

U. PORTO



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Efeito de bebidas alcoólicas no crescimento *in vitro*
de *Helicobacter pylori***

Maria Palma Mateus Lopes

Fevereiro 2005



U. PORTO



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Efeito de bebidas alcoólicas no crescimento *in vitro* de
*Helicobacter pylori***

Maria Palma Mateus Lopes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Clínica

**Orientador: Professor Doutor Nuno Borges
Co-Orientadora: Professora Doutora Lídia Dionísio**

Fevereiro 2005

Gostaria de dedicar o meu trabalho ao homem, cujos ensinamentos tenho sempre presentes e que me dão a força interior que necessito para ultrapassar obstáculos, traçar rumos e conseguir atingi-los. Ao ver concluída a minha tese, dou-lhe a máxima razão. Pois querer é definitivamente poder.

Espero que à distância, ainda consiga aplaudir e ver todas as vitórias que consegui ao longo do meu percurso profissional, e ficar orgulhoso pelos seus ensinamentos não se perderem com o tempo e com a ausência.

Obrigada, Pai.
Que me guies sempre.

Agradecimentos

À Reitoria da Universidade do Algarve por me ter facultado os meios necessários à realização deste trabalho, nomeadamente dispensa de serviço docente durante a realização da componente prática.

Ao iBeSa - Instituto de Bebidas e Saúde, em particular ao Sr. Engenheiro Machado Cruz pela atribuição de uma bolsa de incentivo à investigação e por me disponibilizar o xantohumol e a cerveja enriquecida em xantohumol e iso-xantohumol.

Ao meu orientador Professor Nuno Borges pela total disponibilidade, incentivo, aconselhamento e apoio prestados durante a realização deste trabalho.

À Professora Lídia Dionísio pela confiança depositada, acompanhamento prestado e por todos os conhecimentos valiosos que me transmitiu.

À Professora Nídia Braz pelo seu apoio e incentivo.

À Ana Paula Carvalho por me ter iniciado no “universo” do *Helicobacter pylori*.

Ao Eduardo Esteves pelo apoio estatístico, disponibilidade e paciência.

Às minhas colegas Teresa Manso, Sílvia Martins e Andreia Adrião pela forma como me receberam e me integraram no laboratório, pelos bons momentos que passámos e pela sua amizade.

À Dina Neves, à Julieta Costa e à Lizeta Viegas por toda a ajuda prestada.

À Ana Pelerito pelas suas sugestões e ajuda.

À Catarina Pereira que me acompanhou na fase final e, cuja ajuda foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Mónica Caixinha pela sua ajuda e amizade.

À Dulce Estêvão pela sua total disponibilidade, apoio e incentivo, pelas nossas conversas... e, pela sua amizade.

Aos meus tios Zélia e Adelino e ao Joaquim pelo carinho com que sempre me receberam em sua casa, quando me deslocava ao Porto.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha mãe, filha, marido e irmã pelo seu apoio incondicional, carinho e compreensão sem os quais não teria chegado ao fim.

Índice

Lista de quadros e figuras	i
Resumo	ii
Abstract	iv
1. Introdução	1
1.1. Epidemiologia da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2. <i>Helicobacter pylori</i>	3
1.2.1. Características da bactéria	3
1.2.1.1. Morfologia	3
1.2.1.2. Características fisiológicas e bioquímicas	4
1.2.2. Virulência e patogenicidade de <i>Helicobacter pylori</i>	6
1.2.2.1. Factores de colonização	7
1.2.2.2. Factores de persistência	8
1.2.2.3. Factores tóxicos	10
1.2.3. Resposta imune do hospedeiro	13
1.2.4. Consequências clínicas da infecção	14
1.2.5. Tratamento da infecção	15
1.3. O consumo de bebidas alcoólicas e <i>Helicobacter pylori</i>	16
1.4. Objectivos do trabalho	22
2. Materiais e métodos	23
2.1. Estirpes estudadas	23
2.2. Obtenção das estirpes	23
2.3. Exame cultural	24
2.3.1. Preparação do inóculo	24
2.3.2. Incubação	24
2.3.3. Identificação	25
2.3.4. Obtenção de culturas puras	26
2.3.5. Conservação dos isolados	26
2.4. Caracterização molecular das estirpes estudadas	27

2.5. Ensaio	28
2.5.1. Bebidas estudadas	28
2.5.2. Outras substâncias estudadas	28
2.6. Preparação do inóculo	29
2.6.1. Aplicação do inóculo e condições de crescimento	29
2.7. Ensaio com vinho	30
2.8. Ensaio com cerveja	30
2.9. Ensaio com resveratrol	31
2.10. Ensaio com xantohumol	32
2.11. Controlo do efeito dos solventes no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.12. Controlo do efeito da graduação alcoólica das bebidas testadas no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.13. Análise estatística dos resultados	33
3. Resultados	35
3.1. Efeito das bebidas testadas no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	35
3.2. Efeito do xantohumol e do resveratrol no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	37
3.3. Virulência das estirpes e efeitos inibitórios no crescimento	39
3.4. Efeito dos solventes no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	42
3.5. Efeito da graduação alcoólica das bebidas no crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	42
4. Discussão e Conclusões	43
5. Bibliografia	54
Anexo 1 - Resultados obtidos nos ensaios com as diferentes bebidas e substâncias	a1
Anexo 2 - Meios e soluções	a7
Anexo 3 - Material	a9
Anexo 4 - Equipamento	a10

Lista de quadros e figuras

Quadros

Quadro 1 – Factores de patogenicidade de <i>Helicobacter pylori</i>	6
Quadro 2 – Caracterização das estirpes de <i>Helicobacter pylori</i> utilizadas	27
Quadro 3 – Composição dos meios de cultura com diferentes concentrações de vinho	30
Quadro 4 – Composição dos meios de cultura com diferentes concentrações de cerveja	31
Quadro 5 – Análise da variável categórica “Tipo de tratamento” para as bebidas	36
Quadro 6 – Análise da variável categórica “Tipo de tratamento” para os compostos fenólicos	38
Quadro 7 – Categorias da variável “Grupo”	39
Quadro 8 – Análise da variável categórica “Grupo” para as bebidas	40
Quadro 9 – Análise da variável categórica “Grupo” para os compostos fenólicos	41

Figuras

Figura 1 – Curvas logísticas da probabilidade de crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> em função das concentrações das bebidas	37
Figura 2 – Curvas logísticas da probabilidade de crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> em função das concentrações de xantohumol e resveratrol	38
Figura 3 – Curvas logísticas da probabilidade de crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> em função dos diferentes grupos de virulência para as bebidas	40
Figura 4 – Curvas logísticas da probabilidade de crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> em função dos diferentes grupos de virulência para os compostos fenólicos	41

Resumo

A infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) afecta 50 % da população mundial e está associada à gastrite crónica, à úlcera péptica e ao cancro gástrico. A aquisição da infecção por *H. pylori* e a sua erradicação espontânea parece ser comum na infância. Na fase adulta, a infecção é mais persistente. Alguns autores defendem que o consumo de bebidas alcoólicas pode contribuir para a erradicação espontânea de *H. pylori*, nos adultos. Esta hipótese é apoiada por vários estudos epidemiológicos e experimentais.

No presente trabalho foi testada, *in vitro*, a actividade anti *H. pylori* de vinho tinto e branco, de diferentes tipos de cerveja (branca com e sem álcool, preta com álcool e preta com álcool enriquecida com xantohumol e iso-xantohumol), assim como do resveratrol e do xantohumol, compostos fenólicos presentes no vinho e na cerveja, respectivamente.

Onze estirpes clínicas e uma estirpe de referência (CCUG 15818) de *H. pylori* foram inoculadas em agar Columbia suplementado com 10 % de sangue, ao qual foram adicionadas as várias bebidas e os compostos fenólicos, em diferentes concentrações, e incubadas em condições de microaerofilia, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

A inibição do crescimento, *in vitro*, de todas as estirpes estudadas, foi observada para as concentrações de 45 % para os vinhos (tinto e branco) e de 67,5 % para as cervejas com álcool (branca, preta e preta enriquecida). A cerveja sem álcool

inibiu o crescimento de 83 % das estirpes estudadas, para uma concentração de 90%.

O resveratrol e o xantohumol apresentaram actividade anti *H. pylori* para todas as estirpes para uma concentração de 100 µg/ml.

Através deste trabalho verificou-se que os vinhos tinto e branco, assim como as cervejas (branca com álcool, preta com álcool e preta enriquecida) inibem o crescimento de *H. pylori in vitro*. Os resultados obtidos com as bebidas, cujo efeito inibitório foi superior ao dos compostos fenólicos isolados, levanta a hipótese de que estas bebidas têm outros constituintes como o etanol e/ou outros compostos polifenólicos que actuam de forma aditiva ou sinérgica potenciando o efeito destes.

Abstract

The prevalence of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection is around 50 % of the world population and is associated with chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer.

Acquiring the *H. pylori* infection and its spontaneous eradication seems to be common during childhood. In adults, the infection is more persistent. Some authors propose that the consumption of alcoholic beverages may contribute to the spontaneous eradication of *H. pylori* in adults. This hypothesis is supported by experimental and epidemiological studies.

In the present work, the anti- *H. pylori* activity of some alcoholic beverages (red and white wine, alcohol-free white beer, white beer with alcohol, stout beer and stout beer enriched with xanthohumol and iso-xanthohumol) was studied. The anti *H. pylori* activity of resveratrol and xanthohumol, phenolic compounds present in wine and beer, respectively, was also studied.

Eleven clinical strains and one reference strain (CCUG 15818) of *H. pylori* were inoculated in Columbia agar supplemented with 10 % of blood. The beverages and compounds in study were added in different concentrations, and were incubated in micro-aerophilic conditions, at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 hours.

Growth was inhibited *in vitro* for all strains studied in the presence of 45 % of wine (red and white) and 67,5 % of beer with alcohol (white, stout and stout enriched).

Non-alcohol beer inhibited the growth of 83 % of the studied strains when the concentration was 90 %. Resveratrol and xanthohumol presented anti *H. pylori* for all the studied strains at 100 µg/ml.

It was observed that the red wine, white wine and the beer (white with alcohol, stout and stout enriched) inhibited *H. pylori* growth *in vitro*, suggesting that the alcoholic beverages had other components, ethanol and/or polyphenolic components which may have additive or synergic effects.

1. Introdução

1.1. Epidemiologia da infecção por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) foi isolado pela primeira vez, em 1982, por Warren e Marshall, na Austrália (1,2). Esta bactéria foi inicialmente integrada no género *Campylobacter* e denominada como *Campylobacter pylori*. Em 1989, foi criado o género *Helicobacter*, por se considerar que, pela sua morfologia e características estruturais e genéticas, devia ser colocada num novo género, passando a denominar-se *Helicobacter pylori* (3,4).

Estima-se que, nos países desenvolvidos, a infecção por *H. pylori* afecte 20% dos indivíduos com idade inferior a 40 anos e 50% dos indivíduos com idade acima dos 60 anos. Nos países em desenvolvimento, a maioria da população jovem está infectada e a prevalência na população adulta varia entre os 60 e os 90% (3-7). Em Portugal, a prevalência da infecção é elevada e estima-se que 80% da população jovem adulta esteja infectada (8).

A infecção por *H. pylori* é, normalmente, assintomática mas tem sido associada ao desenvolvimento de gastrite crónica, úlcera péptica, cancro gástrico e linfoma gástrico do tipo Malt (3,5,9-13). No entanto, nos países em desenvolvimento, estas patologias apresentam uma incidência baixa e a infecção por *H. pylori* parece estar relacionada com malnutrição, diarreia crónica, crescimento deficiente e predisposição para outras patologias entéricas como a febre tifóide e a cólera. Este fenómeno é bem ilustrado pelo continente africano que apresenta uma

prevalência da infecção que ronda os 90% mas com uma incidência baixa de cancro gástrico. É o chamado “enigma africano” (14, 15).

Transmissão da infecção

O estômago humano é o reservatório desta bactéria, que terá acompanhado o processo evolutivo do Homem, desenvolvendo mecanismos que lhe permitem crescer e multiplicar-se nas condições hostis (pH ácido) do meio gástrico (6,16). No entanto, a forma de transmissão e aquisição da infecção por *H. pylori* ainda está por esclarecer. Vários estudos epidemiológicos sugerem que o primeiro contacto com a bactéria ocorre na infância e que a via de transmissão é inter-humana (4,9,10,12,17,18).

São considerados factores de risco para a infecção por *H. pylori* o baixo nível sócio-económico, as deficientes condições higieno-sanitárias, a possível contaminação de alimentos e água, a promiscuidade, o superpovoamento do agregado habitacional e a existência de infecção no agregado familiar (4,6,14,18,19).

Estes dados são corroborados pela elevada prevalência de anticorpos anti-*H. pylori* em populações institucionalizadas (orfanatos, infantários, lares de idosos, hospitais psiquiátricos), sugerindo que o contacto físico próximo entre os indivíduos, pode contribuir para a disseminação da infecção (4). A elevada prevalência da infecção em indivíduos da mesma família também apoia esta hipótese (disseminação intra familiar) (4,19).

Pensa-se que a transmissão da infecção poderá ocorrer por via oral-oral ou por via fecal-oral (10,18,19).

A transmissão por via oral-oral poderá resultar do contacto com o suco gástrico proveniente de vômito ou regurgitação. Mais recentemente, a detecção de *H. pylori* em amostras de saliva e na placa dentária de indivíduos com infecção gástrica, veio reforçar a hipótese do contacto oral como forma de transmissão (3,4,6,18,19).

A importância da via fecal-oral na transmissão da infecção por *H. pylori* não está claramente estabelecida mas constitui também uma hipótese credível (4,6,18,19). Existem evidências de que a bactéria poderá ser excretada viável nas fezes conseguindo sobreviver no ambiente, tornando possível a transmissão da infecção através da ingestão de alimentos ou água contaminados (4,6,12). Nos países sub-desenvolvidos, as condições higieno-sanitárias deficientes privilegiam a hipótese de transmissão por via fecal-oral, sendo o contrário válido para os países desenvolvidos (8,18).

1.2. *Helicobacter pylori*

1.2.1. Características da bactéria

1.2.1.1. Morfologia

H. pylori é uma bactéria Gram negativa, com forma espiralada ou encurvada, quando isolada a partir de biópsias gástricas (5,20,21). Tem 2,5 a 5,0 μm de

comprimento e 0,5 a 1,0 μm de diâmetro. As suas extremidades são arredondadas, emergindo de uma delas, entre quatro a seis flagelos (3,5,20,21), com comprimento aproximado de 3,0 μm e 2,5 nm de diâmetro, o que lhe confere grande mobilidade em meios viscosos, como o meio gástrico (5,20,21).

Quando cultivadas *in vitro*, as células visualizadas, após coloração, assumem as formas de bastonete ou em U (forma cocóide) (5,20,21). Em condições de stresse físico ou químico (aumento da tensão de oxigénio, pH alcalino, aumento de temperatura, tempo de incubação prolongado e tratamento das culturas com omeprazole ou antibióticos), *H. pylori* pode apresentar uma forma cocóide com tamanho variável entre 0,8 a 1,0 μm , não cultivável *in vitro*. Estas formas não possuem flagelos unipolares e, apesar de não se multiplicarem *in vitro*, parecem ser metabolicamente activas (5,20,21).

