

António Mário de Jesus Santos

NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*?
CONTRIBUTO DE UM ESTUDO EXPERIMENTAL.

Lisboa

2020

Trabalho elaborado para candidatura ao grau de Doutor apresentado à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (*Nova Medical School*).

Este trabalho foi financeiramente suportado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através de um projeto intitulado “Nutracêuticos: que papel na prevenção da doença crónica? – Contributo para a fundamentação de uma nova opção terapêutica” com a referência PTDC/SAU-OSM/66323/2006.

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Este trabalho teve ainda a colaboração das seguintes instituições:



Dedicatória

À Ana Maria e aos nossos três filhos,
Sara, Filipa e António.

À alegria de partilharmos a Vida.

Aos meus pais e ao meu irmão

Que estão comigo desde Sempre.

Agradecimentos

Apesar do carácter individual deste trabalho, a sua realização não seria possível sem a colaboração e o empenho de várias pessoas.

Neste sentido, gostaria de expressar o meu profundo agradecimento e gratidão:

Ao Sr. Professor Doutor António Sousa Guerreiro, não só pela amizade e forma empenhada com que orientou esta dissertação mas também pela permanente motivação, incansável disponibilidade e rigor que foi inculcando nos diversos trabalhos de investigação que levaram à presente tese.

Um agradecimento muito especial à Dra. Teresa Lopes, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, pelo apoio incondicional, pelos momentos de partilha e também pela enorme dedicação em todos os trabalhos.

Ao Dr. Jorge Machado e à Dra. Mónica Oleastro do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela disponibilidade, pela enorme colaboração e disponibilidade no biotério e nos trabalhos de biologia molecular.

À Sra. Professora Doutora Paula Chaves e à Dra. Teresa Pereira do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, por toda a dedicação e rigor inculcados nos estudos de anatomia patológica da presente tese.

À Dra. Elsa Seixas, do Instituto Gulbenkian de Ciência pelo incondicional apoio nos trabalhos de biologia molecular.

Não poderia terminar sem agradecer ao Sr. Professor Doutor Mário Gentil Quina que me recebeu no seu Serviço de Universitário de Medicina III do Hospital de Pulido Valente, quando eu dava os primeiros passos na medicina. Motivou o meu interesse pelo ensino, pela investigação e sempre me acompanhou também ao longo de todas as etapas da minha vida profissional.

ÍNDICE

1. RESUMO	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 A infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	17
2.1.1 Introdução	17
2.1.2 Epidemiologia e transmissão	18
2.1.3 Patogénese	19
2.1.4 Diagnóstico	27
2.1.5 Tratamento da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	34
2.2 Modelos experimentais de infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	36
2.2.1 Porco	37
2.2.2 Primatas não humanos	37
2.2.3 Cães e Gatos	38
2.2.4 Ratos	38
2.3 Nutracêuticos – aspetos gerais	42
2.3.1 Nutracêuticos e sistema imunitário	44
2.3.2 Nutracêuticos e <i>Helicobacter pylori</i>	48
2.3.3 O nutracêutico curcumina.....	49
3. OBJETIVOS DO ESTUDO	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
5. ARTIGOS	59
5.1 Role of ¹³ C-Urea Breath Test in Experimental Model of <i>Helicobacter pylori</i> Infection in Mice	60
5.2 <i>Helicobacter pylori</i> and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells	68
5.3 Curcumin Inhibits Gastric Inflammation Induced by <i>Helicobacter Pylori</i> Infection in a Mouse Model	77
5.4 Cyclooxygenase inhibition with curcumin: a new therapeutic approach against <i>Helicobacter pylori</i> infection?	93
6. DISCUSSÃO	101
7. CONCLUSÕES	107
8. FUTURAS ÁREAS DE INVESTIGAÇÃO	108
9. BIBLIOGRAFIA	110

ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
cagA	Gene associado à citotoxina A
CagA	Proteína associada à citotoxina A
Cag-TaSS	Sistema de secreção tipo IV
CAT	Catalase
DCs	Células dendríticas
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
GSH	Glutathiona
GRAS	<i>Generally Recognised as safe</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>H. felis</i>	<i>Helicobacter felis</i>
Helicobacter spp.	Helicobacter species
HHLO	<i>Helicobacter heilmannii</i> -like bacteria
IBP	Inibidores da bomba de protões
IFN	Interferão
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarido
NF-κB	Factor nuclear-kapa B
NO	Óxido nítrico
NUD	Dispepsia não ulcerosa
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MNU	N-methyl-N-nitrosourea
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
MYD88	Fator de diferenciação mieloide
OMS	Organização mundial de saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RLO	Radicais livres de oxigénio
SOD	Superoxido dismutase
Th	Célula T- helper
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Factor de Necrose Tumoral
TRU	Teste rápido da urease
vacA	Gene da citotoxina vacuolizante A
VacA	Citotoxina vacuolizante A

1. RESUMO

A infecção gástrica em humanos por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma das mais comuns, mas apenas está relacionada com patologia em menos de 20% da população infetada. A maioria dos indivíduos permanece colonizada durante toda a vida porque esta bactéria é um micro-organismo altamente adaptado ao hospedeiro conseguindo ludibriar os seus mecanismos de defesa. A cronicidade da infecção bem como a heterogeneidade da virulência das estirpes deste micro-organismo, associadas a determinados fatores de risco genéticos por parte do hospedeiro, fazem com que determinados indivíduos sejam particularmente suscetíveis ao desenvolvimento de patologia gastroduodenal. Apesar de haver ainda muito para investigar, o risco de desenvolver doença ulcerosa péptica ou mesmo cancro gástrico, está indiscutivelmente relacionado com alterações moleculares, histológicas e fisiopatológicas que esta bactéria induz na mucosa gástrica.

A infecção por *H. pylori*, desencadeia uma sequência de alterações na mucosa gástrica que se iniciam com uma gastrite superficial e que pode progredir para gastrite crónica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, carcinoma gástrico. A metaplasia intestinal resultante da agressão da mucosa por *H. pylori*, que está presente em cerca de 30% dos indivíduos infetados, pode ser considerada um processo regenerativo pré-neoplásico que consiste na transformação da mucosa gástrica para num fenótipo intestinal. Quando presente, a metaplasia intestinal representa um aumento do risco de desenvolvimento de cancro gástrico.

A cronicidade da infecção e a sua resistência crescente aos antimicrobianos têm sido atribuídas não apenas à variabilidade genética, mas também à capacidade deste microrganismo formar biofilmes bem como à possibilidade desta bactéria entrar num estado de dormência, ou de não replicação, como estratégia para superar as condições adversas do meio envolvente.

Os diferentes regimes terapêuticos anti-*H. pylori* disponíveis atualmente, têm vários problemas inerentes, tais como, a presença de alta taxa de resistência desta bactéria a diversos fármacos em múltiplas áreas geográficas, os efeitos secundários da terapêutica e também, não menos importante, dificuldade de

acesso à mesma por parte de determinados grupos populacionais devido ao seu elevado custo.

Assim, são necessárias novas terapêuticas alternativas, como probióticos, peptídeos, polissacarídeos, alimentos funcionais/nutracêuticos, nomeadamente polifenóis onde se inclui a curcumina, que contribuam para a modulação da resposta inflamatória e conseqüentemente previnam (prevenção secundária) os efeitos deletérios do *H. pylori* na mucosa gástrica.

Os objetivos da presente tese foram:

- 1) Desenvolver um modelo experimental de infeção crónica no ratinho, monitorizando a sua evolução ao longo do tempo, sem necessidade de sacrificar os animais;
- 2) Esclarecer um dos possíveis mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento de metaplasia intestinal na mucosa gástrica;
- 3) Verificar a resposta inflamatória induzida por *H. pylori* na mucosa gástrica e a sua possível modulação pelo nutracêutico curcumina;
- 4) Demonstrar que a curcumina tem a capacidade de inibir a cyclooxygenase-2;

Neste contexto, como consequência da atividade por nós desenvolvida, foram elaborados quatro estudos originais de que resultaram as correspondentes publicações.

Estudo 1 (descrição resumida)

O trabalho experimental de infeção crónica com *H. pylori* e monitorização da infeção ao longo do tempo só foi possível com a adaptação ao ratinho do teste respiratório com ¹³C-ureia usado em humanos. Este método de diagnóstico, desenvolvido por nós de um modo pioneiro no ratinho, permitiu confirmar a manutenção da bactéria na mucosa gástrica em qualquer momento da experiência. Este teste mostrou ser bastante sensível (96%) e específico (85,7%), usando a técnica de PCR como padrão, tendo ainda a vantagem de não ser necessário sacrificar os animais ao longo de toda a experiência. O seu desenvolvimento foi fundamental para a realização de todos os trabalhos que se seguiram na presente tese.

Estudo 2 (descrição resumida)

O principal mediador molecular da transformação da mucosa de tipo gástrico em mucosa de tipo intestinal é o fator de transcrição CDX2. Em condições normais, a expressão de CDX2 encontra-se restrita ao intestino, podendo ser expressa de modo ectópico em lesões de metaplasia intestinal não só no estômago, mas também no esôfago e na vesícula biliar. Sabe-se que tanto a proteína morfogenética óssea (BMP – *bone morphogenetic protein*) como a infecção por *H. pylori* em culturas de células gástricas regulam positivamente a expressão de CDX2. Em sentido oposto, a expressão de CDX2 também pode ser reprimida, sendo um dos possíveis candidatos o SOX2. Na verdade, em culturas de células de carcinoma gástrico infetadas por *H. pylori* foi demonstrado que há uma diminuição da atividade de SOX2, com o consequente aumento da atividade da CDX2.

Tendo em conta que a infecção por *H. pylori* é o principal fator desencadeante para o desenvolvimento de metaplasia intestinal no estômago, no presente estudo demonstrou-se pela primeira vez que este micro-organismo afeta a expressão e atividade da via de sinalização da BMP. Na verdade, a ativação desta via de sinalização aumentou a expressão de CDX2 e reduziu a expressão de SOX2 podendo deste modo contribuir para o desenvolvimento da metaplasia intestinal.

