibitor or an H₂-receptor antagonist after bleeding from a gastric ulcer. *J Gastroenterol* 2003;38:844–8.
- [30] Chattopadhyay I, Nandi B, Chatterjee R, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Mechanism of antiulcer effect of Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract: effect on H⁺-K⁺-ATPase, oxidative damage and apoptosis. *Inflammopharmacology* 2004;12:153–76.
- [31] Danon SJ, O'Rourke JL, Moss ND, Lee A. The importance of local acid production in the distribution of *Helicobacter felis* in the mouse stomach. *Gastroenterology* 1995;108:1386–95.
- [32] Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Samuelson LC, Merchant JL. Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology* 2002;122:119–33.
- [33] Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386–97.
- [34] van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, Stoof J, van Rees EP, van Doorn LJ, et al. *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun* 1999;67:3040–6.
- [35] Elizalde JI, Mendez A, Gomez J, del Rivero M, Gironella M, Closa D, et al. Gastric mucosal blood flow changes in *Helicobacter pylori* infection and NSAID-induced gastric injury. *Helicobacter* 2003;8:124–31.
- [36] Martins de Oliveira R, Antunes E, Pedrazzoli J. Jr, Gambero A. The inhibitory effects of H⁺-K⁺-ATPase inhibitors on human neutrophils in vitro: Restoration by a K⁺ ionophore. *Inflammation Res* 2007. In press.
- [37] Becker TL, Marostica M, Ribeiro ML, de Mendonca S, Gambero A, Pedrazzoli J Jr. Pantoprazole treatment does not invoke anti-inflammatory properties in vivo. *Int Immunopharmacol* 2004;4:1051–7.
- [38] Wadstrom T, Rydberg J, Rozalska B, Lehwala-Guruge J. Intravenous *Helicobacter pylori* induces low levels of TNF- α and IL-1 α in a murine model. *APMIS* 1994;102:49–52.
- [39] Martin DA, Elkon KB. Mechanisms of apoptosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:441–54.
- [40] Nam KT, Hahn KB, Oh SY, Yeo M, Han SU, Ahn B, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide prevents *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer development in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2004;10:8105–13.
- [41] Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* 2003;18:45–51.
- [42] Brambilla G, Cavanna M, Faggini P, Maura A, Pino A, Ricci R, et al. Genotoxic effects in rodents given high oral doses of ranitidine and sodium nitrite. *Carcinogenesis* 1983;4:1281–5.

AQ2