1.2.1.2. Características fisiológicas e bioquímicas

H. pylori é uma bactéria exigente em termos nutricionais e ainda não foi descrito um meio de cultura óptimo (sólido ou líquido). Contudo, sabe-se que necessita de um meio basal complexo (Columbia agar; agar com infusão de cérebro e coração "BHIA"; agar base com carvão) enriquecido com sangue, plasma ou emulsão de gema de ovo (5,21,22).

O seu crescimento *in vitro* ocorre sob condições de microaerofilia (5% de oxigénio e 10% de dióxido de carbono) a uma temperatura de 37°C, após quatro a cinco

dias de incubação para culturas primárias (obtidas a partir de biópsias gástricas) ou dois dias para as culturas subsequentes (3,5,21).

A espécie *H. pylori* é urease, oxidase e catalase positiva. Estas características bioquímicas associadas à sua morfologia espiralada e ao crescimento, em meio sólido selectivo, sob a forma de pequenas colónias (3 mm) translúcidas, são usualmente consideradas adequadas para a sua identificação (3,5,21).

A actividade ureásica desta bactéria é muito intensa, o que permitiu desenvolver métodos fiáveis de diagnóstico. Estes métodos podem ser invasivos e consistem na detecção directa desta enzima a partir de biópsias gástricas. A presença de urease é determinada pela mudança de cor do meio em que a biópsia é depositada, que resulta da hidrólise da ureia em amónia, aumentando o pH do referido meio. Outros métodos utilizados são os testes respiratórios, métodos do tipo não invasivo. Estes testes usam ureia marcada com isótopos de carbono, cuja presença é quantificada posteriormente no ar expirado, após a hidrólise da ureia e consequente libertação de dióxido de carbono. A detecção de dióxido de carbono isotópico revela a presença de infecção por *H. pylori* (5,21,23).

In vitro, *H. pylori* é resistente ao ácido nalidíxico, ao trimetoprima, às sulfanomidas e à vancomicina. Apresenta sensibilidade variável à claritromicina e ao metronidazol (5,21)

1.2.2. Virulência e patogenicidade de *Helicobacter pylori*

A evolução clínica da infecção por *H. pylori* resulta de uma complexa interação entre os factores de patogenicidade da bactéria, os factores de susceptibilidade do hospedeiro e factores ambientais. Os factores de patogenicidade permitem à bactéria (Quadro 1):

- Colonizar a mucosa gástrica;
- Persistir no estômago, desencadeando uma resposta inflamatória crónica;
- Produzir substâncias lesivas para a mucosa gástrica (11,24,25).

Quadro 1 – Factores de patogenicidade de *Helicobacter pylori* (adaptado de 24)

Factores de Colonização	Factores de persistência	Factores tóxicos
Urease	Urease	Urease
Motilidade	Catalase e Dismutase do superóxido	Lipopolissacáridos
Aderência		Citotoxina Vacuolizante (Vac A)
Ceroprinas		Ilhéu de patogenicidade <i>cag</i>

1.2.2.1. Factores de colonização

Urease

É reconhecida a importância da urease para a colonização e sobrevivência desta bactéria em meio gástrico, pois catalisa a hidrólise da ureia em amónia, alcalinizando o ambiente peribacteriano, o que protege a bactéria do meio ácido

em que se encontra (5,11,21). Estudos *in vitro* demonstraram que esta bactéria não sobrevive em meio ácido sem a presença desta enzima (21).

A actividade da enzima é regulada pela existência de um canal (URE I) para a ureia e pelo pH. Em presença de pH baixo, o canal abre permitindo a saída de ureia; em meio alcalino, o canal fecha, impedindo a saída de ureia (7,26,27).

Motilidade

A forma espiralada e a presença dos seus quatro a seis flagelos conferem a *H. pylori* a capacidade de se movimentar no muco gástrico, permitindo-lhe atingir as células da mucosa gástrica (11,21,24,25). Os flagelos são revestidos por uma dupla camada fosfolipídica que os protege do meio ácido gástrico (20,24).

Aderência

A aderência às células epiteliais gástricas é outro factor preponderante na colonização por *H. pylori* (24,25,28).

Foram identificadas várias moléculas de adesão produzidas pela bactéria, de que a hemaglutinina é um exemplo, que interagem e se ligam a receptores nas células epiteliais gástricas como a fosfatidiletanolamina (5,11,24).

Um outro receptor descrito para *H. pylori* é um antigénio dos grupos sanguíneos do sistema Lewis (antigénio Lewis^b), determinante do grupo sanguíneo O, que

também é expresso ao nível dos tecidos epiteliais (5,21,24,25,27). Este antigénio funciona como receptor para uma adesina de *H. pylori* e estudos em ratinhos têm demonstrado que a aderência por esta via resulta no desenvolvimento de gastrite crónica e atrofia gástrica (19,24), o que poderá explicar a susceptibilidade individual para a infecção por *H. pylori* em indivíduos deste grupo sanguíneo (24,25,29). A adesina responsável pela aderência desta bactéria aos antigénios Lewis^b, produzidos pelas células epiteliais gástricas, é a proteína BabA (*Blood-group antigen-binding protein*) que pertence à família das proteínas externas da membrana (16,24,27,28).

Ceroprinas

As ceroprinas são proteínas produzidas por *H. pylori* que inibem o crescimento de outras bactérias presentes no nicho gástrico, impedindo a colonização da mucosa gástrica por outras espécies bacterianas (11,29). Estas proteínas apresentam propriedades que actuam contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (11,29).

1.2.2.2. Factores de persistência

Uma vez estabelecida a infecção por *H. pylori*, esta persiste normalmente durante toda a vida do hospedeiro. A resposta imunitária e inflamatória desencadeada pela presença da bactéria na mucosa gástrica, parece ser ineficaz na sua eliminação. A persistência da infecção e consequente resposta imunitária e inflamatória crónica, determinam a patogenicidade desta bactéria (13,24).

Urease

A urease, ao alcalinizar o meio peribacteriano através da formação de amónia, poderá ter simultaneamente um efeito inibidor sobre as células fagocitárias (monócitos e neutrófilos), libertadas na sequência da resposta inflamatória à presença desta bactéria, contribuindo deste modo para a persistência da infecção (24).

Catalase e Dismutase do superóxido

Pensa-se que estas enzimas contribuem conjuntamente com a urease para a resistência de *H. pylori* à acção das células fagocitárias (27). Como resultado da fagocitose, ocorre a libertação de espécies reactivas de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio, aniões superóxido e os radicais hidroxilo. Estas substâncias são tóxicas para *H. pylori* que possui, no entanto, enzimas capazes de neutralizá-las, nomeadamente a catalase e a dismutase do superóxido (24,27).

1.2.2.3. Factores tóxicos

Urease

A urease parece actuar não só como factor determinante na colonização mas também como factor de virulência (5,24). A amónia resultante da hidrólise da

ureia vai combinar-se com água formando hidróxido de amónio que é lesivo para o epitélio gástrico (24).

Por outro lado, tem sido sugerido que a enzima urease pode desencadear a activação de monócitos e leucócitos polimorfonucleares e estimular a produção de citocinas, que vão também exercer uma acção tóxica sobre o epitélio gástrico (5,24).

Lipopolissacáridos (LPS)

As moléculas de LPS pertencentes à família de glicolípidos presentes na membrana celular das bactérias Gram negativas, encontram-se também na espécie *H. pylori* e, apesar de, aparentemente, possuírem um baixo poder antigénico, têm sido reconhecidas como factores importantes na virulência desta bactéria (5,11,24).

Os lipopolissacáridos parecem contribuir para a modificação de estruturas da mucosa gástrica (24,30), interferindo na interacção das mucinas com os seus receptores na mucosa (5,11).

Outro efeito relacionado com a fracção glicoproteica de LPS, resulta da homologia estrutural que pode apresentar com as cadeias oligossacáridas dos antigénios Lewis^x e Lewis^y (5,24). Esta homologia foi encontrada em 80% das estirpes de *H. pylori*. Indivíduos infectados com estas estirpes desenvolvem anticorpos específicos para aqueles antigénios. Como as células parietais humanas

apresentam, à sua superfície, grande quantidade destes antígenos, poderá desencadear-se uma reacção auto-imune dirigida a estas células. Como consequência, poderão ocorrer lesões na mucosa, que podem dar origem a um quadro clínico de atrofia gástrica, situação precursora de cancro gástrico (21,24).

Citotoxina vacuolizante (VacA)

Cerca de metade das estirpes de *H. pylori* estudadas produzem a citotoxina VacA, uma proteína que provoca degenerescência vacuolar em culturas de células gástricas humanas e ulceração gástrica em experiências com animais de laboratório (5,10,12,21, 24,31).

Embora o gene *vacA* tenha sido identificado em quase todas as estirpes estudadas, a expressão da toxina é determinada por variações na sequência de nucleotídeos, nomeadamente na região sinal (tipos s1 e s2) e na região média (tipos m1 e m2) (21,24,31,32). Estirpes com o tipo s1 produzem toxina com actividade vacuolizante enquanto as estirpes com o tipo s2 apresentam baixa actividade citotóxica (18,31,32). Sabe-se ainda, que as estirpes que apresentam a combinação genética s1/m1 são mais tóxicas que as estirpes tipo s1/m2, sendo associadas a formas severas de gastrite, a gastrite atrófica e a metaplasia intestinal (21,31,33).

Ilhéu de patogenicidade *cag*

O ilhéu de patogenicidade *cag* foi identificado no genoma de 60% das estirpes de *H. pylori* estudadas e, determina a expressão de várias proteínas associadas à patogenicidade de *H. pylori* (4,21,24,33,34).

Nesta região está localizado o gene *cagA* que determina a expressão da proteína CagA (*cytotoxin associated gene*), cuja função não está ainda determinada, mas que constitui um marcador para o ilhéu de patogenicidade (4,21,24,33,34). A sua presença promove um aumento do estado inflamatório da mucosa, pela infiltração de células polimorfonucleares e um aumento da produção de interleucina 8 (IL 8) (6,16,21,24,32).

Em geral, as estirpes *vacA* do tipo s1 são produtoras da proteína CagA e têm sido frequentemente isoladas em indivíduos com úlcera péptica e carcinoma gástrico (sobretudo na Europa Ocidental e nos Estados Unidos), pelo que estes dois marcadores têm sido associados a este tipo de patologias (35-38).

Mais recentemente, tem sido descrito o papel destes marcadores, como factores inibidores de mucina nas células da mucosa gástrica, o que poderá reforçar a sua associação com o risco aumentado de desenvolvimento de doença ulcerosa (32).

1.2.3. Resposta imune do hospedeiro

Da infecção por *H. pylori* resulta uma resposta inflamatória que, apesar de recrutar e activar células linfocitárias, células fagocitárias e outras células do sistema imunitário, pode persistir durante anos ou décadas (5,10,21,34).

A resposta inflamatória inicial não específica caracteriza-se pela activação de células fagocitárias, macrófagos e neutrófilos, como resposta directa a factores bacterianos libertados no meio, como a proteína activadora de neutrófilos (PAN), urease e LPS, e indirectamente através de produtos de activação do complemento e citocinas, como a IL 8 e a IL1 β (10,13,24,27,34). A produção de IL 8 pelo epitélio é também estimulada pela acção de determinadas estirpes mais virulentas de *H. pylori*, que contêm o ilhéu de patogenicidade *cag* (13,24,39).

Após a resposta inflamatória inicial, desenvolve-se uma resposta imunitária específica, simultaneamente humoral e celular (10,13,21,24,34). A resposta humoral resulta na produção de anticorpos anti *H. pylori* do tipo IgG e IgA, que podem ser detectados a nível do estômago (resposta local), do sangue, da saliva e da urina (resposta sistémica) (3,10,13,24). Os anticorpos do tipo IgG podem gerar complexos imunes com os antígenos bacterianos, que têm efeitos lesivos na mucosa gástrica resultantes da activação de células polimorfonucleares, produtoras de substâncias citotóxicas (13,21,24).

A resposta celular resulta da activação dos linfócitos Th (*T helper*). A produção de IL12, activada pelos antígenos de *H. pylori*, estimula os linfócitos do tipo Th1 a

produzir interferão γ ($\text{INF}\gamma$) indutor de apoptose das células epiteliais, factor de necrose tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), IL2 e IgG e a activar macrófagos, favorecendo a persistência da inflamação (13,21,24). A estimulação de linfócitos do tipo Th2 leva à produção de IL4, IL5, IL10 e de anticorpos, nomeadamente IgA, que têm uma acção protectora (13,21,24). Apesar da resposta imunológica do hospedeiro, a bactéria persiste, pelo que muitos investigadores associam a persistência da bactéria à sua virulência (13, 21)

1.2.4. Consequências clínicas da infecção

H. pylori está presente na maioria dos doentes com gastrite crónica activa e o seu papel causal tem sido demonstrado em vários estudos (5,9,10).

H. pylori foi isolada em 95% dos doentes com úlcera duodenal (5,7,9,10,11). A prevalência da infecção em doentes com úlcera gástrica é inferior (80%), mas este número aproxima-se dos 100%, quando algumas etiologias específicas são excluídas como, o consumo de anti-inflamatórios não esteróides (AINE'S) ou a síndrome de Zollinger-Ellison (5,9,10).

A erradicação de *H. pylori* é acompanhada de uma redução drástica da recorrência de úlcera gástrica e duodenal, assim como da ocorrência de complicações, constituindo esta evidência o principal suporte da relação causal de *H. pylori* com a doença ulcerosa péptica (7,9-11,23,40).

As características topográficas do estômago e a actividade da gastrite determinam a evolução das doenças associadas a *H. pylori* (10). A gastrite crónica activa do antro aumenta o risco de ocorrência de úlcera duodenal, enquanto que a gastrite crónica do fundo, leva à atrofia da mucosa com perda da capacidade de secreção gástrica e redução do risco da úlcera duodenal, mas aumentando o risco de cancro gástrico (11,30,41,42).

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde considerou que *H. pylori* desempenha um papel causal na cadeia de eventos que conduzem ao desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico, classificando *H. pylori* como um carcinogénio humano tipo 1. Há também evidência causal entre a presença de *H. pylori* e linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT). Nestas patologias, a infecção foi detectada em 90 e 80% dos doentes, respectivamente (7,9,21,30,41,42).

1.2.5. Tratamento da infecção

O tratamento deve tanto clínica como laboratorialmente, ser simples, bem tolerado, ter uma boa relação custo/eficácia, não induzir resistência bacteriana e promover uma erradicação superior a 80%. No entanto, *H. pylori* é uma bactéria difícil de erradicar do estômago humano e, actualmente não há um agente anti microbiano que isoladamente seja eficaz no tratamento da infecção por *H. pylori* (5,10,43,44).

Assim, o tratamento desta infecção consiste na associação de vários agentes anti microbianos, coadjuvados por inibidores da bomba de prótons ou por antagonistas dos receptores H2. Estes esquemas terapêuticos denominam-se de

triplos ou quádruplos, consoante o número de fármacos com actividade anti *H. pylori* usados (43-45).