Estudo 3 (descrição resumida)

À semelhança do que ocorre em humanos, o *H. pylori* provocou inflamação intensa na mucosa gástrica dos ratinhos infetados, o que se verificou nas vertentes molecular e histológica. A infecção experimental aumentou de modo significativo a expressão de diversas quimiocinas habitualmente envolvidas na gastrite induzida por *H. pylori*, como sejam a CCL20, CCL5, CXCL1, CXCL10, CXCL11 e CCL25. De igual modo verificou-se um aumento significativo da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β nos ratinhos infetados. A infecção por *H. pylori* aumentou também a expressão de MyD88 bem como da grande maioria dos TLRs. O tratamento dos ratinhos infetados aos quais foi administrado curcumina normalizou a expressão de todos estes mediadores da inflamação induzida por este micro-organismo.

Este trabalho demonstrou que a curcumina tem evidentes propriedades anti-inflamatórias ao reduzir a inflamação da mucosa gástrica num modelo experimental de infeção crónica, a nível histológico e molecular.

Estudo 4 (descrição resumida)

A Ciclooxigenase-2 (COX-2) tem sido associada ao aumento da proliferação celular da mucosa gástrica, podendo o incremento descontrolado da sua expressão induzir lesões na mucosa gástrica e conseqüente crescimento tumoral. A infeção por *H. pylori* aumenta a expressão de COX-2, verificando-se a sua regressão para níveis normais, após erradicação deste micro-organismo. No que respeita aos nutracêuticos, o seu efeito na diminuição da COX-2, pode constituir uma mais valia, evitando os potenciais efeitos colaterais adversos dos fármacos habitualmente usados na inibição desta enzima, os AINE`s. Assim, a utilização de nutracêuticos poderá ser considerada uma estratégia promissora, principalmente no âmbito da prevenção secundária.

O nosso trabalho estudou o efeito de um nutracêutico, a curcumina, na expressão de COX-2 e demonstrou que a sua expressão a nível de mRNA e a nível da proteína se encontrava aumentada à 6^a, 18^a e 24^a semanas pós inoculação com *H. pylori*. O tratamento com curcumina reduziu de modo significativo a expressão de COX-2 nos ratinhos infetados em todos os tempos da experiência.

Dos trabalhos por nós efetuados podemos concluir que, o modelo experimental de infeção crónica por *H. pylori* demonstrou ser eficaz e o pioneiro teste respiratório com ¹³C-Ureia um método fidedigno na confirmação da infeção dos ratinhos e também na sua monitorização ao longo de todo o período de experimentação.

Também demonstrámos de um modo pioneiro que a infeção por *H. pylori* afeta a expressão e atividade da via de sinalização do BMP e que a sua ativação aumentou a expressão de CDX2 e reduziu a de SOX2. Este facto pode contribuir definitivamente para o desenvolvimento da metaplasia intestinal.

De igual modo, os nossos trabalhos experimentais, igualmente pioneiros, de demonstração “in vivo” das propriedades anti-inflamatórias da curcumina em

contexto de infecção crónica, evidenciaram que o consumo de polifenóis na dieta poderá constituir uma abordagem terapêutica no controlo dos efeitos deletérios da inflamação gástrica provocada por *H. pylori*.

Com base nos resultados obtidos, podemos especular que a suplementação com curcumina da dieta humana pode constituir uma abordagem possível, no contexto da prevenção secundária de lesões gástricas induzidas por *H. pylori*, em áreas de alta prevalência desta infecção sem os efeitos deletérios dos AINEs.

SUMMARY

Helicobacter pylori (*H. pylori*) gastric infection in humans is one of the most common, but it is only related to pathology in less than 20% of the infected population. Most individuals remain colonized throughout their life because this bacterium is a microorganism highly adapted to the host, managing to outwit its defense mechanisms. The chronicity of the infection as well as the heterogeneity of the virulence of the strains of this microorganism, associated with certain genetic risk factors by the host, make certain individuals particularly susceptible to the development of gastroduodenal pathology. Although there is still a lot to investigate, the risk of developing peptic ulcer disease or even gastric cancer is unquestionably related to the molecular, histological and pathophysiological changes that this bacterium induces in the gastric mucosa.

Infection with *H. pylori* triggers a sequence of changes in the gastric mucosa that begin with superficial gastritis that can progress to chronic gastritis, atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and, finally, gastric carcinoma. Intestinal metaplasia resulting from mucosal aggression by *H. pylori*, which is present in about 30% of infected individuals, can be considered a pre-neoplastic regenerative process that consists of transforming the gastric mucosa into an intestinal phenotype. When present, intestinal metaplasia represents an increased risk of developing gastric cancer.

The chronicity of the infection and its increasing resistance to antimicrobials have been attributed not only to genetic variability, but also to the ability of this microorganism to form biofilms as well as the possibility of this bacterium entering a state of dormancy, or non-replication, as a strategy to overcome the adverse conditions in the environment.

The different anti-*H. pylori* therapeutic regimens that are currently available, have several inherent problems, such as the presence of a high rate of resistance of this bacterium to various drugs in multiple geographic areas, the side effects of therapy and also, not least, difficulty in accessing it by certain population groups due to its high cost.

Thus, new alternative therapies are needed, such as probiotics, peptides, polysaccharides and natural products, functional / nutraceutical foods, namely polyphenols including curcumin, which contribute to the modulation of the inflammatory response and consequently prevent (secondary prevention) the deleterious effects of *H. pylori* in the gastric mucosa.

The objectives of this thesis were:

- 1) Develop an experimental model of chronic infection in the mouse, monitoring its evolution over time, without the need to sacrifice the animals;
- 2) Clarify one of the possible mechanisms that can contribute to the development of intestinal metaplasia in the gastric mucosa;
- 3) Check the inflammatory response induced by *H. pylori* in the gastric mucosa and its possible modulation by the nutraceutical curcumin;
- 4) Demonstrate that curcumin has the ability to inhibit cyclooxygenase-2;

In this context, as a consequence of the activity developed by us, four original studies were elaborated which resulted in the corresponding publications.

Study 1 (short description)

The experimental work of chronic infection with *H. pylori* and monitoring of the infection over time was only possible with the adaptation to the mouse of the ¹³C-urea breath test used in humans. This diagnostic method, developed by us in a pioneering way in the mouse, allowed us to confirm the maintenance of the bacteria in the gastric mucosa at any time during the experiment. This test proved to be quite sensitive (96%) and specific (85.7%), using the PCR technique as a standard, with the added advantage of not having to sacrifice animals throughout the entire experiment. Its development was fundamental for the elaboration of all the works that followed in this thesis.

Study 2 (short description)

The main molecular mediator of the transformation of gastric mucosa into intestinal mucosa is the transcription factor CDX2. Under normal conditions, CDX2 expression is restricted to the intestine, and can be ectopically expressed

in intestinal metaplasia lesions not only in the stomach, but also in the esophagus and gallbladder. Both bone morphogenetic protein (BMP - bone morphogenetic protein) and *H. pylori* infection in gastric cell cultures are known to positively regulate CDX2 expression. Conversely, the expression of CDX2 can also be suppressed, with SOX2 being one of the possible candidates. In fact, in cultures of gastric carcinoma cells infected by *H. pylori* it has been shown that there is a decrease in the activity of SOX2, with the consequent increase in the activity of CDX2.

Considering that *H. pylori* infection is the main triggering factor for the development of intestinal metaplasia in the stomach, in the present study it was demonstrated for the first time that this microorganism affects the expression and activity of the BMP signaling pathway. In fact, the activation of this signaling pathway increased the expression of CDX2 and reduced the expression of SOX2, thus contributing to the development of intestinal metaplasia.

Study 3 (short description)

As it happens in humans, *H. pylori* caused intense inflammation in the gastric mucosa of the infected mice, which was verified in the molecular and histological aspects. The experimental infection significantly increased the expression of several chemokines commonly involved in *H. pylori*-induced gastritis, such as CCL20, CCL5, CXCL1, CXCL10, CXCL11 and CCL25. Likewise, there was a significant increase in the expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the infected mice. *H. pylori* infection also increased MyD88 expression as well as the vast majority of TLRs. The treatment of infected mice administered curcumin normalized the expression of all these mediators of inflammation induced by this microorganism.

This work demonstrated that curcumin has evident anti-inflammatory properties by reducing inflammation of the gastric mucosa in an experimental model of chronic infection, at the histological and molecular level.

Study 4 (short description)

Cyclooxygenase-2 (COX-2) has been associated with increased cell proliferation of the gastric mucosa, and the uncontrolled increase in its expression may induce

lesions in the gastric mucosa and consequent tumor growth. Infection with *H. pylori* increases the expression of COX-2, with a regression to normal levels, after eradication of this microorganism. With regard to nutraceuticals, its effect in reducing COX-2, may constitute an added value, avoiding the potential adverse side effects of the drugs commonly used in the inhibition of this enzyme, the NSAIDs. Thus, the use of nutraceuticals can be considered a promising strategy, especially in the context of secondary prevention.

Our work studied the effect of a nutraceutical, curcumin, on the expression of COX-2 and demonstrated that its expression at the mRNA level and at the protein level was increased at 6, 18 and 24 weeks after inoculation with *H. pylori*. Curcumin treatment significantly reduced the expression of COX-2 in infected mice at all times of the experiment.

From all of our work, we can conclude that the experimental model of chronic infection by *H. pylori* proved to be effective and the pioneering ¹³C-Urea breath test is a reliable method for confirming the infection of the mice and also for monitoring them throughout the trial period.

We also demonstrated in a pioneering way that *H. pylori* infection affects the expression and activity of the BMP signaling pathway and that its activation increased the expression of CDX2 and reduced that of SOX2. This fact can definitely contribute to the development of intestinal metaplasia.

In the same way, our experimental pioneering work, demonstrating “in vivo” the anti-inflammatory properties of curcumin in the context of chronic infection, showed that the consumption of polyphenols in the diet may constitute a therapeutic approach in controlling the deleterious effects of gastric inflammation caused by *H. pylori*.

Based on the results obtained, we can speculate that supplementation with curcumin from the human diet may constitute a possible approach, in the context of the secondary prevention of gastric lesions induced by *H. pylori*, in areas of high prevalence of this infection without the deleterious effects of NSAIDs.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A infecção por *Helicobacter pylori*

2.1.1 Introdução

As primeiras descrições da presença de bactérias de forma espiralada em estômagos humanos datam de 1889. O dogma não fundamentado da impossibilidade de desenvolvimento associada à dificuldade na sua cultura, contribuíram para o facto da bactéria, hoje designada de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), só fosse oficialmente descoberta quase cem anos depois [1]. Em 1982 Barry Marshall e Robin Warren isolaram pela primeira vez esta bactéria espiralada em biópsias gástricas de doentes com gastrite crónica [2], o que levou estes dois investigadores australianos a serem galardoados com o Prémio Nobel da Medicina em 2005 (Fig. 1), pela sua repercussão no âmbito da patologia gastroduodenal [3]. Inicialmente classificada como *Campylobacter pylori*, foi no entanto incluída em 1989 num novo género, *Helicobacter*, e reclassificada de *H. pylori* [4, 5].



Fig. 1 - Barry Marshall e Robin Warren na cerimónia de atribuição do prémio Nobel

Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, de estrutura espiralada, com superfície lisa e extremidades arredondadas, medindo entre 2 e 5 μm de comprimento e 0,5 a 1,0 μm de diâmetro. Possui 2 a 6 flagelos unipolares com comprimento aproximado de 3 μm que lhe conferem mobilidade. É uma bactéria

microaerofílica, com temperatura ideal de crescimento a 37°C, cujo crescimento *in vitro* ocorre na presença de concentrações de oxigénio (5%) e de dióxido de carbono (6-10%) [4].

2.1.2 Epidemiologia e transmissão

Este micro-organismo que infecta cerca de 50% da população mundial, coloniza o estômago de humanos há milhares de anos e a sua presença foi objetivada em múmias colombianas com mais de 1700 anos por Pelayo-Correa [6], mas só nas últimas décadas se conheceu a sua importância na génese da doença ulcerosa péptica e do cancro gástrico.

Apesar da elevada taxa de infeção a nível mundial, a sua prevalência difere entre os vários países e mesmo dentro de grupos de populações. A sua prevalência atinge os 90% em alguns países em desenvolvimento, sendo esta menor nos países desenvolvidos (cerca de 40% na Europa Ocidental) [7-8] (Fig. 2). A infeção adquire-se habitualmente na infância e a colonização permanece durante a vida, mas a grande maioria da população permanece assintomática, desenvolvendo doença apenas uma percentagem diminuta.

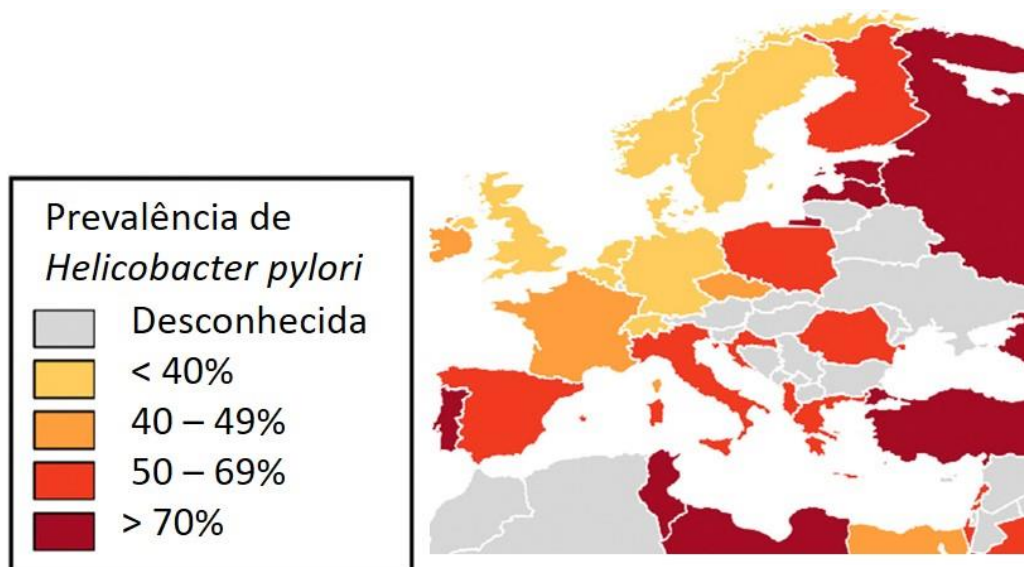


Fig. 2 – Prevalência de *Helicobacter pylori* na Europa (Adaptado de Hooi, JK et al)[8].

O aumento contínuo da prevalência do *H. pylori* com a idade é devida a um efeito de coorte, refletindo a transmissão mais intensa enquanto crianças em indivíduos de coortes com nascimento anterior ao mesmo e não um reflexo da aquisição da infecção ao longo da vida. Um estudo efetuado numa população pediátrica assintomática em Portugal (Lisboa, 2011) mostrou que a prevalência da infecção foi de 31,6% [9].

A transmissão de *H. pylori* pode ocorrer dentro das famílias (por exemplo, de pais para filhos) [10-11], mas também entre pessoas não relacionadas vivendo em proximidade [12-13].

Nos últimos anos, a infecção por *H. pylori* para além da sua implicação na patologia gastroduodenal tem sido associada a outras doenças extra-digestivas, como por exemplo a anemia por deficiência de ferro [14–16], a púrpura trombocitopénica idiopática [17-18], doenças cardiovasculares [19-20], doenças hepatobiliares [21-22] e a diabetes mellitus [23-24].

A associação desta bactéria a doenças extra-gástricas tem sido sustentada por estudos epidemiológicos, no entanto não podemos deixar de a aceitar com alguma reserva, já que na grande maioria destes estudos poderão existir fatores condicionantes de erro. Por este motivo, e de acordo com a última reunião de consenso sobre a infecção por *H. pylori* (Maastricht V/Florence Guidelines) [25], as únicas doenças extra-gástricas em que a infecção por *H. pylori* deve ser identificada e erradicada são a anemia por deficiência de ferro, a púrpura trombocitopénica idiopática e a deficiência de vitamina B12.

2.1.3 Patogénese

Nesta infecção é de salientar um conjunto de interações entre o hospedeiro, a bactéria e o meio ambiente em que esta ocorre. O risco de desenvolver patologia gastroduodenal depende assim de uma grande variedade de fatores. Estes, determinam a capacidade de a bactéria colonizar e persistir no estômago, desencadear uma resposta inflamatória e produzir substâncias tóxicas para a mucosa gástrica.

Embora grande parte dos mecanismos moleculares que contribuem para a colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* permaneçam ainda

desconhecidos, conhecem-se já muitas características da bactéria que contribuem de modo determinante para a sua patogenicidade, tais como, a atividade ureásica, a estrutura flagelar, o ilhéu de patogenicidade cag PAI (Fig. 3) que codifica um sistema de secreção tipo IV (SST4) (Fig. 4), a proteína CagA, a citotoxina vacuolizante VacA, a adesina babA e a protéase HtrA, entre outros [26-29].

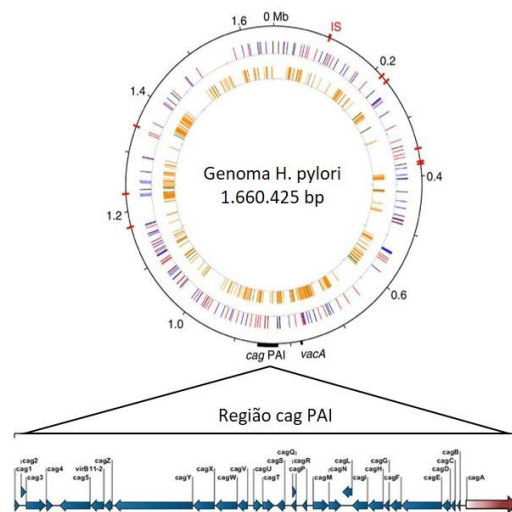


Fig. 3 – Genoma do *H. pylori* e região cag PAI (adaptado de Linz, B et al.)[30].

Como foi referido anteriormente, há diferenças geográficas nos padrões de infeção que podem ser justificadas não só por fatores do próprio hospedeiro, mas também por fatores ambientais.

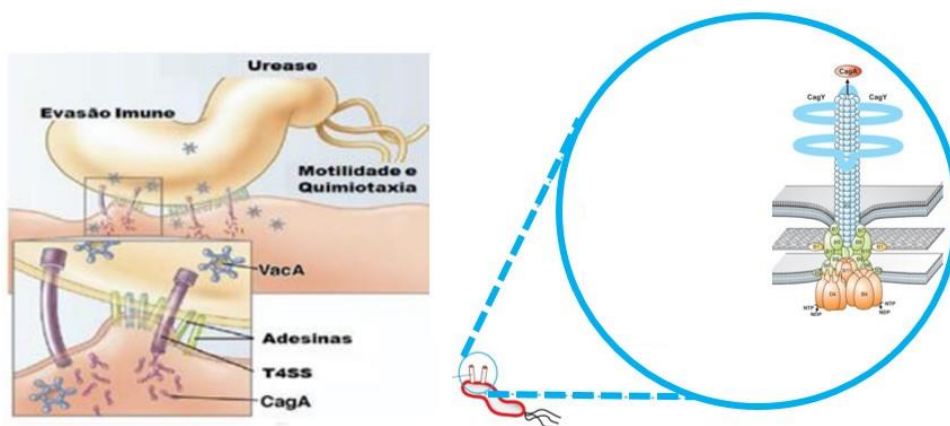


Fig. 4 – Sistema de secreção tipo IV (T4SS) (Adaptado de Amieva e El-Omar 2008)[31].