Os esquemas terapêuticos, actualmente mais usados, são os esquemas aprovados pelo “*The Maastrich Consensus Report – Current Concepts on the Management of Helicobacter pylori Infection*” promovido, em 1997, pelo *European Helicobacter pylori Study Group* (E.H.P.S.G) e, revistos em 2000 (43-45). Este consenso recomenda que o tratamento de 1ª linha (terapêutica tripla) seja administrado durante uma semana, de forma a minimizar os eventuais efeitos secundários e evitar desistências. Para os tratamentos de 2ª linha (terapêutica quádrupla), é recomendada uma duração de sete a catorze dias (43-46).

Factores que influenciam a erradicação de *Helicobacter pylori*

A grande diversidade genómica de *H. pylori*, que resulta da recombinação entre as diferentes estirpes, cria resistência primária (pré - tratamento) aos antibióticos utilizados na terapêutica (43).

Na Europa, a resistência primária aos imidazóis varia entre 7 a 49% e, dentro da mesma população, as mulheres apresentam uma taxa de resistência maior. A resistência primária à claritromicina é mais baixa, com valores que variam entre os 1 e os 12%. A resistência à amoxicilina raramente é descrita, mas já foram descritas estirpes resistentes às tetraciclinas (43,44).

Estudos realizados em Portugal, cujos resultados foram apresentados, no 9º Congresso Nacional de Medicina Interna, em 2003, revelaram para a claritromicina e eritromicina uma taxa de resistência de 12% e para o metronidazol 14,3%. Segundo a mesma fonte, um outro estudo numa população pediátrica, revelou taxas de resistência de 18,4% para o metronidazol e 41,3% para a claritromicina (AS Guerreiro, comunicação pessoal, 2003). Estes dados estão de acordo com outros estudos, que revelam um aumento progressivo da resistência primária de *H. pylori* aos antibióticos em todo o mundo, constituindo um problema de saúde pública (43,44).

A resistência secundária aos antibióticos usados no tratamento de *H. pylori*, surge frequentemente quando a terapêutica não foi eficaz e pode atingir 52% dos casos. Esta resistência resulta da presença de estirpes previamente resistentes ou da transformação de uma estirpe sensível numa resistente (43).

1.3. O consumo de bebidas alcoólicas e *Helicobacter pylori*

Contrair a infecção por *H. pylori* e erradicá-la espontaneamente, parece ser comum na infância. Na fase adulta, embora haja evidências da eliminação espontânea da infecção, esta é mais persistente (12). Alguns autores, defendem que o consumo de bebidas alcoólicas pode contribuir para a erradicação espontânea de *H. pylori*, nos adultos (47,48). Esta hipótese é apoiada por vários estudos epidemiológicos (47-49,58,59), *in vivo*, em humanos (60,61), e *in vitro* (62-65).

Alguns autores, colocaram a hipótese das condições sócio-económicas e estilo de vida dos indivíduos poderem contribuir para a aquisição e eliminação espontânea da infecção por *H. pylori* (47-49).

Alguns estudos epidemiológicos, avaliaram a relação entre o consumo de bebidas alcoólicas e a infecção por *H. pylori*, mas não conseguiram estabelecer uma associação significativa (50,51,52). Brenner *et al.* (1997), num estudo transversal, onde avaliaram o efeito do consumo de tabaco, álcool e café, em 447 indivíduos, concluíram que o consumo de bebidas alcoólicas pode ter um efeito protector contra a infecção por *H. pylori*. Este efeito foi observado para o vinho e para a cerveja, embora fosse ligeiramente mais pronunciado para o vinho (47). Estes resultados foram atribuídos à acção estimuladora, do vinho e da cerveja, da secreção gástrica de ácido e de libertação de gastrina, o que pode contribuir para alterar o meio gástrico bem como as condições de sobrevivência de *H. pylori* no estômago (53,54,55). Por outro lado, têm sido atribuídas ao vinho propriedades anti-bacterianas, o que também pode justificar os resultados obtidos (56,57). Os mesmos autores, em 1999, num outro estudo transversal mais abrangente, com 1785 participantes, reforçaram os resultados obtidos no estudo realizado em 1997, ao concluírem que o consumo moderado de bebidas alcoólicas (vinho e cerveja) pode promover a eliminação espontânea da infecção por *H. pylori*, nos adultos (48). Por ter sido considerado muito baixo, o consumo de bebidas espirituosas não foi considerado no consumo total de álcool. O autor concluiu que o consumo moderado de bebidas alcoólicas (vinho e cerveja) pode reduzir a prevalência de infecção por *H. pylori* e que, embora este efeito pareça ser dose-dependente, pois é mais evidente nos indivíduos com ingestão de álcool igual ou

superior a 20 g/dia, não é de excluir o contributo de outras substâncias presentes nestas bebidas (48).

Num estudo realizado em 2000, que abrangeu 8837 participantes, Ogihara *et al.*, verificaram que existia uma associação negativa e dose-dependente entre o consumo de bebidas alcoólicas e a infecção por *H. pylori* (58).

Brenner *et al.*, em 2001, num artigo de revisão, tendo por base os estudos anteriores do grupo, puseram em evidência a baixa prevalência da infecção por *H. pylori*, em consumidores moderados de bebidas alcoólicas. Salientaram ainda que, para os consumidores excessivos, este efeito protector parece não existir, pois nestes casos a prevalência da infecção aumentava. Esta evidência, poder-se-á dever à anulação do efeito anti-bacteriano do álcool pelos efeitos adversos sistémicos, a nível do sistema imunológico, resultantes da ingestão de quantidades elevadas de álcool (59). Estes dados foram corroborados por Murray *et al.*, em 2002, num estudo transversal com 10537 participantes. Este estudo mostrou que o consumo moderado de cerveja e vinho (aproximadamente 56 a 100g de álcool, por semana, respectivamente) pode exercer um efeito protector contra a infecção por *H. pylori*, provavelmente por facilitar a sua erradicação (49). O consumo de bebidas espirituosas e destiladas não apresentou nenhuma relação com a prevalência de infecção por *H. pylori*. Talvez por este tipo de bebidas não estimular a produção gástrica de ácido (49,53,54), levanta-se a hipótese do efeito protector atribuído ao vinho e à cerveja, não resultar do seu conteúdo em álcool mas a outros compostos (49). Por outro lado, os autores

referem que o efeito bactericida do vinho e da cerveja contra microrganismos patogénicos entéricos, também pode contribuir para estes resultados (49,56,57).

Relativamente a estudos *in vivo* em humanos, um ensaio clínico realizado em 2000, em doentes com úlcera péptica, tratados com omeprazole, amoxicilina e tinidazole (OAT) e omeprazole, amoxicilina e claritromicina (OAC), durante 4 a 6 semanas, demonstrou que, apesar dos dois esquemas terapêuticos apresentarem taxas de erradicação semelhantes (OAT - 69,6%; OAC - 78,1%), existiam diferenças significativas quando se estudou o consumo de bebidas alcoólicas nos dois grupos (60). O grupo de doentes tratados com o esquema OAC, apresentou uma taxa de erradicação de 90% para aqueles que consumiam bebidas alcoólicas e de 65,2% para aqueles que não consumiam. Para o grupo tratado com o esquema OAT, os resultados foram 85,2% para aqueles que consumiam bebidas alcoólicas, e 59,5% para aqueles que não consumiam bebidas alcoólicas (60).

Um outro ensaio clínico, realizado em 2002, em doentes com infecção activa por *H. pylori* e, sujeitos a tratamento com omeprazole, claritromicina e amoxicilina, durante uma semana, demonstrou que a terapêutica foi mais eficaz nos doentes consumidores de álcool. Nestes, o tratamento não foi eficaz em 12,2%, contra 29,9% em doentes abstémicos (61).

A actividade anti-bacteriana do vinho noutras bactérias Gram negativas (*Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*) já tinha sido testada e evidenciada em estudos *in vitro* (56,57). O efeito anti-bacteriano do vinho e da cerveja, sobre *H. pylori*, também tem sido demonstrado em estudos *in vitro* mais recentes (62-66).

Marimón *et al.* (1998), demonstraram em estirpes de *H. pylori* isoladas a partir de biópsias gástricas, que a actividade bactericida do vinho tinto é superior à do etanol em concentração e pH iguais aos do vinho (62).

Daroch *et al.* (2001), testaram a actividade anti-bacteriana de dezasseis vinhos tintos chilenos, assim como dos extractos activos de dois destes vinhos, seleccionados ao acaso, em seis estirpes de *H. pylori* obtidas a partir de biópsias gástricas. Todos os vinhos testados demonstraram actividade anti *H. pylori*. O resveratrol (um dos extractos activos isolado) mostrou também efeitos anti *H. pylori*, pelo que os autores concluíram que a actividade anti-bacteriana dos vinhos se devia à presença de resveratrol (3,4,5- estilbeno tri-hidroxilado), um antioxidante fenólico (63). Já em 2000, um outro estudo *in vitro*, evidencia a actividade anti *H. pylori* do resveratrol (64). Em 2003, a actividade anti *H. pylori* do resveratrol, *in vitro*, foi novamente demonstrada. Neste estudo foram também testados extractos de vinho tinto (extracto insolúvel e extractos concentrados, ambos provenientes de Pinot Noir), que demonstraram igualmente actividade anti *H. pylori* (65).

H. pylori está associado ao desenvolvimento de cancro gástrico. No entanto, alguns países africanos e asiáticos, com uma prevalência de infecção por *H. pylori* elevada, apresentam baixa incidência de cancro gástrico. Alguns autores tentam explicar esta variação em função da interacção entre *H. pylori* e o consumo de álcool. Esta relação tem sido objecto de vários estudos epidemiológicos, cujos resultados não têm permitido estabelecer uma associação clara e significativa (66).

1.4. Objectivos do trabalho

O presente trabalho teve como objectivos:

1 - Avaliar o efeito de diferentes concentrações de vinho tinto, vinho branco, cerveja com e sem álcool, cerveja stout e cerveja stout enriquecida em xantohumol e iso-xantohumol, sobre o crescimento *in vitro* de diferentes estirpes de *H. pylori*, pelo método de diluição em meio sólido.

2 – Avaliar com recurso à mesma metodologia, o efeito do resveratrol e do xantohumol (compostos fenólicos que entram na composição do vinho e da cerveja, respectivamente) sobre o crescimento *in vitro* de diferentes estirpes de *H. pylori*.

2. Materiais e métodos

2.1. Estirpes estudadas

No presente trabalho foram estudadas onze estirpes de *H. pylori*, isoladas de biópsias gástricas colhidas no Hospital Distrital de Faro e no Hospital do Barlavento, ambos no Algarve, pertencentes à colecção da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, da Universidade do Algarve, designadas pelos números de código: E2, E4, E8, E9, E10, E28, E120, E123, E126, E128 e E149 e a estirpe de referência 15818 da Colecção de Culturas da Universidade de Gotemburgo, Suécia (Tipo CCUG). As estirpes clínicas foram codificadas, de forma a proteger a identidade dos pacientes a partir dos quais foram obtidas.

2.2. Obtenção das estirpes

As estirpes clínicas foram obtidas a partir de biópsias recolhidas em indivíduos, escolhidos aleatoriamente, com queixas do aparelho digestivo, remetidos para endoscopia alta, e que para tal deram o seu consentimento informado.

Foram retiradas seis biópsias do estômago (três do antro e três do corpo) de cada um dos doentes. Cada biópsia de ambas as regiões gástricas, destinava-se a exame histológico, a exame molecular e a exame cultural. As biópsias que se destinavam para exame cultural foram colocadas em lactato de Ringer e conservadas a 4°C, por um período não superior a quatro horas entre a obtenção e o processamento da biópsia.

2.3. Exame cultural

2.3.1. Preparação do inóculo

As biópsias foram manuseadas assepticamente, tendo sido trituradas manualmente com uma vareta de vidro estéril, num pequeno volume de Caldo Mueller-Hinton (OXOID), numa placa de Petri estéril. O homogeneizado foi inoculado, com o auxílio de uma micropipeta, na superfície de duas placas, uma com meio selectivo e outra com meio não selectivo. O inóculo foi estendido com uma ansa estéril na superfície dos meios. Estes procedimentos foram adaptados do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (67). O meio selectivo era constituído por Columbia Agar (OXOID) suplementado com 10% de sangue desfibrinado de cavalo (OXOID) e suplemento selectivo (Dent) para *Helicobacter pylori* (SR 147; OXOID). O meio não selectivo era constituído por Columbia Agar (OXOID) suplementado com 10% de sangue desfibrinado de cavalo (OXOID) (68,69).

2.3.2. Incubação

As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, em condições de microaerofilia (Gás Generating Kits for Campilobacter; OXOID) com cerca de 6% de oxigénio, 10% de dióxido de carbono e uma humidade relativa superior a 98%, durante 3 a 4 dias (68,69).

2.3.3. Identificação

A identificação da presença de *H. pylori* foi feita através da observação da morfologia das colónias, da reacção à coloração de Gram e de testes de detecção da actividade da urease, da catalase e da oxidase (67,69).

A morfologia foi observada com auxílio de um microscópio óptico com ampliação de 1000 x. Aplicou-se a técnica de coloração de Gram modificada por Jensen e descrita por Cruickshank *et al.* (1975), tornando possível a observação de bactérias de cor rosa (Gram negativas) com morfologia encurvada e/ou arredondada.

Os testes de detecção da actividade da urease foram realizados através do emprego de caldo de ureia com Suplemento SRO 20K (OXOID). A prova foi considerada positiva quando se desenvolvia uma coloração magenta, decorridos poucos minutos após a inoculação e à temperatura ambiente, à semelhança do descrito por alguns autores (69).

O teste da oxidase (Smibert e Krieg, 1981) efectuou-se utilizando o reagente N, N, N', N' tetrametil-1,4-dihidrocloreto de parafenilenodiamina (Merck), preparado no mesmo dia a ser utilizado, com o qual se impregnou um disco de papel de filtro Whatman colocado numa caixa de Petri estéril vazia. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta fechada, retirou-se uma porção da cultura, desenvolvida em meio não selectivo e estendeu-se sobre o papel numa extensão de, aproximadamente, 5 mm. A prova foi considerada positiva quando ao fim de 10

segundos se desenvolveu uma coloração violeta na zona do papel onde se estendeu a cultura.

O teste da catalase (Smibert e Krieg, 1981) realizou-se a partir de colónias que cresceram em meio não selectivo, juntando algumas gotas de peróxido de hidrogénio a 3%. A produção imediata de bolhas de oxigénio foi indicadora de resultado positivo.

2.3.4. Obtenção de culturas puras

Após a identificação e confirmação da presença de *H. pylori* nas culturas obtidas a partir das biópsias gástricas, procedeu-se a uma nova inoculação destas culturas, em meio não selectivo. Após 2 dias de incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$, em condições de microaerofilia, procedeu-se à identificação das culturas obtidas. A identificação foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no ponto 2.3.3.