No respeitante ao hospedeiro, no caso concreto da infeção pelo *H. pylori*, sabe-se que os polimorfismos genéticos de certas proteínas, apesar de não alterarem de modo significativo a função da proteína resultante, podem originar diferenças significativas na quantidade de proteína produzida, modulam a resposta inflamatória, podendo aumentar ou pelo contrário diminuir o grau de inflamação e assim contribuir de modo determinante para os diferentes aspetos clínicos das patologias associadas a esta infeção [32].

Estes polimorfismos, apesar de serem relativamente frequentes, não causam por si só qualquer doença, mas admite-se que possam alterar a suscetibilidade aos agentes ambientais e deste modo atuarem como promotores ou protetores de determinada patologia.

Quanto aos fatores ambientais, o tipo de alimentação, pode exercer um papel protetor no desenvolvimento de lesões a nível gástrico [33], nomeadamente a ingestão de fruta e vegetais frescos. Na verdade, a ingestão de alimentos ricos em vitamina C e betacarotenos, pode proteger o estômago de agressão através da neutralização de radicais livres [34-35]. Pelo contrário, apesar do efeito da ingestão de sal na alimentação ainda não se encontrar completamente esclarecido, sabe-se que o seu consumo excessivo aumenta a replicação celular, o que em presença de carcinogéneos pode favorecer o aparecimento de danos a nível do DNA e as consequentes mutações [36]. Este consumo excessivo aumenta ainda a expressão de outros fatores de virulência da bactéria, nomeadamente a *cagA*, o que demonstra bem o seu papel na presença de estirpes mais virulentas de *H. pylori* [37].

O fumo do tabaco é outro fator ambiental importante como agente promotor de cancro do estômago, tendo um estudo europeu demonstrado que o tabagismo, só por si, é responsável por 17% dos casos de cancro gástrico [38]. De salientar, evidência científica relevante atualmente existente, que sugere um efeito sinérgico entre a infeção por *H. pylori* e o fumo do tabaco [39].

2.1.3.1 Ilhéu de Patogenicidade cag (cag PAI) e CagA (Citotoxina Associada ao Gene A)

O cag PAI é uma região com cerca de 37 kb de DNA cromossômico que codifica um sistema de secreção do tipo IV (cag-T4SS) e também a citotoxina associada ao gene A (cagA) [40-41]. Este sistema de secreção injeta a oncoproteína CagA no citoplasma das células gástricas, o que leva à desfosforilação de proteínas e produz alterações morfológicas a nível celular.

Sabe-se hoje que a virulência deste ilhéu de patogenicidade depende muito da sua integridade, pois as estirpes de *H. pylori* em que este ilhéu está intacto, induzem lesões histológicas de muito maior gravidade [42].

A CagA, depois de ser translocada para a célula hospedeira, atua como uma proteína multifuncional, com capacidade para desencadear não só rearranjos no citoesqueleto como também ativar o fator nuclear kB (NF-kB) e estimular a produção de IL-8. A libertação de IL-8 leva a um recrutamento marcado e à consequente infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, contribuindo diretamente para a intensidade da resposta inflamatória, uma das características principais da infeção por *H. pylori* [43].

A CagA é sem dúvida um dos fatores de virulência do *H. pylori* mais estudados nos últimos anos tendo sido identificada antes de se conhecer o ilhéu de patogenicidade cag PAI. A importância deste fator de virulência fez com que as estirpes de *H. pylori* fossem classificadas como CagA positivas (CagA+) ou negativas (CagA-), de acordo com a presença ou não desta proteína.

Vários estudos têm associado esta proteína CagA ao potencial oncogénico das estirpes de *H. pylori*, pois a infeção de gerbos da Mongólia com uma estirpe CagA+ induziu cancro gástrico nos animais de experiência, o que não se verificou nos animais infetados com o gene CagA mutado [44].

No que respeita ao ser humano, nos países ocidentais as estirpes CagA+ estão mais frequentemente associadas a úlcera gástrica ou a cancro do estômago do que as estirpes CagA- [45-46]. O mesmo não se verifica nos países asiáticos o que evidencia que outros fatores de virulência ou de suscetibilidade genética do hospedeiro possam estar envolvidos [47].

2.1.3.2 Citotoxina vacuolizante (VacA)

A citotoxina VacA é uma exotoxina secretada pelas estirpes de *H. pylori* na forma de um grande polipeptídeo com 140-kDa. A sua denominação está relacionada com sua capacidade de induzir vacuolização celular, resultante da alteração da maturação endossômica [48]. O gene que a codifica está presente em todas as estirpes de *H. pylori* e apresenta diversidade alélica em três regiões principais: a região s (sinal), a região i (intermediária) e a região m (meio). Conseqüentemente, a atividade citotóxica da toxina varia entre as estirpes consoante as diferentes combinações alélicas destas regiões [49].

Podem existir diferentes combinações de dois alelos major de cada região (s1, s2, i1, i2, i3, m1, m2), o que que na prática resulta em toxinas VacA com capacidade distinta de induzir vacuolização nas células epiteliais [50]. Enquanto as estirpes de *H. pylori* vacA s1/m1 são consistentemente vacuolizantes e muitas vezes associadas a cancro gástrico [51-52], as estirpes vacA s2/m2 não são vacuolizantes. Relativamente às estirpes vacA s1/m2 apenas algumas são capazes de induzir vacúolos celulares [53]. Em relação à região i, as estirpes s1/m2 que têm um alelo i1 são vacuolizantes, enquanto que as estirpes s1/m2 que têm um alelo i2 não são vacuolizantes.

A VacA também é capaz de induzir a formação de canais na membrana celular, induzir a libertação do citocromo “c” da mitocôndria e promover a ligação à membrana celular de recetores que ativam uma resposta pró-inflamatória. Estirpes com alelo s1 secretam uma toxina ativa e também estão fortemente associadas a úlceras e a cancro do estômago [53]. As combinações s1/s2 ou genótipos s2 são também encontradas em doentes com cancro gástrico. O subtipo m1 demonstra uma atividade vacuolizante mais forte do que o subtipo m2, e tem sido associado a um risco aumentado de desenvolver lesão epitelial gástrica e cancro gástrico [54]. Após a descrição da região vacA i, também foi demonstrado que a determinante da citotoxicidade, o alelo i1, está associado a adenocarcinoma gástrico [55-56].

Nos países ocidentais, na América Latina, Médio Oriente e África, tem havido muitos relatos de que indivíduos infetados com estirpes de *H. pylori* s1 ou m1 têm risco aumentado de úlcera péptica ou cancro gástrico em comparação com

os infetados com estirpes s2 ou m2 [57]. Além disso, quase todas as estirpes de *H. pylori* positivas para *cagA* são classificadas como s1, enquanto que as estirpes *cagA*-negativas são maioritariamente classificadas como s2/m2 [56]. Em relação à região i, os estudos efetuados até ao momento não conseguiram demonstrar uma associação entre esta região do gene que codifica a citotoxina VacA e o desenvolvimento de doença [58].

Recentemente, através de estudos epidemiológicos moleculares, foram descobertas mais duas regiões não conhecidas anteriormente na VacA, a região da deleção (d1 e d2) e a região c (c1 e c2) [59]. Do mesmo modo que as regiões descritas anteriormente (s, i, m), algumas variantes destas duas novas regiões foram associadas a um risco aumentado de cancro gástrico [60-61]. No entanto, o contributo destas duas regiões descritas recentemente para a funcionalidade da VacA, nomeadamente a formação de vacuolização, ainda não foi demonstrada.

Um estudo recente [62] demonstrou que estirpes com o genótipo *vacA* s1/ s2 têm um papel importante na evolução clínica dos doentes. Segundo este estudo, a presença deste genótipo serviria para identificar os doentes com maior risco de doença gastroduodenal e eventualmente distingui-los daqueles que não necessitariam de tratamento.

A associação de algumas estirpes de *H. pylori* ao cancro do estômago sugere que a identificação do genoma bacteriano seja de extrema importância para identificar as populações em maior risco de desenvolver cancro gástrico [63]. Num futuro próximo, é provável que com este rastreio, apenas as estirpes mais virulentas de *H. pylori*, necessitem ser erradicadas através da utilização de antibióticos, podendo eventualmente as estirpes menos agressivas permanecer no estômago, desde que seja controlada a inflamação com outros produtos, nomeadamente nutracêuticos [64].

No que respeita à eventual relação entre os fatores de virulência do *H. pylori* e a resistência aos antibióticos, é bem evidente que esta última está a aumentar em todo o mundo, enquanto as taxas de erradicação do *H. pylori* estão a diminuir significativamente [63]. Um estudo [62] demonstrou que há uma relação entre as estirpes menos virulentas de *H. pylori* (*cagA* negativo e *vacA* S2) e a resistência

primária à claritromicina. A presença de resistência aumentada aos antibióticos nas estirpes menos virulentas de *H. pylori* abre também um novo caminho a ser explorado numa tentativa de investigar quais os doentes que deveriam ser obrigatoriamente erradicados e com isto diminuir a resistência aos antibióticos e melhorar as taxas de erradicação desta bactéria [64].

2.1.3.3 Urease

A bactéria possui um mecanismo que lhe permite resistir ao meio ácido hostil do estômago, através da adaptação do pH do ambiente periplasmático mediada pela regulação da atividade da enzima urease presente nesta bactéria. A intensa atividade desta enzima serve também de base a alguns métodos para diagnosticar a infeção, como será descrito adiante.

A urease é uma enzima citoplasmática mas também pode ser encontrada na superfície do *H. pylori*. A urease regula o pH intracelular libertando amónia para se ligar aos protões, sendo a regulação do pH extracelular efetuada através da difusão da amónia quer para o periplasma quer para o ambiente envolvente da bactéria [65] (Fig. 5).

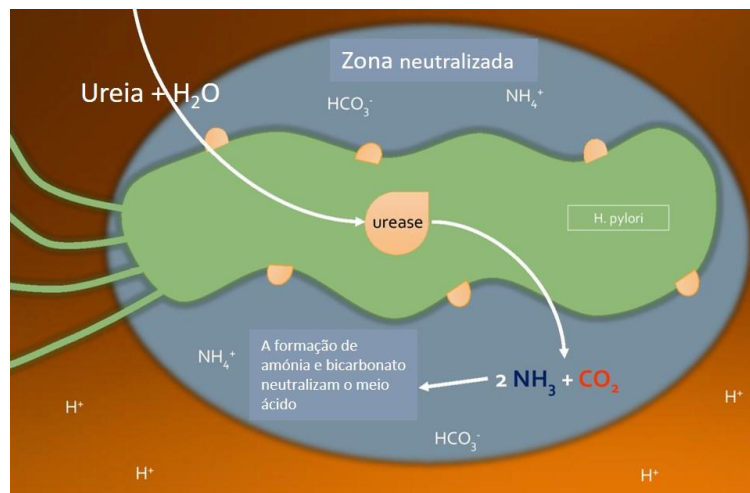


Fig. 5 – Regulação do pH extracelular pela ação da urease

A amónia produzida pela degradação da ureia sob ação da urease provoca danos a nível celular, produz ativação dos fagócitos, induz a produção de

citocinas inflamatórias, destrói as ligações intercelulares (*tight junctions*) das células epiteliais e contribui de igual modo, como acontece com a toxina VacA, para a vacuolização das células epiteliais [66-67].

Apesar de inicialmente se pensar que a urease seria pouco importante após a colonização bacteriana, sabe-se hoje que desempenha um papel determinante na manutenção da infecção [68].

A presença de níquel é fundamental como cofator para o funcionamento da enzima urease e, este facto, tem despertado um enorme interesse nos investigadores numa tentativa de desenvolver meios alternativos à antibioterapia para erradicar o *H. pylori*, nomeadamente dietas pobres em níquel [69]. Por este motivo, o níquel pode ser considerado também um determinante de virulência para o *H. pylori*, pois esta bactéria possui duas enzimas, cujo cofator é o níquel, que são essenciais para a colonização in vivo, [NiFe] hidrogenase e a urease [70]. Devido a estas duas enzimas, a sobrevivência do *H. pylori* depende de um importante suprimento de níquel, implicando um controlo rígido na sua distribuição e armazenamento, revelando bem o importante papel destas duas enzimas [71].

A urease é uma das enzimas mais abundantes neste micro-organismo, o que sugere que as necessidades de níquel são elevadas. O níquel é naturalmente abundante em todos os tipos de alimentos e devido ao facto de não existirem enzimas para as quais o níquel seja um cofator essencial na atividade catalítica, não parece que este seja essencial para seres humanos ou outros organismos vivos superiores e, deste modo, não há "competição" pelo níquel entre o hospedeiro e o *H. pylori* [72].

2.1.3.3 Outros fatores de virulência

Têm sido descritos outros fatores de virulência nos últimos anos, essenciais para a colonização bacteriana, como sejam a GGT, FLOT e a RhpA. O GGT é um fator importante nas fases iniciais da colonização não só pela sua atividade metabólica mas também pelo seu papel defensivo contra o sistema imunitário do hospedeiro [73]. A FLOT é uma proteína da membrana celular que promove a

acumulação de colesterol pelo *H. pylori* e aumenta a indução de IL-8 [74]. Estudos experimentais “in vivo” demonstraram que a ausência desta proteína reduz a colonização num modelo experimental de infecção em animais [74]. Relativamente á RhpA, sabe-se que influencia não só a motilidade do *H. pylori*, como também a adaptação a ambientes de temperatura mais reduzida. Por outro lado, a RphA regula a expressão da RNase J, o que a torna um pivot fundamental no controlo da virulência do *H. pylori* [75].

Para além destes, muitos outros fatores de virulência têm sido descritos, como sejam a catalase, oxidase e mucinase, mas o seu verdadeiro papel na progressão ou gravidade da infecção pelo *H. pylori* permanece ainda desconhecido.

2.1.4 Diagnóstico

Desde a descoberta deste micro-organismo desenvolveram-se vários testes para o seu diagnóstico [76], uns invasivos, em que é necessária a realização de esofagogastroduodenoscopia e outros denominados não invasivos [77], que dispensam a realização deste último exame.

As alterações macroscópicas da mucosa gástrica observadas durante a realização de esofagogastroduodenoscopia convencional não são confiáveis para o diagnóstico da infecção.

Nos últimos anos, a introdução de fontes de luz laser ou de magnificação associada à esofagogastroduodenoscopia tornou possível associar certos padrões macroscópicos da mucosa gástrica a esta infecção [78-80]. No entanto, apesar destes avanços o acesso a estas tecnologias é ainda limitado a alguns centros de investigação e assim, na grande maioria dos casos, torna-se necessário a realização do teste rápido de urease (TRU), ou a utilização de métodos como sejam a histologia ou a cultura a partir de biópsias gástricas para fazer o diagnóstico.

Outras formas de diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* são os métodos não invasivos, como os testes serológicos que compreendem a pesquisa de

anticorpos anti-*H. pylori* em amostras de soro, saliva ou urina, os testes respiratórios com ureia marcada com carbono 13 (isótopo não radioativo) ou com carbono 14 (isótopo radioativo), a pesquisa de antígenos fecais e a utilização de métodos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Teste Rápido de Urease – TRU

Este teste consiste na recolha de uma biópsia da mucosa do antro gástrico (local privilegiado para recolha de amostras para diagnóstico de *H. pylori*) e a colocação num frasco contendo ureia e um indicador de pH. A grande quantidade de enzima urease no micro-organismo leva à hidrólise da ureia em CO₂ e amónia, promovendo o aumento do pH e alterando a cor da solução. Quando ocorre esta mudança de cor na solução, o teste é considerado positivo. Há vários testes rápidos de urease: uns comercializados, outros manufacturados nas próprias unidades de endoscopia (Fig. 6). De acordo com a rapidez com que se verifica a mudança na cor da solução, assim são designados de rápidos ou ultrarrápidos, podendo estes últimos ser lidos entre 1 e 5 minutos. Em caso de positividade, a rapidez com que se verifica a mudança da cor nestes testes depende da sua composição (gel ou suspensão), da densidade bacteriana, do volume da biópsia e também da temperatura. Este método, nomeadamente os testes comercializados apresentam uma sensibilidade e especificidade entre os 90% - 98%.



Fig. 6 – Testes rápidos da urease para diagnóstico da infeção por *H. pylori*.

Em comparação com a histologia e o exame cultural, os testes de urease são muito mais rápidos, de baixo custo e apresentam sensibilidade e especificidade

comparáveis. Quando há necessidade de efetuar esofagogastroduodenoscopia, o TRU é o teste mais utilizado pelos gastroenterologistas para o diagnóstico da presença de *H. pylori* na prática diária. Devido ao seu baixo custo, rapidez no resultado e eficiência, passou a ser usado na rotina das unidades de endoscopia. O nosso grupo de trabalho introduziu em Portugal um teste rápido da urease em 1994 [81]. Este teste começou a ser utilizado inicialmente na unidade de endoscopia do Hospital de Pulido Valente, sendo produzido no Laboratório de Gastroenterologia do próprio serviço. Provou ser sensível e específico e passou a ser usado como método de rotina em todas as esofagogastroduodenoscopias efetuadas naquela unidade, sempre que necessário.

Histologia

Do mesmo modo que o TRU, o exame histológico é realizado através de biópsias gástricas colhidas durante a esofagogastroduodenoscopia. De um modo geral recolhem-se dois ou mais fragmentos da região do corpo e do antro gástrico. A identificação de *H. pylori* pode ser realizada recorrendo a diversas técnicas de colorações histológicas (Giemsa, hematoxilina-eosina ou Warthin-Starry). A sensibilidade deste método é habitualmente cerca de 90%, variando a especificidade entre os 98-100%, dependendo obviamente da experiência do anatomopatologista, do uso recente de antibióticos ou de inibidores da secreção ácida gástrica e até pela variabilidade na recolha das biópsias no estômago. A coloração com hematoxilina-eosina além de identificar o micro-organismo permite informações importantes relativamente ao padrão de inflamação, a presença de atrofia, metaplasia intestinal ou mesmo displasia do epitélio gástrico [82].

Imunohistoquímica

A imunohistoquímica baseia-se na deteção de antígeno por um anticorpo monoclonal ou policlonal, em conjunto com outros processos de coloração [83]. Esta técnica não é habitualmente utilizada por rotina na deteção de *H. pylori* mas sim em trabalhos de investigação. É uma ferramenta poderosa no estudo de

doenças neoplásicas, permitindo a identificação da expressão de certos oncogenes em cortes histológicos. É também muito importante na presença de Linfomas MALT e infecção por *H. pylori*, para verificar a evolução dos mesmos.

Cultura

A cultura de *H. pylori* é um exame excelente porque permite não só a identificação da bactéria, como também a possibilidade de realizar testes de sensibilidade aos antibióticos [84]. A resistência aos antibióticos é crescente e as taxas de erradicação dos diversos esquemas terapêuticos vão diminuindo, o que faz com que este método tenha uma importância cada vez maior, nomeadamente quando falham a primeiras tentativas de erradicação. O elevado custo, as condições exigentes do transporte e o crescimento lento deste micro-organismo faz com que este método, na grande maioria dos casos, seja apenas utilizado na escolha de terapêuticas de resgate.

PCR – Polymerase Chain Reaction

O método de deteção por PCR permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA bacteriano e possui a grande vantagem de poder ser utilizado não só no diagnóstico da infecção por *H. pylori*, como também na pesquisa da suscetibilidade do *H. pylori* aos antibióticos [85]. As amostras a amplificar tanto podem ser fragmentos de biópsias frescas, congeladas ou mesmo fixadas em parafina. Este método permite ainda detetar a presença de *H. pylori* na urina, sangue, fezes ou na saliva. Nos últimos anos a técnica de PCR tem sido muito utilizada na genotipagem das estirpes de *H. pylori*. A grande limitação consiste no elevado custo desta técnica.