2.3.5. Conservação dos isolados

Foram preparadas suspensões bacterianas, obtidas de subculturas das estirpes isoladas, em Caldo Triptona de Soja (TSB) com 20% de glicerol e posteriormente conservadas por congelação a -80°C .

As suspensões de conservação foram preparadas a partir de culturas frescas (dois dias) em meio não selectivo. Com uma zaragatoa estéril embebida em

Caldo Mueller-Hinton (OXOID), retiraram-se as colónias crescidas na superfície da placa, sendo depois colocadas em tubos Eppendorf estéreis que continham 200 µl de TSB com 20 % de glicerol. Este procedimento foi adaptado a partir dos métodos descritos pelo NCCLS e por Glupczynski (67,69).

2.4. Caracterização molecular das estirpes estudadas

As estirpes de *H. pylori* utilizadas no presente trabalho, encontram-se caracterizadas, de acordo com os marcadores de virulência *cag* e *vac*, no Quadro 2.

Quadro 2 – Caracterização das estirpes de *H. pylori* utilizadas

Estirpe	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>
E2	+	s1/ m2
E4	+	s1/ m1
E8	+	s1/ m2
E9	-	s2/ m2
E10	+	s2/ m2
E28	+	s1/ m1
E120	+	s1/ m1
E123	-	s2/ m2
E126	+	s1/ m2
E128	+	s1/ m1
E149	+	s1/ m1
CCUG 15818	+	s1/ m1

A caracterização genotípica dos marcadores de virulência foi obtida através do método de PCR (Polymerase Chain Reaction), realizado na Unidade de

Helicobacter/Campylobacter do Centro de Bacteriologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

2.5. Ensaio

2.5.1. Bebidas estudadas

Vinho tinto 12° (v/v) (Região do Algarve – Castas: negra mole, castelão e trincadeira)

Vinho branco 12° (v/v) (Região do Algarve – Casta sória)

Cerveja com álcool branca 5° (v/v)

Cerveja sem álcool branca

Cerveja com álcool preta 5° (v/v)

Cerveja com álcool preta enriquecida com xantohumul e iso-xantohumul 5,5° (v/v)
(Brewing Research International (BRI), Nutfield, Reino Unido)

2.5.2. Outras substâncias estudadas

Resveratrol (R50 10; SIGMA)

Xantohumul (Hopsteiner, Mainburg, Alemanha)

2.6. Preparação do inóculo

Para o inóculo preparou-se uma suspensão com cerca de 10^8 células por ml (equivalente a #2 pela escala de McFarland) em soluto de Ringer estéril, a partir de culturas frescas (2 dias) que cresceram em meio não selectivo. A avaliação da concentração das células bacterianas foi feita por espectrofotometria (Spectronic 21; Bausch & Lomb) a um comprimento de onda de 625 nm.

2.6.1. Aplicação do inóculo e condições de crescimento

Cada ensaio consistiu na aplicação de três inóculos de 10 μ l, à superfície dos meios de cultura, com diferentes concentrações das bebidas ou compostos a testar e do meio de controlo (meio não selectivo). As placas foram incubadas em condições de microaerofilia.

Os resultados foram avaliados pela presença ou ausência de crescimento visual de colónias à superfície dos diferentes meios (64,65,70-72) e teste de detecção da actividade da urease, conforme descrito na secção 2.3.3. Posteriormente, foram realizados os restantes testes de identificação descritos na mesma secção.

Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

2.7. Ensaio com vinho

O meio de cultura (Columbia Agar; OXOID) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante (39g de meio para 1000 ml de água destilada) e esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a esterilização o meio foi arrefecido até aproximadamente, 45°C e, em câmara de fluxo laminar, adicionaram-se 10% de sangue desfibrinado de cavalo (OXOID) e o vinho, nas diferentes concentrações (22,5%, 45% e 67,5%), até se obter o volume final do meio. O vinho foi previamente esterilizado por filtração sob vácuo usando membranas de ésteres de celulose (Pall; Gelman Laboratory), com 47 mm de diâmetro e 0,2 µm de porosidade. De seguida, os meios foram distribuídos em placas de Petri que foram posteriormente armazenadas a 4°C até à sua utilização (48 a 72 horas). A composição dos meios encontra-se descrita no Quadro 3.

Quadro 3 – Composição dos meios de cultura com diferentes concentrações de vinho

	MEIO A	MEIO B	MEIO C
Columbia Agar	39 g/litro	39 g/litro	39 g/litro
Sangue	10%	10%	10%
Água destilada	67,5%	45%	22,5%
Vinho (a)	22,5%	45%	67,5%

(a) Usaram-se as mesmas concentrações para o vinho tinto e para o vinho branco.

2.8. Ensaio com cerveja

O meio de cultura (Columbia Agar; OXOID) foi preparado com água destilada e cerveja (previamente desgaseificada), de modo a obterem-se as diferentes

concentrações (22,5%; 45%; 67,5% e 90%) de cerveja, respeitando as instruções do fabricante (39 g de meio para 1000 ml de volume final). Após a esterilização em autoclave (121°C durante 15 minutos) e arrefecimento dos meios (45°C), em câmara de fluxo laminar, adicionaram-se 10% de sangue desfibrinado de cavalo, distribuindo-se de seguida por placas de Petri armazenadas a 4°C, por um período de 48 a 72 horas. A composição dos diferentes meios encontra-se descrita no Quadro 4.

Quadro 4 – Composição dos meios de cultura com diferentes concentrações de cerveja

	MEIO A	MEIO B	MEIO C	MEIO D
Columbia Agar	39 g/litro	39 g/litro	39 g/litro	39 g/litro
Sangue	10%	10%	10%	10%
Água destilada	67,5%	45%	22,5%	0%
Cerveja (a)	22,5%	45%	67,5%	90%

(a) Usaram-se as mesmas concentrações para as diferentes cervejas.

2.9. Ensaio com resveratrol

Foram preparados meios de cultura com resveratrol, de modo a obterem-se as concentrações finais de 12,5 µg/ml; 75 µg/ml e 100 µg/ml. Após a preparação (39 g de meio para 1000 ml de água destilada), esterilização em autoclave (121°C por 15 minutos) e arrefecimento (45 °C) do meio (Columbia Agar; OXOID) em câmara de fluxo laminar, foi-lhe adicionado sangue desfibrinado de cavalo (OXOID) de forma a obter-se, uma concentração de 10%, no meio de cultura. Foram ainda adicionados diferentes volumes de uma solução *stock* de resveratrol puro (10 mg/ml de solução 1:1 de DMSO e água destilada estéril), de modo a obter as

concentrações acima referidas (64,65,73). Os meios foram distribuídos por placas de Petri que foram armazenadas a 4°C, por um período de 48 a 72 horas.

2.10. Ensaio com xantohumol

Na câmara de fluxo laminar, foi adicionado ao meio de cultura (Columbia Agar; OXOID), preparado de acordo com os procedimentos descritos atrás, sangue desfibrinado de cavalo (OXOID) de forma a obter-se, uma concentração de 10%, no meio de cultura. Foram ainda adicionados diferentes volumes de uma solução *stock* de xantohumol puro (25 mg de xantohumol puro/ml etanol absoluto), de modo a obter concentrações finais de xantohumol no meio de 12,5 µg/ml; 75 µg/ml e 100 µg/ml. Após a distribuição dos meios por placas de Petri, estas foram armazenadas a 4°C, por um período de 48 a 72 horas.

2.11. Controlo do efeito dos solventes no crescimento de *Helicobacter pylori*

Em simultâneo com os ensaios realizados com o resveratrol e com o xantohumol, avaliou-se o efeito dos solventes (DMSO e etanol) utilizados nas soluções *stock*, no crescimento de *H. pylori*, de forma a garantir que a viabilidade da bactéria não era afectada pelos mesmos. Foram utilizadas como controlos de crescimento, placas de Petri contendo meio não selectivo e as respectivas concentrações de DMSO e etanol (64,65,71).

2.12. Controlo do efeito da graduação alcoólica das bebidas testadas no crescimento de *Helicobacter pylori*

Foram realizados ensaios onde se avaliou o efeito do conteúdo em etanol das bebidas testadas sobre a viabilidade da bactéria. Foram preparados meios não selectivos, seguindo os procedimentos referidos atrás, contendo etanol a 5° (v/v) e 12° (v/v), graduação alcoólica da cerveja e do vinho, respectivamente, de forma a obter meios com concentrações finais iguais às testadas para a cerveja e para o vinho (22,5%, 45%, 67, % e 90%).

2.13. Análise estatística dos resultados

A descrição da relação entre a probabilidade de ocorrência de crescimento de *H. pylori* (\hat{p}) e a concentração das bebidas ou compostos testados realizou-se através de regressão logística no programa SPSS Inc. 1989-2002 (versão 11), com um nível de significância de 5%.

Utilizou-se a forma linear do modelo logístico: $\ln(\hat{y}) = a + b_1x_1 + b_2x_2$, em que \hat{y} é a razão das probabilidades ($\hat{y} = \hat{p} / 1 - \hat{p}$), b_j são os coeficientes de regressão (coeficientes B, no SPSS) e os x_j são as variáveis independentes, contínuas ou categóricas. Os coeficientes b_j “medem” a contribuição de determinada variável independente para a razão de probabilidades. O significado de $\exp(b_j)$ é mais explícito: por exemplo, se $b_1 = 2.30$, então $\exp(2.30) = 10$, isto significa que para um incremento inibitório de x_1 , a probabilidade de ocorrência de crescimento aumenta 10 vezes. No caso das variáveis categóricas (com k categorias), é

necessário criar variáveis indicadoras (*dummy*) que correspondem a k-1 categorias dessas variáveis, pelo que uma das categorias foi seleccionada como nível de referência. Os respectivos coeficientes b reportam-se ao nível de referência. No caso das bebidas, o nível de referência seleccionado foi a cerveja enriquecida com xantohumol e iso-xantohumol, por ser aquela cuja composição exacta em compostos fenólicos era conhecida (3,4 mg/l de xantohumol, 8,6 mg/l de iso-xantohumol e 5,5% v/v de etanol).

A significância dos modelos de regressão e dos coeficientes foi testada utilizando o teste da razão de verosimilhanças (X^2 modelo) e a estatística de Wald (X^2 -Wald), respectivamente. O ajuste dos modelos de regressão aos dados empíricos foi avaliado pelo pseudo- R^2 de Nagelkerke e pela percentagem de classificações correctas.

Com o objectivo de facilitar a representação gráfica dos resultados converteram-se as razões de probabilidades (\hat{y}) em probabilidades (p) através de $p = \hat{y}/(1 + \hat{y})$, em que p é a probabilidade de ocorrência de crescimento de *H. pylori*.

3. Resultados

A análise estatística dos resultados teve por base, os dados que se encontram descritos no anexo 1.

3.1. Efeito das bebidas testadas no crescimento de *Helicobacter pylori*

O modelo logístico descreve cabalmente a relação entre a probabilidade de ocorrência de crescimento e a concentração das bebidas testadas ($X^2 = 375,8$; $p < 10^{-4}$ pseudo- $R^2 = 0,864$). A probabilidade de ocorrência de crescimento diminui cerca de 21 % [$\exp(10(-0,153)) = 0,2165 \approx 21,65\%$] por cada 10 % de aumento na concentração (Quadro 5). Verificou-se, ainda, que o tipo de bebida (variável tratamento) influencia a probabilidade de ocorrência de crescimento bacteriano (X^2 -Wald = 49,51, $p < 10^{-4}$). Não se distinguiram os efeitos inibitórios das cervejas com álcool e preta relativamente ao nível de referência, a cerveja preta enriquecida (X^2 -Wald = 0,659 e X^2 -Wald = 0,000, com $p = 0,417$ e $p = 1,000$, respectivamente) (Quadro 5). Pelo contrário, verificou-se que a cerveja sem álcool (X^2 -Wald = 18,38 e $p < 10^{-4}$) e os vinhos tinto e branco têm efeitos significativamente diferentes (X^2 -Wald = 1,022 e X^2 -Wald = 0,942, com $p < 10^{-4}$ para ambos) do tratamento de referência (Quadro 5). No caso da cerveja sem álcool, o efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano é menor do que o do tratamento de referência ($B > 0$), enquanto os vinhos tinto e branco têm um efeito inibitório significativamente maior do que a cerveja preta enriquecida ($B < 0$). Comparando os intervalos de confiança dos coeficientes, não é possível distinguir

os vinhos; com efeito verifica-se sobreposição dos intervalos de confiança (Quadro 5).

Quadro 5 – Análise da variável categórica “Tipo de tratamento” para as bebidas

	Coef. (B)	Erro-padrão	X ² Wald	p	Exp(B)	I. C. 95 % para B	
						Inferior	Superior
CONCENTRAÇÃO	- 0,153	0,020	59,581	0,000	0,859	-	-
TRATAMENTO	-	-	49,511	0,000	-	-	-
VINHO TINTO	- 5,584	1,022	29,875	0,000	0,004	-7,585801	-3,581345
VINHO BRANCO	- 4,120	0,942	19,136	0,000	0,016	-5,965817	-2,273929
CERV.C/ ÁLCOOL	0,667	0,822	0,659	0,417	1,949	-0,944337	2,278931
CERV. S/ ÁLCOOL	4,144	0,966	18,384	0,000	63,044	2,249571	6,0381
CERV. PRETA	0,000	0,792	0,000	1,000	1,000	-1,553157	1,553157
CONSTANTE	8,510	1,203	50,037	0,000	4962,567	-	-

Legenda: I.C. – Intervalo de confiança

Na Figura 1, ilustram-se os efeitos dos tratamentos sobre a probabilidade de ocorrência de crescimento bacteriano. Quanto maior for o efeito inibitório de um tratamento, mais próxima da origem no gráfico, se encontrará a respectiva curva logística. Os vinhos tinto e branco, foram os que apresentaram maior actividade inibitória. Relativamente às cervejas, a cerveja preta e a cerveja preta enriquecida em xantohumol e isoxantohumol foram as que apresentaram maior inibição, o que é demonstrado pela coincidência das curvas associadas a estas duas bebidas; a cerveja branca com álcool não apresenta diferenças significativas quando comparada com as duas primeiras, sendo que a cerveja sem álcool foi a bebida que apresentou menor efeito inibitório.

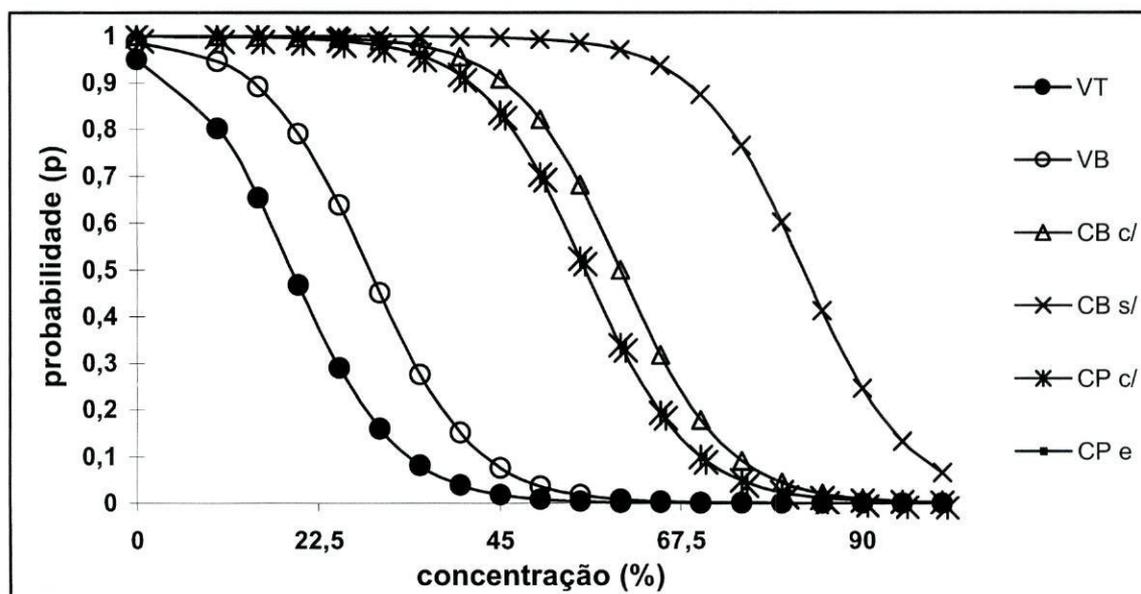


Figura 1 – Curvas logísticas da probabilidade de crescimento de *Helicobacter pylori* em função das concentrações das bebidas. Vinho tinto (VT), vinho branco (VB), cerveja branca com álcool (CB c/), cerveja branca sem álcool (CB s/), cerveja preta com álcool (CP c/) e cerveja preta enriquecida com xantohumulol e iso-xantohumulol (CP e).

3.2. Efeito do resveratrol e do xantohumulol no crescimento de *Helicobacter pylori*

O modelo logístico é adequado ($X^2 = 78,41$, $p < 10^{-4}$; pseudo- $R^2 = 0,748$).

No Quadro 6, resumem-se os resultados da análise de regressão logística dos efeitos inibitórios dos compostos fenólicos sobre a probabilidade de ocorrência do crescimento de *H. pylori*. Embora estes compostos tenham demonstrado efeito inibitório ($B < 0$), os dois tipos de tratamento não apresentaram, no entanto, diferenças significativas entre si (X^2 -Wald = 3,788 com $p = 0,052$) (Quadro 6).

Quadro 6 – Análise da variável categórica “Tipo de tratamento” para os compostos fenólicos

	Coef. (B)	Erro-padrão	X ² Wald	p	Exp(B)
CONCENTRAÇÃO	-0,066	0,012	29,725	0,000	0,936
RESVERATROL	-1,615	0,830	3,788	0,052	0,199
CONSTANTE	4,620	1,041	19,705	0,000	101,504

Na Figura 2 é possível observar que os resultados obtidos com o resveratrol e xantohumol também variaram em função da sua concentração nos meios de cultura. Embora os dois tipos de tratamento não tenham apresentado diferenças significativas entre si, o xantohumol demonstrou um efeito inibitório mais pronunciado para uma concentração ligeiramente inferior à observada para o resveratrol.

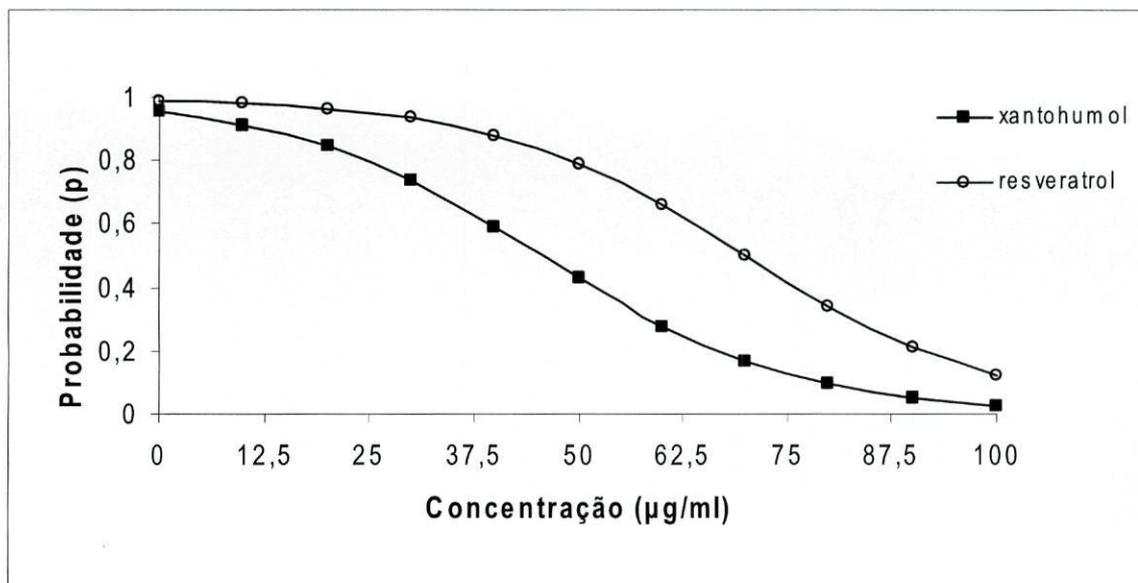


Figura 2 – Curvas logísticas da probabilidade de crescimento de *Helicobacter pylori* em função das concentrações de xantohumol e resveratrol.

3.3. Virulência das estirpes e efeitos inibitórios no crescimento

As estirpes estudadas foram agrupadas, de acordo com as suas características de virulência (Quadro 7).

Quadro 7 – Categorias da variável “Grupo”

Estirpes estudadas	Grupos	Virulência
E2, E8, E126, E28	1	<i>cag</i> + / <i>vac</i> (s1/m1)
E4, E120, E128, E149, E15818	2	<i>cag</i> + / <i>vac</i> (s1/m1)
E9, E123	3	<i>cag</i> - / <i>vac</i> (s2/m2)
E10	4	<i>cag</i> + / <i>vac</i> (s2/m2)

Todos os grupos foram analisados tendo como comparação o grupo 4, por este possuir o ilhéu de patogenicidade *cag* e pertencer ao tipo s2/m2 ao qual está associada uma baixa actividade citotóxica.

Verificou-se que a inibição do crescimento de *H. pylori* em função quer das bebidas estudadas (X^2 -Wald = 5,52 com $p = 0,137$), quer em função do xantohumol e do resveratrol (X^2 -Wald = 2,10 com $p = 0,551$) (Quadros 8 e 9, respectivamente) não apresentou diferenças significativas para os diferentes grupos de virulência, o que demonstra que os resultados não variaram em função do tipo de estirpe. A representação gráfica destes resultados pode ser observada nas Figuras 3 e 4.

Quadro 8 – Análise da variável categórica “Grupo” para as bebidas

	Coef. (B)	Erro-padrão	X ² -Wald	p	Exp(B)
GRUPO			5,526	0,137	
GRUPO (1)	-0,940	0,518	3,289	0,070	0,391
GRUPO (2)	-0,375	0,470	0,635	0,426	0,688
GRUPO (3)	-1,099	0,569	3,739	0,053	0,333
CONCENTRAÇÃO	-0,074	0,007	103,696	0,000	0,929
CONSTANTE	4,322	0,577	56,157	0,000	75,361

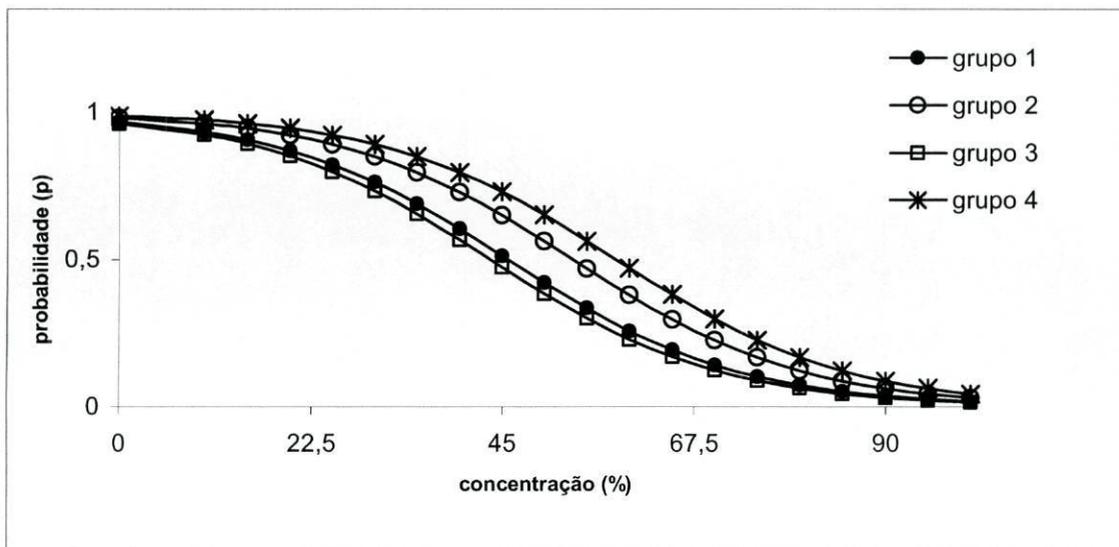


Figura 3 – Curvas logísticas para a probabilidade de crescimento de *Helicobacter pylori* em função dos diferentes grupos de virulência para as bebidas.

Quadro 9 – Análise da variável categórica “Grupo” para os compostos fenólicos

	Coef. (B)	Erro-padrão	X ² -Wald	p	Exp(B)
GRUPO			2,103	0,551	
GRUPO(1)	-0,951	1,096	0,752	0,386	0,386
GRUPO(2)	-1,168	1,013	1,328	0,249	0,311
GRUPO(3)	0,000	1,128	0,000	1,000	1,000
CONCENTRAÇÃO	-0,063	0,011	32,091	0,000	0,939
CONSTANTE	4,353	1,155	14,195	0,000	77,704

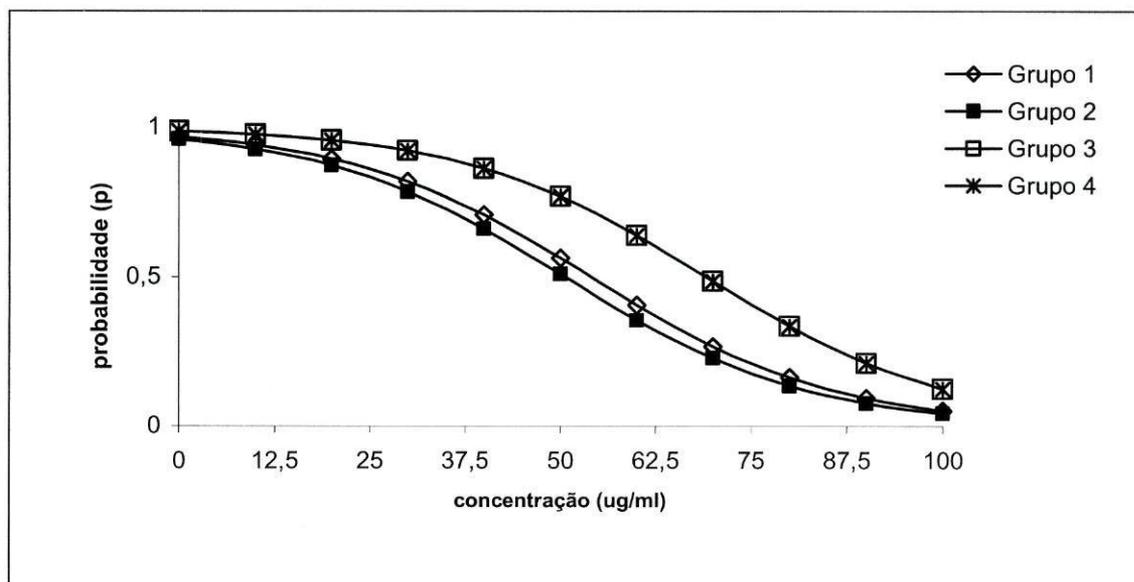


Figura 4 – Curvas logísticas da probabilidade de crescimento de *Helicobacter pylori* em função dos diferentes grupos de virulência para os compostos fenólicos.

3.4. Efeito dos solventes no crescimento de *Helicobacter pylori*

O crescimento da bactéria não foi afectado pelos solventes (DMSO para o resveratrol e etanol para o xantohumol) das soluções *stock* dos compostos fenólicos.

3.5. Efeito da graduação alcoólica das bebidas no crescimento de *Helicobacter pylori*

Nenhuma das concentrações de etanol testadas (ver Secção 2.12) inibiu o crescimento de *H. pylori*.



4. Discussão e conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o vinho tinto e o vinho branco inibem significativamente o crescimento *in vitro* de *H. pylori*. Outros autores já tinham demonstrado o efeito inibitório no crescimento de outras bactérias Gram negativas dos vinhos tinto e branco (56,57). A actividade anti *H. pylori* também já havia sido descrita para o vinho tinto noutros trabalhos (62,63). As metodologias seguidas por esses autores foram diferentes da apresentada no presente trabalho; num dos trabalhos foi aplicado o método de diluição em meio líquido (62) e noutro foi aplicado o método de difusão em agar (63). Com o presente trabalho, foi possível observar que o vinho tinto manteve a sua actividade inibitória sobre *H. pylori*, e que o vinho branco possui igualmente actividade anti *H. pylori*, para concentrações semelhantes às do vinho tinto.

A hipótese da cerveja branca com álcool inibir o crescimento *in vitro* de outras bactérias Gram negativas, já tinha sido testada num trabalho anterior (57). O presente trabalho alargou esta hipótese a outros tipos de cerveja (branca sem álcool e preta com álcool) disponíveis no mercado. Todas as cervejas testadas demonstraram actividade anti *H. pylori*. No entanto, só a cerveja branca com álcool e a cerveja preta com álcool inibiram significativamente o crescimento de todas as estirpes de *H. pylori* estudadas. A cerveja branca sem álcool só inibiu o crescimento de 83% das estirpes estudadas para a concentração máxima (90%). Foi ainda possível testar um tipo de cerveja preta enriquecida com xantohumol e iso-xantohumol, cujo efeito inibitório sobre *H. pylori* foi semelhante ao observado para a cerveja preta.

Nas diferentes estirpes de *H. pylori* estudadas não se observaram efeitos inibitórios diferentes entre si, quer para as bebidas quer para os compostos fenólicos. Os marcadores de virulência parecem determinar um grau variável de interacção com o hospedeiro, assim como um maior ou menor grau de agressão sobre as células epiteliais gástricas (27,29,35,39,41). Assim, a presença do ilhéu de patogenicidade *cag A* parece estar associada a alterações morfológicas das células epiteliais gástricas, influenciando as funções celulares destas (31,34). Para além disso, parece determinar um maior grau de interacção com o hospedeiro, pois aparentemente existe uma relação entre a fixação de *H. pylori* às células gástricas e a inflamação da mucosa. Ambos os eventos parecem estar associados à presença do referido ilhéu de patogenicidade e a um risco aumentado de desenvolvimento de cancro gástrico (35,39). A presença de estirpes *vacA s1/m1*, também está associada a uma série de alterações ao nível da mucosa gástrica, como a indução de vacuolização das células epiteliais gástricas, o aumento da permeabilidade paracelular do epitélio gástrico e a indução de apoptose do epitélio gástrico que parecem estar implicadas no desenvolvimento de cancro gástrico (24,27). Pela natureza do presente trabalho estes aspectos não podiam ser avaliados, o que pode justificar a ausência de relação entre o efeito inibitório observado e as diferentes estirpes de *H. pylori*.