Teste respiratório com ureia marcada ^{13/14}C-Ureia (^{13/14}C-UBT)

O teste respiratório com ureia marcada é um teste não invasivo, que se baseia na recolha de amostras de ar expirado, antes e depois da ingestão de uma dose

de ureia marcada com ^{13}C ou com ^{14}C . O teste respiratório com ^{13}C -Ureia encontra-se muito mais difundido na Europa do que o teste com ^{14}C -Ureia, devido aos receios da radiação ionizante. Apesar da dose de radiação ser pequena, como existe um isótopo alternativo igualmente eficaz, não é razoável submeter o doente a uma radiação desnecessária. Aliás, o teste com ^{14}C -Ureia está contraindicado em crianças e em mulheres grávidas.

Os testes respiratórios utilizando ^{13}C são fáceis de executar, com mínimas possibilidades de variações ou erros metodológicos, pelo que são muito sensíveis (95-100%) e específicos (98-100%) para a deteção da infeção por *H. pylori*.

A grande maioria dos testes respiratórios obedece a padrões desenvolvidos pelo *European Standard Method for the Urea Breath Test*, e que sumariamente consiste na ingestão de ácido cítrico (4,2 g de ácido cítrico dissolvidos em 200 ml de H_2O), com o objetivo de provocar atraso no esvaziamento gástrico e aumentar o tempo de contacto da solução de ^{13}C -Ureia com a mucosa gástrica. Cerca de 10 minutos depois é recolhida uma amostra basal de ar expirado. De seguida, ingere-se uma solução contendo 75-100 mg de ^{13}C -Ureia dissolvida em água. Cerca de 30 minutos depois da ingestão da solução de ^{13}C -Ureia, é recolhida outra amostra de ar. Após recolha das amostras, é feita a sua leitura num espectrómetro de massa (Fig. 7) (ou de infravermelhos).



Fig. 7 – Espectrómetro de massa e teste respiratório com ^{13}C -ureia diagnóstico da infeção por *H. pylori*.

O resultado final corresponderá à diferença entre as quantidades de ^{13}C nas amostras basais e posteriores, que se expressa em excesso de $\delta^{13}\text{C}$. O doente é portador de *H. pylori* quando o excesso de átomos de ^{13}C entre a amostra basal e a amostra posterior ($\delta^{13}\text{C}$) for maior que 5‰ (0.0055 átomos em excesso).

À semelhança do que tem sido descrito na literatura [86], verificámos que o tempo ideal de recolha das amostras após a ingestão de ureia é de 30 minutos e que o teste tem uma elevada sensibilidade e especificidade [87].

Além do teste respiratório ^{13}C -Ureia possuir alta fiabilidade para o diagnóstico de infeção por *H. pylori*, é simples, seguro e tem uma excelente tolerância.

Outra das grandes vantagens dos testes respiratórios é a facilidade no manuseamento das amostras de ar expirado, que podem ser enviadas por correio à temperatura ambiente para um laboratório central. A quantidade de átomos de ^{13}C dentro dos tubos, permanece inalterada à temperatura ambiente por um período nunca inferior a 24 meses [88].

Os testes respiratórios com ^{13}C -ureia podem ainda ser utilizados para diagnosticar a infeção gástrica ativa por *H. pylori* em animais de experiência, conforme demonstrado pelo nosso grupo de trabalho de modo pioneiro há mais de 20 anos [89] e também, mais recentemente, no presente trabalho de investigação. Este método de diagnóstico tem elevada sensibilidade e especificidade também nos animais de experiência e permite confirmar a infeção sem sacrificar os animais, permitindo efetuar estudos de infeção crónica por *H. pylori*.

Uma revisão recente sobre métodos não invasivos para diagnosticar a infeção pelo *H. pylori* [90] concluiu que, em doentes sem antecedentes de gastrectomia ou em doentes que não tomaram antibióticos ou inibidores da bomba de prótons, o teste respiratório com ^{13}C -ureia têm uma alta precisão diagnóstica, enquanto que outros métodos não invasivos para diagnosticar a infeção, como sejam a serologia e a determinação dos antígenos fecais, foram menos precisos no diagnóstico.

Apesar dos doentes que realizam terapêutica crónica com inibidores da secreção ácida gástrica poderem apresentar resultados falsos positivos ou negativos no

teste respiratório, um outro estudo mostrou que mesmo nestes doentes, o teste respiratório com ^{13}C -ureia pode ser realizado, sem comprometer a sensibilidade e especificidade, desde que, em vez de uma solução de ácido cítrico como refeição de prova, seja usada uma solução contendo uma mistura de três ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido málico e ácido tartárico) [91]. Esta refeição de prova, tem interesse clínico relevante, nomeadamente para doentes que clinicamente não possam suspender a terapêutica com inibidores da secreção ácida gástrica.

De acordo com recentes recomendações europeias [25], o teste respiratório com ^{13}C -ureia é indicado como o melhor método não invasivo para o diagnóstico da infeção por *H. pylori*.

Serologia

A serologia é um método de diagnóstico não invasivo muito mais útil em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico da infeção ativa pelo *H. pylori* [92]. Os anticorpos usados requerem a validação e padronização locais. Os testes serológicos nunca devem ser utilizados no controle de tratamento da bactéria, porque após a erradicação do *H. pylori*, os títulos de anticorpos vão descendo lentamente, podendo estar positivos mesmo ao fim de 6-7 anos.

Pesquisa de antigenos fecais

De um modo geral, o teste para pesquisa de antigenos fecais de *H. pylori* utiliza-se, ou quando o teste respiratório com ^{13}C -Ureia não está disponível ou em crianças com idade inferior a 3 anos, nas quais a recolha das amostras de ar expirado é habitualmente difícil de executar. Além de ser não invasivo, apresenta como vantagens a não exigência de equipamentos dispendiosos, a rapidez e a relativa simplicidade da técnica. As amostras de fezes podem ser recolhidas no domicílio e armazenadas no frigorífico entre 2°C e 8°C durante três dias. Estas amostras podem também ser armazenadas a -20°C por tempo indefinido. A

sensibilidade e especificidade do teste de antígenos fecais é de 95% e 96% respetivamente, utilizando anticorpos mono ou policlonais [93].

2.1.5 Tratamento atual da infeção por *Helicobacter pylori*

A terapêutica de erradicação sofreu diversas alterações desde a sua descoberta. A terapêutica dupla (com amoxicilina e um inibidor da bomba de prótons) desde cedo se revelou ineficaz no alcance de taxas de erradicação aceitáveis.

A terapêutica tripla com inibidor da bomba de prótons (IBP), claritromicina e amoxicilina ou metronidazol, foi proposta na primeira reunião de consenso do *European Helicobacter pylori Study Group (EHPSG)* no ano de 1997 em Maastricht para tratar a infeção por *H. pylori*, tornando-se um esquema padrão recomendado durante algum tempo [94].

À semelhança do que aconteceu com a terapêutica dupla, estudos recentes revelam a perda de eficácia desta associação, atingindo-se a erradicação de *H. pylori* em apenas cerca de 70% dos doentes infetados, valor este considerado insuficiente no tratamento de uma doença infecciosa. De salientar ainda que, em alguns países europeus, os níveis de sucesso das terapêuticas de erradicação são extremamente baixos, variando entre 25 e 60% [95].

Até aos dias de hoje não há um esquema terapêutico ideal, isto é, com eficácia elevada (taxas de erradicação superiores a 90%), boa tolerância, excelente adesão por parte dos doentes e simultaneamente económico.

Um dos principais fatores que tem contribuído para o insucesso dos diferentes esquemas terapêuticos é seguramente o aumento da resistência aos antimicrobianos, nomeadamente a resistência à claritromicina e ao metronidazol. A sua má utilização nas últimas décadas, contribuiu seguramente para a elevada resistência a estes dois agentes.

Em 10 anos (entre 1998 e 2008), a resistência na Europa à claritromicina quase duplicou, passou de 9% para 17,5% [96]. Em Portugal, a resistência primária em crianças ultrapassa já os 30%, sendo uma das mais altas do continente europeu [97].

A resistência ao metronidazol, identificada maioritariamente no sexo feminino e provavelmente associada à sua utilização no tratamento das infeções ginecológicas [98], apesar de elevada (34%), tem permanecido relativamente constante nos últimos anos, sem grandes diferenças na distribuição regional a nível do continente europeu. A resistência a este fármaco tem sido ultrapassada quer à custa do aumento das doses utilizadas quer do prolongamento do tratamento ou mesmo através da utilização concomitante de bismuto nos esquemas terapêuticos [99].

A elevada resistência aos antimicrobianos não se limita à claritromicina e ao metronidazol, pois vários estudos provaram que a resistência às quinolonas também aumentou de modo significativo, nomeadamente em Portugal, onde esta resistência poderá rapidamente igualar a verificada com a claritromicina [100]. A resistência primária às quinolonas é significativa na Europa, nomeadamente em Portugal onde um estudo mostrou que a resistência era de 20,9% na década de 90 [101].

Ainda neste contexto, é de salientar que a levofloxacina tem sido sugerida como alternativa à claritromicina nos esquemas de erradicação de *H. pylori*. A inclusão da levofloxacina nestes regimes terapêuticos encontra-se também muito condicionada pelos níveis de resistência relativamente a esta quinolona. A taxa de resistência em Portugal é muito elevada (18%) [102], sendo superior à média do continente europeu, onde a taxa de resistência a este fármaco é de 14.1% [96].

A diminuição da eficácia dos diferentes esquemas de erradicação deve-se também a outros fatores, igualmente importantes, e que devem ser tidos em consideração aquando da escolha da terapêutica, como sejam:

- a) adesão ao tratamento;
- b) acidez gástrica elevada;
- c) elevada carga bacteriana;
- d) tipo de estirpe.

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) colocou a bactéria *H. pylori* na lista das 16 mais resistentes a antibióticos, representando portanto a

maior ameaça à saúde humana [103]. Este anúncio faz parte de uma campanha da O.M.S. para melhorar a prescrição e reduzir o uso indevido de antibióticos, e coincidiu com a publicação das diretrizes de consenso de *H. pylori* que tentam superar a falência crescente dos tratamentos de erradicação devido à resistência antimicrobiana [25].

Atualmente a terapêutica é norteada, em grande parte, pelo conhecimento da taxa de resistência na população alvo, tendo em atenção as recomendações da última reunião de consenso sobre erradicação do *H. pylori* (Maastricht V/Florence Consensus Report) [25].

Numa tentativa de superar as baixas taxas de erradicação pela terapêutica tripla, outros esquemas foram entretanto desenvolvidos: sequencial, concomitante, híbrida (sequencial-concomitante)[25,104].

A terapêutica quadrupla clássica com bismuto é não só uma das terapêuticas mais antigas mas também uma das mais eficazes.

As grandes desvantagens deste esquema terapêutico são os efeitos colaterais e a complexidade que podem complicar a adesão à terapêutica. Adicionalmente, o acesso, quer ao bismuto quer à tetraciclina, não são universais. No nosso país, por exemplo, o bismuto só se encontra disponível em associação fixa com metronidazol e tetraciclina. Esta associação fixa, apesar de eficaz, tem um custo elevado e não é de um modo geral bem tolerada.

Assim, é inegável que apesar de todos os avanços na descoberta de novos tratamentos para a erradicação do *H. pylori*, ressalta a importância de desenvolver terapêuticas alternativas, nomeadamente através da utilização de nutracêuticos para o combate aos efeitos nefastos desta infeção.

2.2 Modelos experimentais de infeção por *Helicobacter pylori*

Nas últimas décadas foram desenvolvidos modelos animais no sentido de estudar não só a patogénese da infeção por *H. pylori*, mas também a eficácia de alguns esquemas terapêuticos, onde se inclui a tentativa de desenvolver uma vacina [105]. Apesar de toda a controvérsia recente acerca da utilização de

animais na investigação biomédica, a experimentação animal é fundamental para a compreensão da saúde em humanos.

Até ao momento atual não existe um modelo de infeção aplicável a todas as situações, pois cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, sendo a escolha baseada na acessibilidade a determinado animal, no custo, na existência de reagentes para essa espécie e também ao grau de conhecimento do genoma do hospedeiro. Deste modo, o modelo de infeção no ratinho, tem sido, nos dias de hoje, considerado de entre os disponíveis, o mais conveniente e adequado [106]. No entanto, muitas vezes não é possível infetar o ratinho com uma determinada bactéria patogénica para os humanos (*ex*^o: *H. pylori*), e neste caso a alternativa consiste em escolher outro animal de experiência ou encontrar uma bactéria alternativa que infete o ratinho e mimetize a infeção no humano [107]. Por este motivo, durante alguns anos, após a descoberta de *H. pylori*, vários modelos experimentais de infeção foram realizados com bactérias alternativas que simulassem a infeção por *H. pylori* e deste modo utilizaram-se estirpes de *Helicobacter felis* no ratinho e de *Helicobacter mustelae* em furões.

2.2.1 Porco

A utilização de leitões “*Germ-free*” foram dos primeiros animais a serem usados como modelo experimental bem-sucedido de infeção por *H. pylori* [108]. Este modelo foi especialmente útil na definição da importância dos fatores críticos da colonização, como sejam a urease e o ilhéu de patogenicidade *cag-A* [109]. A utilização deste modelo tem dois grandes inconvenientes, o custo dos animais e o facto de requerer instalações adequadas [110].

2.1.2 Primatas não humanos

Os primatas são excelentes candidatos para investigação da infeção por *H. pylori*. A sua similaridade fisiológica e anatómica com o homem, permite inclusive a realização de esofagogastroduodenoscopia para recolha de biópsias, sem necessidade de eutanásia. Os chimpanzés e os macacos rhesus têm sido utilizados em numerosos projetos de investigação.

Os macacos rhesus são por vezes naturalmente colonizados por *H. pylori* e por isso identificados como um modelo ideal para mimetizar a infeção por *H. pylori* em humanos [111]. Este modelo tem sido utilizado no contexto de estudos para o desenvolvimento de vacinas [112-115]. A limitação da sua utilização relaciona-se com a dimensão dos animais, o custo e a inexistência de biotérios licenciados em número suficiente.

2.2.3 Cães e Gatos

O modelo de infeção com cães beagle foi descrito, quer para a infeção aguda quer crónica, com *H. pylori* [116]. A infeção aguda provoca sintomas (vómitos e diarreia) que desaparecem espontaneamente e uma gastrite aguda, com recrutamento precoce de neutrófilos, a que se segue o aparecimento de erosões superficiais, folículos linfóides e gastrite crónica.

Relativamente aos gatos domésticos foram descritas por vários autores, infeções naturais e experimentais com *H. pylori* [117-120].

A sua infeção natural prolongada representa um modelo adequado para o estudo da patogénese desta bactéria devido às semelhanças não só da resposta imunitária, mas também da resposta da mucosa gástrica à agressão crónica [121].

Os modelos acima descritos, à semelhança do modelo com primatas não humanos, permitem a monitorização das consequências da infeção pelo *H. pylori* através de esofagogastroduodenoscopia, desde que se tenha em consideração que, por vezes, pode haver colonização com outras espécies de *Helicobacter*, quer em gatos quer em cães [120-121].

2.2.4 Ratos

Os modelos de infeção descritos anteriormente, têm o inconveniente de serem dispendiosos, pouco acessíveis e dificultarem a utilização de um grande número de animais em simultâneo. Assim, os modelos de infeção experimental que utilizam animais de pequenas dimensões, fáceis de manusear e pouco

dispendiosos, como os que utilizam ratos, têm despertado especial interesse dos investigadores.

As primeiras tentativas de infecção de ratos com *H. pylori* foram efetuadas por Cantorna em 1990, mas foram desmotivadoras [122], devido à obtenção de uma taxa de infecção muito baixa.

No entanto foi possível colonizar o estômago (antro) de ratos com uma bactéria denominada *Helicobacter felis* (*H. Felis*), com um genoma semelhante em 96% ao de *H. pylori*, que já tinha sido previamente identificada no estômago de gatos e posteriormente de cães [123]. Neste contexto, Lee publica uma série de experiências em ratinhos “*germ free*”, que mostraram que este micro-organismo produzia uma gastrite crónica ativa, com algumas das características da inflamação induzida por *H. pylori* em humanos [124]. Este modelo rapidamente se difundiu, tendo tido numerosas aplicações quer na avaliação de terapêuticas de erradicação [125], quer em estudos sobre a fisiopatologia da inflamação [126].

A popularidade e utilidade deste modelo, não demoveu os investigadores de conceber um modelo de rato infetado por *H. pylori*. Um dos primeiros avanços data de 1991 [127], em que a utilização de biópsias frescas, e não de bactérias em cultura, permitiu a colonização do estômago de ratos atímicos, ainda que por um período breve. Marchetti [128] deu um enorme contributo para a resolução deste problema ao promover diversas inovações no modelo que desenvolveu: a) Utilização de estirpes CagA e VacA: a colonização dos ratinhos parecia facilitada com o recurso a estirpes expressando os antigénios CagA e VacA, da mesma forma que estas seriam as únicas capazes de induzir gastrite (por comparação com estirpes que não expressavam estes antigénios); b) Passagem seriada de estirpes no animal: a capacidade de uma determinada estirpe colonizar o estômago de rato parecia aumentar com a sua passagem seriada no animal. Esta inovação foi muito importante, uma vez que as infeções eram inicialmente produzidas através da homogeneização de biópsias gástricas humanas ou então através da utilização sequencial de vários inócuos, o que parecia favorecer a colonização. Aparentemente, os ratos infetados com este modelo, mantinham a infecção pelo menos durante 8 semanas.

Também McColm [129] propôs um modelo de infecção em animais “*germ-free*”, com estirpes CagA e VacA positivas. Obteve uma colonização durante pelo menos 5 meses com a possibilidade de isolar o *H. pylori* de várias partes do estômago de ratinho, em especial da região do cárdia, mas infelizmente, pouca ou nenhuma presença de gastrite era evidente neste modelo.

Brzozowski [130] desenvolveu também um modelo em ratos SPF-BALB/c infetados com uma estirpe de *H. pylori* selecionada de um doente com úlcera gástrica, expressando os antigénios CagA e VacA, que foi administrada ao ratinho em três etapas (dias 1, 3 e 5). No entanto neste modelo não são fornecidos detalhes sobre a natureza das lesões histológicas, nem sobre a duração da infecção.

Dos modelos acima descritos, foi possível tirar algumas conclusões: a) A grande importância da concentração de bactérias existentes no inócuo (nunca menos de 10^6 /ml) e do tempo que decorria entre a recolha da estirpe da cultura e a inoculação; b) A superioridade do potencial infeccioso das culturas com 24h comparativamente às 48 e 72 horas; c) O papel fundamental do volume administrado, que deve estar adaptado à capacidade máxima do estômago, aumentando a superfície de contacto com a mucosa. De registar também outro dado fornecido por Wang [131], que evidenciou a importância da dieta na recuperação e cultura do *H. pylori* nos ratinhos.

Apesar dos avanços acima mencionados, havia a noção que os modelos disponíveis eram insuficientes, não preenchendo os critérios de Lausanne que pretendiam uniformizar e aproximar da infecção humana um modelo de rato infetado por *H. pylori* [132]. Assim, este devia preencher os seguintes critérios: 1) alto grau de colonização e presença de gastrite crónica ativa no antro e corpo; 2) número elevado de bactérias por grama de tecido gástrico; 3) presença de adesão bacteriana ao epitélio; 4) período prolongado de colonização, e 5) manutenção da capacidade colonizadora da bactéria após múltiplas passagens “*in vitro*”.