O efeito inibitório do resveratrol e do xantohumol (compostos polifenólicos que entram na composição do vinho e da cerveja, respectivamente) no crescimento *in vitro* de *H. pylori*, também foi testado. Verificou-se que ambos inibiram o crescimento de todas as estirpes de *H. pylori* para uma concentração de 100 µg/ml. Na concentração de 75 µg/ml, o xantohumol revelou uma actividade

inibitória ligeiramente maior, ao inibir o crescimento de 75% das estirpes estudadas, enquanto que o resveratrol só inibiu o crescimento de 50% das estirpes.

A actividade anti *H. pylori* do resveratrol já tinha sido testada em trabalhos anteriores (63-65). No entanto, os resultados descritos referem uma inibição do crescimento de 90% das estirpes testadas para concentrações de 12,5, 25 µg/ml (27,28) e 80 µg/ml (63). Este último valor de concentração tem uma ordem de grandeza e um efeito inibitório idênticos aos obtidos no presente trabalho (75 µg/ml e 100 µg/ml inibiram o crescimento de 50% e 100% das estirpes testadas, respectivamente). Estes resultados podem estar relacionados com a solubilidade do resveratrol no meio de cultura, factor que pode interferir com a sua eficácia (73).

O resveratrol é um composto polifenólico presente no vinho que pertence à família dos estilbenos. Este composto encontra-se nas diferentes partes da videira, em particular na película das uvas, que o produz, em resposta a infecções por fungos e a situações de stresse ambiental (63,74-78). O conteúdo em resveratrol dos vinhos depende do seu processo de fabrico, nomeadamente da presença das partes sólidas do cacho (restos de polpa, películas, grainhas e engaço) durante a fermentação do mosto (74-78). Outros factores que influenciam igualmente o conteúdo em resveratrol do vinho são o tipo de uva, as condições climatéricas e algumas práticas pré-fermentativas durante o processo de fabrico do vinho (75,78). No caso dos vinhos brancos, as películas das uvas são retiradas antes da fermentação do mosto, o que determina concentrações de resveratrol mais baixas

nestes vinhos comparativamente com os vinhos tintos, cuja concentração em resveratrol varia entre 0,02 a 13,4 mg/l (75).

Os resultados obtidos merecem algumas considerações, nomeadamente no que se refere aos resultados do vinho tinto e do vinho branco. Ambos demonstraram efeito inibitório marcado e, pese embora, o efeito dose-dependente observado para o resveratrol, a concentração inibitória deste foi muito superior ao conteúdo em resveratrol descrito para os vinhos, o que pode significar que o efeito observado para os vinhos não se deve exclusivamente à sua presença (63). Efeitos sinérgicos com o conteúdo em etanol dos vinhos têm sido descritos para explicar algumas das propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias a estes atribuídas (79,80). Esses efeitos poderão explicar os resultados obtidos no presente trabalho, pois os ensaios realizados com etanol, na concentração presente no vinho, não demonstraram efeito inibitório sobre o crescimento de *H. pylori*, à semelhança do já descrito anteriormente (62). O efeito inibitório do etanol sobre o crescimento de outras bactérias Gram negativas, nas concentrações presentes no vinho, foi testado noutros trabalhos com resultados idênticos aos já descritos (56,57). Contudo, o mecanismo de acção que pode explicar este efeito não ainda está esclarecido, tendo-se levantado a hipótese de que o etanol poderá aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade do resveratrol (79,80).

O xantohumol é um prenilflavonóide do tipo chalcona, presente nas inflorescências femininas da planta do lúpulo (*Humulus lupulus*). O lúpulo é utilizado na indústria cervejeira para conferir sabor e amargor à cerveja, que é a principal fonte alimentar de xantohumol (81,82). O conteúdo em xantohumol das

cervejas depende dos diferentes processos de fabrico, cuja concentração pode variar, segundo dados fornecidos pela indústria cervejeira, entre 0,01 a 0,20 mg/l.

Vários estudos têm demonstrado que o xantohumol possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-cancerígenas (81-84). No entanto, tanto quanto foi possível apurar, as propriedades de inibição do crescimento de microrganismos do xantohumol não têm sido objecto de análise aprofundada, com excepção de um trabalho realizado em 1986, que lhe atribui propriedades anti-fúngicas (84). No presente trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que o xantohumol inibe o crescimento de *H. pylori*, uma bactéria patogénica para o Homem. Os resultados obtidos neste trabalho com o xantohumol, conduzem às mesmas considerações descritas para o resveratrol pois, embora a actividade anti *H. pylori* seja marcada, as concentrações que a determinam são superiores às presentes nas cervejas, bebidas igualmente testadas neste trabalho e em relação às quais foi igualmente possível demonstrar a inibição do crescimento de *H. pylori*, principalmente para as cervejas com álcool. Uma vez que o etanol, nas mesmas concentrações do vinho e da cerveja, não demonstrou actividade inibitória, levanta-se novamente a hipótese dos resultados observados dependerem de um efeito sinérgico entre o conteúdo em xantohumol das cervejas e o seu teor alcoólico. Não podemos igualmente excluir que existam outros compostos inibidores do crescimento presentes nestas bebidas e que expliquem parte do seu efeito.

Estes resultados estão de acordo com vários estudos epidemiológicos que têm atribuído ao vinho e à cerveja um papel protector em relação à infecção por *H.*

pylori (47-49,58,59), embora os mecanismos de acção que determinam esse efeito permaneçam desconhecidos, pois não se pode estabelecer uma associação directa entre o que acontece *in vitro* e *in vivo*.

Outros autores tentam explicar a incidência de cancro gástrico em função da interacção entre *H. pylori* e o consumo de álcool. Esta relação tem sido objecto de vários estudos epidemiológicos, cujos resultados não têm permitido estabelecer uma associação significativa (66).

A carcinogénese gástrica é um processo complexo que se desenvolve ao longo de várias etapas, em que o cancro gástrico corresponde à etapa final de uma sequência de alterações patológicas que determinam modificações no epitélio gástrico (metaplasia e displasia) (66,85,86). Normalmente este processo inicia-se com uma gastrite crónica que evolui para gastrite atrófica, metaplasia, displasia e, eventualmente, carcinoma gástrico (85-88). Estudos prolongados de “*follow-up*” em pacientes em diferentes etapas do processo pré-cancerígeno, têm mostrado que a progressão destas etapas é lenta e que algumas lesões podem regredir para etapas menos avançadas (85).

Este processo resulta da interacção de três tipos de factores: o agente (*Helicobacter pylori*), o hospedeiro e a exposição a factores ambientais. Aceita-se actualmente que o efeito carcinogénico da infecção por *H. pylori* não é o mesmo para diferentes níveis de exposição a factores ambientais. Embora a infecção por *H. pylori* tenha um papel amplamente reconhecido como a principal causa para o desenvolvimento de cancro gástrico, esta associação pode ser modificada pela interacção entre *H. pylori* e factores ambientais (66,85,86,88,89).

Uma dieta pobre em antioxidantes, o consumo de alimentos fumados e/ou de alimentos conservados pelo sal, o tabaco e o consumo de álcool têm sido associados a diferentes etapas da carcinogénese gástrica (66,85,86,90,91).

A fruta e os vegetais são fontes importantes de antioxidantes, substâncias com capacidades biológicas reconhecidas na modulação do processo carcinogénico, através da inibição da proliferação celular, da estimulação da reparação do DNA, da modulação da diferenciação celular e da resposta imune e da inibição da invasão celular (66). Sabe-se que a infecção por *H. pylori* está associada a uma diminuição dos níveis de ácido ascórbico no suco gástrico e à deterioração do efeito protector dos carotenóides no estômago (66,89). Vários estudos epidemiológicos têm atribuído um efeito protector ao consumo de fruta e de vegetais verdes crus (90-94), possivelmente pelo papel neutralizador dos antioxidantes sobre as espécies reactivas de oxigénio que resultam do “stresse oxidativo”, cujo mecanismo de acção parece ser determinante na cadeia de eventos que podem conduzir à formação de células neoplásicas (85). O tabaco parece aumentar o risco de desenvolvimento de cancro gástrico associado à infecção por *H. pylori* (66,90,92,94), assim como o consumo de alimentos fumados ou conservados pelo sal (66,90,95). Relativamente ao álcool não se conseguiu, até à data, estabelecer uma relação de causalidade entre o seu consumo e o desenvolvimento de cancro gástrico. Parece haver uma relação com o cancro do cárdia, apoiada por vários estudos epidemiológicos, que, no entanto, não têm sido conclusivos no que se refere ao cancro gástrico distal (55,66,90). De salientar que o cancro do cárdia parece também não estar associado à infecção por *H. pylori* (66,86-89,96).

O tipo de bebida alcoólica consumida e as quantidades ingeridas poderão explicar, em parte, os resultados controversos obtidos em diferentes estudos epidemiológicos (4,55). Com efeito, vários estudos epidemiológicos atribuem um papel protector ao vinho e à cerveja relativamente à infecção por *H. pylori*, principal factor causal da carcinogénese gástrica (47-49,58,59), efeito esse, que pelos resultados obtidos neste trabalho, se poderá, em parte, atribuir à sua acção antibacteriana (4). Outros estudos epidemiológicos que avaliaram a influência de factores ambientais favorecedores do desenvolvimento de cancro gástrico não têm sido conclusivos. Se, por um lado, alguns estudos não encontram uma associação significativa entre o consumo de álcool e o desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas (92,93,97), por outro lado, encontramos estudos cujas conclusões apontam para um risco aumentado de desenvolvimento de cancro gástrico associado ao consumo de álcool. Quando se avalia o tipo de bebida consumido, esta associação só é significativa para as bebidas destiladas com elevada graduação alcoólica, nomeadamente a vodka (94,98,99). Esta associação não foi observada para o vinho (99). Um outro estudo epidemiológico atribui ao vinho um papel protector contra o desenvolvimento de cancro gástrico (100). Este efeito foi observado não só para o adenocarcinoma gástrico mas também para os adenocarcinomas esofágico e do cárdia (100). Com estes trabalhos não fica ainda claramente demonstrado o efeito protector do vinho relativamente ao cancro gástrico mas, por outro lado, também não há nenhum estudo que demonstre uma relação directa entre o consumo de vinho e o desenvolvimento de cancro gástrico (4,92,93,99,100). Pelo contrário, a cerveja aparece em alguns estudos associada ao risco de desenvolvimento de cancro

gástrico (93,101), O consumo total de álcool só apresenta uma associação significativa quando inclui o consumo de bebidas destiladas (99,101).

O efeito do etanol e de diferentes bebidas alcoólicas sobre as mucosas gástrica e duodenal, também tem sido objecto de estudo. As gastrites superficiais e crónicas atróficas são comuns nos alcoólicos. No entanto, vários estudos têm concluído que estas lesões se devem sobretudo à presença de infecção por *H. pylori*, não constituindo uma consequência directa do consumo excessivo de álcool e da sua acção agressiva sobre a mucosa, uma vez que estas lesões, na maioria dos casos, desapareciam após a erradicação da infecção, independentemente dos indivíduos abandonarem ou não o consumo de bebidas alcoólicas (55). O tipo de bebida e a graduação alcoólica parecem ter algum significado, na medida em que foi possível observar que diferentes tipos de bebidas (vinho, cerveja e whisky) e soluções alcoólicas com diferentes graduações (4%, 10% e 40%) estavam associadas a diferentes alterações da mucosa gástrica. As alterações associadas às soluções alcoólicas eram mais extensas, quando comparadas, com as associadas às das bebidas de igual graduação e 24 horas após a ingestão destas bebidas e soluções, ainda era possível observar as lesões provocadas pelo whisky e pelas soluções alcoólicas com graduação igual ou superior a 10%. Tal observação levou os autores deste estudo, a levantar a hipótese de que as bebidas alcoólicas continham substâncias que tinham uma acção protectora sobre a mucosa gástrica e que, destas, o vinho e a cerveja seriam aquelas que teriam maior quantidade destas substâncias (55).

O vinho, nomeadamente o vinho tinto, contém uma variedade de compostos polifenólicos que incluem flavonóides (resveratrol, quercetina, miricetina), flavanóides (catequinas e epigalocatequinas), taninos e antocianinas (102, 103), aos quais se atribuem propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias e anti-cancerígenas (55,102-105). Variações na concentração destes constituintes, a sua biodisponibilidade e a forma como a interacção com outros constituintes do vinho e da dieta a podem afectar, determinam efeitos diferentes (102-106).

Foi demonstrado, num estudo que avaliou o efeito dos compostos polifenólicos, presentes no vinho tinto e no vinho branco, sobre o crescimento de linhas celulares derivadas de células de cancro do cólon e de cancro gástrico, que quer as antocianinas quer os flavonóides inibiam o crescimento celular. No entanto, as antocianinas demonstraram uma taxa de inibição mais elevada. As antocianinas correspondiam à fracção insolúvel (em éter dietílico) de um extracto de vinho tinto em metanol e os flavonóides correspondiam à fracção solúvel dos extractos de vinho tinto e de vinho branco em metanol. O vinho branco não continha antocianinas (104). Os resultados deste estudo demonstram que o conteúdo em polifenóis dos vinhos poderá explicar, em parte, os resultados algo contraditórios dos estudos epidemiológicos, que oscilam entre a ausência de associação entre o consumo de vinho e o desenvolvimento de cancro gástrico e o seu efeito protector.

O efeito anti-oxidante destas bebidas também tem sido objecto de estudo, nomeadamente sobre a acção do peróxido de hidrogénio e das radiações γ , ambos indutores de danos a nível do DNA, *in vitro*. Estudos *in vitro* demonstraram

que, quer o vinho tinto quer o vinho branco, tinham um efeito protector, efeito esse que não pode ser apenas explicado pelo conteúdo em polifenóis destas bebidas, pois o vinho branco contém menor quantidade destes compostos. Desta forma, os autores avançaram com a hipótese de que o etanol, o glicerol e o ascorbato em conjunto com compostos polifenólicos presentes nos vinhos tinto e branco poderiam ser os responsáveis por este efeito protector, isto porque nos mesmos estudos, quer o etanol quer o vinho desprovido do seu conteúdo em polifenóis apresentavam uma redução estatisticamente significativa deste efeito (105,106).

A identificação dos compostos responsáveis pelas propriedades antibacterianas, nomeadamente sobre *H. pylori*, pelas propriedades anti-cancerígenas e anti-oxidantes destas bebidas (vinho e cerveja), assim como dos seus mecanismos de acção abrem um campo de estudo que poderia ajudar a esclarecer os resultados dos estudos epidemiológicos que avaliam o efeito das bebidas alcoólicas no desenvolvimento de cancro gástrico.

5 – Bibliografia

- 1 – Warren JR, Marshall. Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis (letter). *The Lancet*. 1983; I:1273-4.
- 2 – Marshall B, Warren JR. Unidentified Curved Bacilli in The Stomach of Patient with Gastritis and Peptic Ulceration. *The Lancet*. 1984; I: 1311-4.
- 3 – Tavira LT. *Helicobacter pylori*. In: Ferreira WFC, Sousa JCF. *Microbiologia* (vol 2). Lidel. 2000. p 145-50.
- 4 – Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmisson. *Epidemiol Rev*. 2000; 22: 283-97.
- 5 – Dunn EB, Cohen H, Blaser JM. *Helicobacter pylori*. *Cli Mic Reviews*. 1997; 10(4): 720-41.
- 6 – Khuro MS. *Helicobacter pylori*: The unique organism. *Annals of Saudi Medicine*. 2002; 22; 3-4: 192-201.
- 7 – Suerbaum S, Mochetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002; 347; 15: 1175-86.
- 8 – Guerreiro AS. *Helicobacter pylori*: Aspectos epidemiológicos. In: Ribeiro T, Cotter J. *Helicobacter pylori*. A infecção e suas consequências. 1998. MEDISA. p 43-55.
- 9 – Dubois A. Spiral Bacteria in the Human Stomach: The Gastric Helicobacters. 1995. URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no3/dubois.htm>. Acedido em 17 de Setembro de 2004.
- 10 – Malfertheiner P, Leodolter A. *Helicobacter pylori*: Conceitos actuais. In: Quina MG et al. *Gastrenterologia Clínica*. Lidel. 2000. p 347-50.

- 11 – Hardin FJ, Wright RA. *Helicobacter pylori*: Review and update. Hospital Physician. 2002. 23-31.
- 12 – Xia HH, Taylley NJ. Natural acquisition and spontaneous elimination of *Helicobacter pylori*: clinical implications. Am J Gastroenterol. 1997; 92: 1780-7.
- 13 – Guerreiro AS. Infecção por *Helicobacter pylori*: Mecanismos patogénicos e consequências. In: Ribeiro T, Cotter J. *Helicobacter pylori*. A infecção e suas consequências. 1998. MEDISA. p 29-41.
- 14 – Frenck RW. *Helicobacter* in the developing world. Microbes and infection. 2003; 705-13.
- 15 – Segal I, Ally R, Mitchell H. *Helicobacter pylori* – an African perspective. J Med 2001; 94: 561-65.
- 16 – Gerhard M, Rad R, Prinz C, Naumann H. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2002; 17S-23S.
- 17 – Miyazaki M, Kato M, Takata T. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori*: the association between a parent and an offspring with respect to the presence of anti-Cag A antibody. J Infect Chemother. 2002. 8: 70-5.
- 18 – Mégraud F, Broutet N. Review article: Have we found the source of *Helicobacter pylori*? Aliment Pharmacol Ther. 2000; 14 (3): 7-12.
- 19 – Everhart JE. Recent Developments in the Epidemiology of *Helicobacter pylori*. In Marshall B. Gastroenterology Clinics of North America – Part I. 2000. W.B. Saunders Company. p 559-77.
- 20 – Marais A, Monteiro L, Mégraud F. Microbiology of *Helicobacter pylori*. Curr Top Microbiol Immunol. 1999; 241: 103-22.

- 21 – Windsor HM, O'Rourke J. Bacterology and taxonomi of *Helicobacter pylori*. In Marshall B. Gastroenterology Clinics of North America – Part I. 2000. W.B. Saunders Company. p 633-47.
- 22 – Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media (letter). App Microbiology. 2000; 30: 192-6.
- 23 – Monteiro L, Mégraud F. *Helicobacter pylori*: II- Métodos de diagnóstico. In: Quina MG et al. Gastreenterologia Clínica. Lidel. 2000. p 351-75.
- 24 – Oleastro M, Monteiro L. *Helicobacter pylori*: patogénese. In: Chaves C., Ed. *Helicobacter pylori – Da infecção à clínica*. Biblioteca Gastreenterológica. Permanyer. 2001. p 21-32.
- 25 – Figueiredo C, Carneiro F. *Helicobacter pylori*: a bactéria e a infecção. In: Ribeiro T, Cotter J. *Helicobacter pylori. A infecção e suas consequências*. 1998. MEDISA. p 14-27.
- 26 – Neu B, Randlkofer P, Neuhofer M, Volland P, Mayerhofer A, Gerhard M et al. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. Am J Gastrointest Liver Physiol. 2002; 283: 309-18.
- 27 – Ricci V, Zarrilli R, Romano M. Voyage of *Helicobacter pylori* in human stomach: odyssey of a bacterium. Digest Liver Dis. 2002; 34: 2-8.
- 28 – Moran AP, Svennerholm AM, Penn CW. Pathogenesis and host response of *Helicobacter pylori*. Trends in: Microbiology. 2002; 10 (12): 545-547.
- 29 – Go MF, Crowe SE. Virulence and Pathogenicity of *Helicobacter pylori*. In: Marshall B. Gastroenterology Clinics of North America – Part I. 2000. W.B. Saunders Company. p 649-69.
- 30 – Lacy BE, Rosemore J. *Helicobacter pylori*: Ulcers and More: The Beginning of an Era. Journal of Nutrition. 2001; 131: 2789S-93S.

- 31 – Höcker M, Hohenberger. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. *The Lancet*. 2003; 9391 (362): 1231-33.
- 32 – Oleastro M, Matos R, Monteiro L, Guerreiro AS, Pinto R, Leitão CN, Cabrita J. Genótipos *cagA* e *vacA* de estirpes de *Helicobacter pylori*: sua relação com diferentes patologias gastroduodenais. *J Port Gastreterologia*. 2001; 8: 178-83.
- 33 – Oleastro M, Gerhard M, Lopes AI, Ramalho P, Cabral J, Guerreiro AS, Monteiro L. *Helicobacter pylori* Virulence Genotypes in Portuguese Children and Adults with Gastroduodenal Pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22: 85-91.
- 34 – Nedrud JG, Blanchard SS, Czinn SJ. *Helicobacter pylori* inflammation and immunity. *Helicobacter*. 2002; 7: 24S-29S.
- 35 – Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107 (7): 767-73.
- 36 – Pinto R, Ferra MA, Santos AA, Leitão CN, Oleastro M, Cabrita J, Chaves P, Tendeiro T. Genótipos de *Helicobacter pylori* na Carcinogénese Gástrica. *Revista de Gastreterologia & Cirurgia*. 2002; vol. XIX (103): 153-57.
- 37 – Bach S, Makristathis A, Pinto A, Quina M, Rotter M, Hirschl AM. *Helicobacter pylori* Type I Strains Among Austrian and Portuguese Patients with Gastritis, Peptic Ulcer or Gastric Cancer. *Eur J Clin Microbiol Dis*. 1999; 18: 807-10.
- 38 – Torres J, Pérez-Pérez GI, Leal-Herrera Y, Muñoz O. Infection with *cagA*+ *Helicobacter pylori* Strains as a Possible Predictor of Risk in the Development of Gastric Adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 1998; 78: 298-300.
- 39 – Kaji T, Ishihara S, Ashizawa N, Hamamoto N, Endo H, Fukuda R, Adachi K, Watanabe M. Adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells and mucosal inflammation. *J Lab Clin Med*. 2002; 139 (4): 244- 50.

- 40 – Asaka M, Kato M, Sugiyama T, et al. Peptic ulcer recurrence and *Helicobacter pylori*: evidence from Japan. J Gastroenterol. 2003; 38: 410-11.
- 41 – Gutiérrez JM, Delgado Bellido JD, Casas Rodriguez. Infección por y cáncer gástrico. 2001. URL: <http://www.gastrohvm.arrakis.es/canhp.htm> Acedido em 20 de Outubro de 2003.
- 42 – Sepúlveda AR, Coelho LG. *Helicobacter pylori* and gastric malignances. Helicobacter. 2002; 7: 37S-42S.
- 43 – Quina MG, Neves BC. *Helicobacter pylori* – III Terapêutica In: Quina MG et al. Gastreenterologia Clínica. Lidel. 2000. p 376-84.
- 44 – Bazzoli F, Bianchi Porro G, Maconi G, Molteni M, Pozzato P, Zagari RM. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. Indications and regimens: na update. Digest Liver Dis. 2002; 34: 70-83.
- 45 – Bazzoli F, Pozzato P, Rokkas T. *Helicobacter pylori*: the challenge in therapy. Helicobacter. 2002; 7: 43S-49S.
- 46 – Guerreiro AS. *Helicobacter pylori*: Quando e como erradicar. Algumas reflexões. Boletim de Gastroenterologia do Hospital Distrital de Faro. 2002; 3: 4-9.
- 47 – Brenner H, Rothenbacher D, Bode G, Adler G. Relation of smoking and alcohol and coffee consumption to active *Helicobacter pylori* infection: cross sectional study. BMJ. 1997;315:1489-92.
- 48 – Brenner H, Berg G, Lappus N, Kliebsch U, Bode H. Alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection: Results from the German National Health Survey. Epidemiol. 1999; 10: 214-8.
- 49 – Murray L, Lane AJ, Harvey IM, Prakosh N, Harvey RF. Inverse Relationship Between Alcohol Consumption and Active *Helicobacter pylori* Infection: The Bristol Helicobacter project. Am J Gastroenterol. 2002; 97 (11): 2750-5.

- 50 – Höök-Nikanne J. Effect of Alcohol Consumption on the Risk of *Helicobacter pylori* Infection. *Digestion*. 1991; 50: 92-98.
- 51 – The EUROGAST Study Group. Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut*. 1993; 34 (12): 1672-6 (Abstract).
- 52 – Buzas GM. Prevalence of *Helicobacter pylori*, correlations between alcohol consumption and gastroduodenal damage. *Orv Hetil*. 1997; 138 (44): 2791-5 (Abstract).
- 53 – Peterson WL, Barnett C, Walsh JH. Effect of Intra-gastric Infusions of Ethanol and Wine on Serum Gastrin Concentration and Gastric Acid Secretion. *Gastroenterology*. 1986; 91: 1390-5.
- 54 – Singer MV, Leffmann C, Eysselein VE, Calden H, Goebell H. Action of Ethanol and Some Alcoholic Beverages on Gastric Acid Secretion and Release of Gastrin in Humans. *Gastroenterology*. 1987; 93: 1247-54.
- 55 – Bujanda L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95 (12): 3374-82.
- 56 – Weisse ME, Eberly B, Person DA. Wine as a digestive aid: comparative effects of bismuth salicylate and red and white wine. *BMJ*. 1995; 23-30 (311): 1657-60.
- 57 – Sheth NK, Wisniewski TR, Franson TR. Survival of Enteric Pathogens in Common Beverages: An *in vitro* study. *Am J Gastroenterol*. 1988; 83 (6): 658-60.
- 58 – Ogihara A, Kikuchi S, Hasegawa A, Kurosawa M, Kaneko E, Mizukoshi H. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and smoking and drinking habits. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15: 271-6 (Abstract).

- 59 – Brenner H, Bode G, Adler G, Hoffmeister A, Koenig W, Rothenbacher D. Alcohol as a Gastric Disinfectant? The Complex Relationship between Alcohol and current *Helicobacter pylori* Infection. *Epidemiol.* 2001; 12: 209-14.
- 60 – Namiot Z, Namiot DB, Kemon A, Golebiewska M, Bucki R. The effect of cigarette smoking and alcohol consumption on efficacy of *Helicobacter pylori* eradication. *Pol Arch Med Wewn.* 2000; 104: 569-74 (Abstract).
- 61 – Baena JM, López C, Hidalgo A, Rams F, Jiménez S, Garcia M et al. Relation between alcohol consumption and success of *Helicobacter pylori* eradication therapy using omeprazole, clarithromycin and amoxicillin for 1 week. *Eur J Gastroenterology Hepatol.* 2002; 14: 291-6 (Abstract).
- 62 – Marimón JM, Bujanda L, Gutiérrez-Stampa MA, Cosme A, Arenas JI. *In vitro* Bactericidal Effect of Wine against *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* (letter). 1998; 93 (8): 1392.
- 63 – Daroch F, Hoeneisen M, González CL, Kawaguchi F, Salgado F, Solar H et al. *In vitro* antibactericidal activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios.* 2001; 104: 79-85.
- 64 – Mahady G, Pendland SL. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori in vitro*. *Am J Gastroenterol* (letter) 2000; 95 (79): 1849.
- 65 – Mahady G, Pendland S, Chadwick L. Resveratrol and Red Wine Extracts Inhibit the Growth of *cag A+* Strains of *Helicobacter pylori in vitro*. *Am J Gastroenterol* (letter) 2003; 98 (6): 1440-41.
- 66 – Lunet N, Barros H. *Helicobacter pylori* infection and Gastric Cancer: Facing the Enigmas. *Int J Cancer.* 2003; 106: 953-60.

- 67 – National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M7-A5. NCCLS, Wayne, PA. 2000.
- 68 – Glupczynski Y, Broutet N, Cantagrel A, Andersen LP, Alarcon T, Mégraud F et al. Comparison of the E test and Agar Dilution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. European J Clin Microb and Infect Diseases. 2002.
- 69 – Glupczynski Y. Culture of *Helicobacter pylori* from biopsies and antimicrobial susceptibility testing. In Lee A, Mégraud F. *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis & basic research*. W.B. Saunders Company. 1996. p 17-32.
- 70 – Mahady G, Pendland S, Yun G, Lu Z. Turmeric (*Curcuma longa*) and Curcumin Inhibit the Growth of *Helicobacter pylori*, a Group 1 Carcinogen. Anticancer Research. 2002; 22: 4179-82.
- 71 – Mahady G, Pendland S, Yun G, Lu Z, Stoia A. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the gingerols inhibit the growth of *cag A+* Strains of *Helicobacter pylori*. Anticancer Research. 2003; 23: 3699-3702.
- 72 – Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Menlis A, Mitaku S, Charvala C. Composition of the Essential Oil of Two *Nepeta* Species and *in vitro* Evaluation of their Activity against *Helicobacter pylori*. Planta Med (letter). 2001; 67: 880-3.
- 73 – Chan Man-Ying M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. Biochemical Pharmacology. 2002; 63 (2):99-104.
- 74 – Vacca V, Leccis L, Fenu P, Pretti L. Wine yeasts and resveratrol content. Biotechnology (letter). 1997; 19 (6): 497-98.
- 75 – Masten S. Review of Toxicological Literature: Trans-resveratrol [501-36.0]. National Institute of Environmental Health Sciences. 2002. 54 p.

- 76 – Yilmaz Y, Toledo R. Health aspects of functional grape seed constituents. 2004. URL: <http://www.sciencedirect.com/science>. Acedido em 12 de Outubro de 2004.
- 77 – Lorimier A. Alcohol, wine, and health. *The Am J Surgery*. 2000; 180 (5): 357-61.
- 78 – Castellari M, Spinabelli U, Riponi C, Amati A. Influence of some technological practices on the quantity of resveratrol in wine. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 1998; 206: 151-155.
- 79 – Chan Man-Ying M, Mattiacci J, Hwang H, Shah A, Fong D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of inducible nitric oxide synthase pathway. *Boochemical Pharmacology*. 2000; 60 (10): 1539-48.
- 80 – Feng Y, Zou JP, Li XY. Effects of resveratrol and ethanol on production of pró-inflammatory factors from endotoxin activated murine macrophages. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23 (11): 1002-6.
- 81 – Stevens J, Page J. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! 2004. URL: <http://www.sciencedirect.com/science>. Acedido em 12 de Outubro de 2004.
- 82 – Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids – potent and versatile biologically active interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 2002; 139: 1-21.
- 83 – Stevens J, Miranda C, Buhler D. Chemistry and Biology of Hop Flavonoids. *J Am Soc Brew Chem*. 1998; 56 (4): 136-145.

- 84 – Gerhäuser C, Alt AP, Knauff J, Becker H. Isolation and potencial cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. *Phytochemistry Reviews*. 2002; 1: 369-77.
- 85 – Correa P, Piazuolo MB, Camargo MC. The future of gastric cancer prevention. *Gastric Cancer*. 2004; 7: 9-16.
- 86 – Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the Relationship Between *Helicobacter pylori* Seropositivity and Gastric Cancer. *Gastroenterol*. 1998; 114:1169-79.
- 87 – Komoto K, Haruma K, Kamada T, Tanaka S, Yoshiara M, Sumii K et al. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Neoplasia: Correwlations With Histological Gastritis and tumor Histology. *Am J Gastroenterol*. 1998; 93 (8): 1271-75.
- 88 – Kubba AK, MacIntyre IMC. Gastric Cancer distal to the Cardia – prevetion or cure? *Surgical Oncology*. 1997; 6(2): 111-24.
- 89 – Kikuchi S. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastric cancer*. 2002; 5: 6-15.
- 90 – Boeing H. Epidemiological Research in Stomach cancer: progress over the last ten years. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1991; 117: 133-143.
- 91 – Palli D. Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. *Gastroenterol*. 2000; 35 (suppl 12): 84-9 (Abstract).
- 92 – Kato I, Plummer M, Lopez G, Peraza S, Castro D, Sanchez V et al. Environmental factors in *Helicobacter pylori* – related precancerous lesions in Venezuela. *Câncer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13 (3): 468-76 (Abstract).

- 93 – Boeing H, Frentzel-Beyme R, Berger M, Berndt V, Gores W, Korner M et al. Case-control study on stomach cancer in Germany. *Int J Cancer*. 1991; 47 (6): 858-64 (Abstract).
- 94 – Jedrychowski W, Popiela T, Drews M, Gabryelewicz A, Marlicz K, Misiunia P et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection, smoking and dietary habits on the occurrence of antrum intestinal metaplasia. Clinico-epidemiological study in Poland. *Pol J Pathol*. 1999; 50 (4): 289-95 (Abstract).
- 95 – Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*. 2004; 113 (3): 321-33.
- 96 – Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E. *Helicobacter pylori* infection and carcinogenesis of the stomach. *Langenbeck's Arch Surg*. 2000; 385: 69-74.
- 97 – Ito LS, Oba-Shinjo SM, Uno SM, Shinjo SK, Tajima NK, Tominaga S. Lifestyle factors associated with atrophic gastritis among *Helicobacter pylori* – seropositive Japanese – Brazilians in São Paulo. *Int J Clin Oncol*. 2003; 8: 362-68.
- 98 – Jedrychowski W, Boeing H, Wahrendorf J, Popiela T, Tobiasz-Adamczyk B, Kulig J. Tobacco smoking and alcohol consumption as risk factors for stomach cancer in different locations and histological types. *Przegl Epidemiol*. 1992; 46(4): 55-67 (Abstract).
- 99 – Zaridze D, Borisova E, Maximovitch D & Chkhikvadze V. Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case-control study from Moscow, Russia. *Cancer Causes and Control*. 2000; 11: 363-71.
- 100 – Gammon MD, Schoenberg JB, Ahsan H, Risch HA, Vaughan TL, Chow WH et al. Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89 (17): 1277-84 (Abstract).

- 101 – Stefani E, Boffetta P, Carzoglio J, Mendilaharsu S, Deneo-Pellegrini H. Tobacco smoking and alcohol drinking as risk factors for stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Causes and Control*. 1998; 9: 321-29.
- 102 – Howard A, Chopra M, Thurnham DI, Strain JJ, Fuhrman B, Aviram M. Red Wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components? *Medical Hypotheses*. 2002; 59: 101-4.
- 103 – Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. *Nutrition*. 2002; 18: 173-77.
- 104 – Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, Kojima T, Hasegawa. Anti-tumor of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biother Radiopharm*. 1998; 13 (6): 447-52 (Abstract).
- 105 – Greenrod W, Fenech M. The principal and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage in vitro. *Mutagenesis*. 2003; 18 (2): 119-26.
- 106 – Fenech M, Stockley C, Aitken C. Moderate wine consumption protects against hydrogen peroxide- induced DNA damage. *Mutagenesis*. 1997; 12 (4): 289-96.

1. Resultados dos ensaios com as diferentes bebidas e substâncias

Os resultados obtidos durante a realização dos ensaios com as diferentes bebidas e substâncias foram avaliados pela presença ou ausência de crescimento.

Os resultados apresentados nos quadros que se seguem, foram confirmados pela repetição de cada ensaio, em triplicado.

Todas as estirpes cresceram nos meios de controlo (meio não selectivo sem adição de qualquer bebida ou substância) em todos os ensaios realizados.

1.1. Ensaio com vinho tinto e vinho branco

Os resultados obtidos são apresentados no quadro seguinte (quadro 1):

Quadro 1 - Crescimento de diferentes estirpes de *H. pylori* em meios com vinho tinto e vinho branco

Estirpe	Controlo	Vinho tinto				Vinho branco			
		22,5 %	45 %	67,5 %	90 %	22,5 %	45 %	67,5 %	90 %
E2	○	●	●	●	●	○	●	●	●
E4	○	●	●	●	●	○	●	●	●
E8	○	●	●	●	●	○	●	●	●
E9	○	●	●	●	●	●	●	●	●
E10	○	●	●	●	●	●	●	●	●
E28	○	●	●	●	●	○	●	●	●
E120	○	○	●	●	●	○	●	●	●
E123	○	●	●	●	●	●	●	●	●
E126	○	●	●	●	●	●	●	●	●
E128	○	○	●	●	●	○	●	●	●
E149	○	●	●	●	●	○	●	●	●
CCUG 15818	○	○	●	●	●	○	●	●	●

Legenda: ○ = com crescimento; ● = sem crescimento

Relativamente ao vinho tinto, verificou-se que este inibiu o crescimento de nove (75%) das doze estirpes testadas para a concentração de 22,5%.

Para uma concentração igual ou superior a 45%, observou-se inibição do crescimento da totalidade (100%) das estirpes.

O vinho branco apresentou resultados idênticos ao vinho tinto para concentrações iguais ou superiores a 45%. Para a concentração de 22,5% observou-se a inibição do crescimento de apenas 4 estirpes (33%).

1.2. Ensaio com cerveja preta e cerveja preta enriquecida

Os resultados obtidos são apresentados nos quadros seguintes (quadros 2 e 3):

Quadro 2 - Crescimento de diferentes estirpes de *H. pylori* em meios com cerveja preta e cerveja preta enriquecida

Estirpe	Controlo	Cerveja preta enriquecida				Cerveja preta			
		22,5 %	45 %	67,5 %	90 %	22,5 %	45 %	67,5 %	90 %
E2	○	○	○	●	●	○	●	●	●
E4	○	○	○	●	●	○	○	●	●
E8	○	○	○	●	●	○	○	●	●
E9	○	○	○	●	●	○	●	●	●
E10	○	○	○	●	●	○	○	●	●
E28	○	○	○	○	●	○	○	●	●
E120	○	○	○	●	●	○	○	●	●
E123	○	○	●	●	●	○	○	●	●
E126	○	○	●	●	●	○	●	●	●
E128	○	○	●	●	●	○	●	●	●
E149	○	○	●	●	●	○	○	●	●
CCUG 15828	○	○	○	●	●	○	○	○	●

Legenda: ○ = com crescimento; ● = sem crescimento

Quadro 3 - Crescimento de diferentes estirpes de *H. pylori* em meios com cerveja branca com e sem álcool

Estirpe	Controlo	Cerveja branca c/ álcool				Cerveja branca s/ álcool			
		22,5 %	45 %	67,5 %	90 %	22,5 %	45 %	67,5 %	90 %
E2	○	○	○	●	●	○	○	●	●
E4	○	○	○	●	●	○	○	●	●
E8	○	○	○	●	●	○	○	○	●
E9	○	○	●	●	●	○	○	●	●
E10	○	○	○	●	●	○	○	○	●
E28	○	○	○	○	●	○	○	○	○
E120	○	○	○	●	●	○	○	●	●
E123	○	○	○	●	●	○	○	○	○
E126	○	○	●	●	●	○	○	○	●
E128	○	○	○	●	●	○	○	○	●
E149	○	○	○	●	●	○	○	○	●
CCUG 15818	○	○	○	●	●	○	○	○	●

Legenda: ○ = com crescimento; ● = sem crescimento

A cerveja preta, a cerveja preta enriquecida e cerveja branca com álcool, apresentaram um efeito inibitório idêntico, para a concentração máxima (90%), inibindo o crescimento da totalidade (100%) das estirpes de *H. pylori* testadas.

Nenhuma das cervejas apresentou efeito inibitório para a concentração de 22,5%.

A cerveja preta e a cerveja preta enriquecida inibiram o crescimento de 4 estirpes (33%) para a concentração de 45%, para esta concentração a cerveja branca com álcool só inibiu o crescimento de 2 estirpes (16,7%), revelando um menor efeito inibitório.

Para a concentração de 67,5%, as cervejas pretas (enriquecida e normal) apresentaram efeitos semelhantes ao inibirem o crescimento de 91,6% e 100% das estirpes, respectivamente. Para a mesma concentração, a cerveja branca com álcool apresentou resultados semelhantes ao inibir o crescimento de 96,1% das estirpes.

A cerveja sem álcool foi a que apresentou efeito inibitório menos marcado, observando-se crescimento de *H. pylori* em todas as concentrações testadas. No entanto, o número de estirpes com crescimento foi diminuindo à medida que a concentração de cerveja no meio aumentou.

Quadro 4 - Crescimento de diferentes estirpes de *H. pylori* em meios com cerveja branca com e sem álcool

Estirpe	Controlo	Resveratrol			Xanthohumol		
		12,5 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	12,5 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml
E2	○	○	●	●	○	○	●
E4	○	○	●	●	○	●	●
E8	○	○	●	●	○	○	●
E9	○	○	○	●	○	●	●
E10	○	○	○	●	○	●	●
E28	○	○	○	●	○	●	●
E120	○	○	●	●	●	●	●
E123	○	○	○	●	○	●	●
E126	○	○	●	●	●	●	●
E128	○	○	●	●	●	●	●
E149	○	○	○	●	○	○	●
CCUG 15818	○	○	○	●	○	●	●

Legenda: ○ = com crescimento; ● = sem crescimento

Relativamente ao resveratrol, para a concentração de 75 µg/ml, verificou-se que este inibiu o crescimento de seis (50%) das doze estirpes de *H. pylori* testadas.

Para a concentração de 100 µg/ml o efeito inibitório foi visível para todas as estirpes (100%).

Para a concentração de 12,5 µg/ml não foi observado qualquer efeito inibitório do resveratrol sobre o crescimento de *H. pylori*.

O xanthohumol apresentou resultados idênticos ao resveratrol para a concentração de 100µg/ml, observando-se inibição do crescimento de todas as estirpes testadas.

Relativamente às concentrações de 12,5 µg/ ml e 75 µg/ ml, o xanthohumol demonstrou um efeito inibitório superior ao do resveratrol para as mesmas concentrações, uma vez que para a concentração de 12,5 µg/ml inibiu o crescimento de três das estirpes testadas (25%) e para a concentração de 75 µg/ml inibiu o crescimento de nove estirpes (75 %) contra 0% e 50%, respectivamente.

Meios

Caldo Mueller-Hinton (OXOID)

Utilizado na repicagem de culturas e na preparação dos inóculos a partir das biópsias.

Preparado segundo as instruções do fabricante (38 g de meio por litro de água destilada), esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, sendo posteriormente distribuído em tubos Eppendorf e armazenado a 4°C.

Caldo Base Ureia (OXOID)

Utilizado no teste da urease.

Após a sua preparação (0,9 g de meio para 95 ml de água destilada) o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos, sendo depois colocado numa estufa até atingir a temperatura de 55 °C, atingida essa temperatura foi-lhe adicionada uma ampola (5 ml) de solução de ureia estéril (SR 20 – OXOID), distribuindo-se de seguida por tubos Eppendorf e armazenado a 4°C.

Caldo Triptona de Soja (OXOID) com 20 % de glicerol

Utilizado na conservação por congelação a -80°C das suspensões bacterianas obtidas a partir de culturas frescas puras.

Após a preparação, segundo as instruções do fabricante, a 38,5 ml de meio adicionaram-se 11,5 ml de glicerol, para um volume total de 50 ml. De seguida, procedeu-se à esterilização em autoclave a 121° C durante 15 minutos, posteriormente foi distribuído por tubos Eppendorf e armazenado a 4° C.

Soluções e Corantes

Solução de Lugol

Solução utilizada no método de coloração diferencial de Gram, como fixador do primeiro corante.

Violeta Cristal

Corante utilizado na coloração diferencial de Gram.

Safranina

Corante diferencial de contraste utilizado na coloração diferencial de Gram.

Material

Caixas de Petri de 90 mm Ø

Zaragatoas

Ansas de inoculação

Pipetas de Pasteur

Pontas para micropipetas de 200 e 1000 µl

Micropipetas de 20, 200 e 1000 µl (Gilson)

Tubos Eppendorf de 500 e 1000 µl

Lâminas e lamelas para microscópio

Gas Generating Kits for Campilobacter (OXOID)

Frascos Schott (100, 250 e 500 ml)

Quitassatos (250, 500 ml)

Tubos de ensaio

Provetas de 10, 25, 50, 100, 250, 500 ml

Suportes para tubos de ensaio e Eppendorfs

Algodão hidrófobo

Funis de porcelana

Papel de filtro

Equipamento

Câmara de fluxo laminar vertical (Biohazard)

Autoclave (Selecta)

Jarras de microaerofilia (OXOID)

Incubadora (BIOFASE eco, Integra Bioscience)

Balança Analítica (Mettler AE 200)

Balança de Precisão (Fisher scientific XS 420)

Microscópio Óptico (Leica AT 2000)

Lupa Binocular (Leica Zoom 2000)

Medidor de pH (Basic 20 – Crison)

Estufa de incubação (MedCenter)

Estufa de esterilização a calor seco (MedCenter)

Câmara de congelação a -80°C (Polar 530 V - Angelantoni Industrie S.p.A,
Biomedical Divison)

Vortex (Heidolph Reax Top)

Bomba de Vácuo (Millipore)

Placa de Aquecimento (Agimatic E – Selecta)

Bico de Bunsen

100709

W3