Em 1997, Lee [133] apresentou um excelente projeto de investigação em que resolveu todos estes problemas. Iniciou os seus trabalhos selecionando 15 estirpes a partir de doentes que frequentaram uma unidade de endoscopia.

Todas as estirpes eram CagA e VacA positivas por PCR (*polymerase chain reaction*) e diferentes entre si por RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*). A cada 10 ratinhos SPF-BALB/c administrou um homogeneizado de biópsia, seguido de 3 inócuos durante um período de 5 dias (dia 1, 3 e 5). Ao mesmo tempo recorreu a misturas de homogeneizados das mesmas biópsias em ratinhos da estirpe C57BL/6. Nas primeiras experiências foi possível isolar uma estirpe capaz de colonizar os ratinhos, a qual foi recuperada e reinoculada em diversas passagens. Por outro lado, nas segundas experiências foi também obtida apenas uma estirpe com capacidade colonizadora, a qual foi igualmente submetida a várias passagens pelo estômago de ratinhos. Os estudos de biologia molecular demonstraram tratar-se de uma mesma estirpe, obtida a partir de uma emigrante grega de 42 anos, com história de úlcera duodenal. Após várias passagens, esta estirpe foi administrada a várias estirpes de ratos: SPF-BALB/c, C57BL/6 e SJL, para avaliação da colonização e de alterações histopatológicas aos 3, 5, 6 e 8 meses. Seis meses depois da inoculação, foi possível obter uma gastrite crônica do corpo e do antro cuja gravidade aumentou com o tempo de colonização, obtendo-se mesmo áreas de atrofia, que eram sobreponíveis nas estirpes BALB/c e C57BL/6, embora nos primeiros 6 meses estes últimos apresentassem uma gastrite mais intensa, em especial na zona de transição corpo-antro. Em ambas estirpes foi possível obter, por cultura, valores elevados de *H. pylori*, em especial para os ratinhos da estirpe C57BL/6. Os estudos de microscopia eletrônica mostraram pedestais de adesão das bactérias à superfície do epitélio, de uma forma idêntica aos existentes em humanos.

Lee designou esta estirpe bacteriana por *Sydney strain* (SS1), estabelecendo um modelo definitivo, dando um passo gigantesco na evolução da investigação nesta área. Igualmente disponibilizou a estirpe a vários grupos de trabalho, que a partir desse momento difundiram o modelo de infecção.

Também no Japão, um grupo de investigadores, utilizando um outro roedor (gerbo da Mongólia), conseguiu produzir úlceras gástricas e metaplasia intestinal nesta espécie de animais infetados por *H. pylori* [134].

Ressalta dos vários modelos de infecção, desde o recurso ao *H. felis* até à utilização da “*Sydney strain*”, a inexistência de 100% de infecção nos animais

submetidos apenas a uma inoculação de bactérias. Foi este facto que determinou a inoculação múltipla e sequencial com estirpes de *H. pylori* nos estudos iniciais de Adrian Lee [133] e que tem sido seguida até aos dias de hoje, nos múltiplos estudos de infeção de ratinhos com estirpes deste micro-organismo [135-136].

Deste modo, no modelo experimental do presente trabalho, foram também utilizadas três inoculações sucessivas.

De realçar que, na grande maioria dos estudos efetuados com ratinhos infetados com *H. pylori*, só o sacrifício do animal permitiu a identificação da infeção, sendo de salientar ainda que em alguns casos a recuperação da estirpe sob a forma de cultura e a sua visualização histológica, se revestiu de marcadas dificuldades. Também, estudos que têm por objetivo analisar terapêuticas de erradicação, implicam invariavelmente o sacrifício do animal para avaliar a eficácia do tratamento.

Do acima descrito deduz-se a necessidade de estabelecer um modelo de infeção crónica que permita detetar com grande margem de segurança a existência de infeção sem o recurso à morte dos animais.

2.3 Nutracêuticos – aspetos gerais

A sociedade moderna é cada vez mais complexa e competitiva, modificando os padrões de vida das populações. O chamado “stress” da vida quotidiana e também o tipo de alimentação (cada vez mais processada) tem aumentado a prevalência de certas doenças, nomeadamente a diabetes mellitus e as doenças cardio e cerebrovasculares [137].

De salientar que a preocupação pela possível relação entre os alimentos ingeridos e algumas doenças já era referida por Hipócrates no ano 400 a.C., quando postulou "Que teu alimento seja teu remédio". Passados mais de 2000 anos, este postulado continua a ser atual, chamando à atenção que existe uma relação evidente entre a alimentação e o estado de saúde [138].

De referir também que, a baixa incidência de algumas patologias (doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes mellitus etc.) em certos grupos populacionais, nomeadamente nos esquimós, chamou a atenção para o eventual efeito preventivo da dieta, baseada em peixes e produtos do mar ricos em ácidos gordos polinsaturados das famílias ómega 3 e 6 [139]. De igual modo, na população francesa, o consumo de vinho tinto, rico em grande quantidade de compostos fenólicos, tem sido responsabilizado pela baixa incidência de doenças cardio e cerebrovasculares apesar do consumo elevado de gorduras na dieta. Estudos epidemiológicos mostram também que nas populações orientais, onde o consumo de soja (rica em fitoestrogénios) e o elevado consumo de fruta e verduras, têm contribuído para uma redução significativa na incidência não só das doenças cardiovasculares como também do cancro da mama [140-141].

Na verdade, sabe-se hoje que a mortalidade associada a doenças cardiovasculares, cancro e acidente vascular cerebral, entre outras, pode ser minimizada através de hábitos alimentares saudáveis, em que os alimentos funcionais e os nutracêuticos têm um papel determinante [142].

Os alimentos funcionais e os nutracêuticos têm sido considerados sinónimos. No entanto, os primeiros devem estar na forma de alimentos correntes, serem consumidos como parte da dieta e produzir benefícios específicos na saúde, nomeadamente a redução do risco de diversas doenças e a manutenção do bem-estar físico e mental. As substâncias biologicamente ativas, encontradas nos alimentos funcionais, podem ser classificadas em diversos grupos, tais como: probióticos e pré-bióticos, alimentos sulfurados e nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, ácidos gordos polinsaturados e fibras [143].

Quanto ao termo Nutracêutico, resultante da junção de “Nutriente” + “Farmacêutico”, foi introduzido pela *The Foundation for Innovation in Medicine – FIM* em 1989 [143]. Os nutracêuticos, alguns dos quais produzidos através de métodos de fermentação com a utilização de microrganismos considerados seguros (GRAS - *Generally Recognized as Safe*), podem incluir fibras dietéticas, ácidos gordos polinsaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas e outros antioxidantes (glutathiona, selénio) [144, 145]. Os nutracêuticos incluem, não só nutrientes isolados (suplementos dietéticos na

forma de cápsulas), mas também os que fazem parte dos produtos derivados de plantas e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas [146-147]. De entre os mais comercializados atualmente, incluem-se vegetais como o ginseng, o ginkgo biloba e a echinacea [148].

2.3.1 Nutracêuticos e sistema imunitário

Os seres humanos estão expostos diariamente a agentes patogénicos com efeitos deletérios para a saúde. O sistema imunitário consiste numa complexa rede integrada de células, tecidos, órgãos e mediadores solúveis, responsáveis pela defesa do organismo contra qualquer agressão que ameace a sua integridade. Uma das suas principais características é a capacidade de distinguir de entre as células e tecidos do organismo as componentes que não lhe pertencem (moléculas ou micro-organismos do meio ambiente).

A resposta imune é classificada tradicionalmente em dois subtipos: inata e adaptativa.

O sistema imunitário inato constitui a primeira linha de defesa. No entanto, este tipo de resposta é incompleto e não possui memória de longo prazo [149-150]. Fazem parte deste sistema, não só todo o tipo de barreiras (químicas e físicas), mas também as células fagocíticas (monócitos, macrófagos e neutrófilos), as mais abundantes do sistema imunitário, o sistema do complemento e várias classes de recetores utilizados por células inatas. Destacam-se os recetores *toll-like* (TLRs) que fazem parte de uma família de recetores mais extensa, conhecida como reconhecimento de padrões família (PPPs), capaz de detetar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como componentes da parede celular de bactérias ou fungos (lipopolissacaridos, péptidos bacterianos e β -glucanos) [151]. De um modo geral, os TLRs e os PPPs permitem distinguir as células ou tecidos do próprio organismo das células estranhas.

Este tipo de imunidade, de um modo geral, não sofre alteração qualitativa e/ou quantitativa estando presente em todos os indivíduos, mesmo sem terem tido contacto prévio com agentes agressores ou imunogénicos.

No que respeita à imunidade adaptativa, define-se como sendo de resposta específica e diversa ao nível do reconhecimento do agente agressor, com memória e autolimitada [152]. Depende da ativação de células especializadas, como os linfócitos e as moléculas solúveis que por eles são produzidas, como os anticorpos e as citocinas especializadas [153]. Os linfócitos B e T constituem o segundo tipo de células mais abundantes do sistema imunitário, e são importantes não só na resposta imune normal a infeções e tumores, mas também na mediação da rejeição de transplantes bem como na autoimunidade [150]. Os linfócitos ativados proliferam e diferenciam-se de um modo exponencial: assim, as células B transformam-se em plasmócitos, que produzem e libertam milhares de anticorpos na corrente sanguínea, enquanto que as células T se diferenciam em diferentes subconjuntos com diversas especializações.

Assim os sistemas imunitários inato e adaptativo, apesar das suas diferenças e especificidades, funcionam de modo complementar e sincronizado [154]. O sistema imune inato reconhece a infeção e “alerta” o sistema imune adaptativo através da apresentação do antigénio, cuja responsabilidade pertence às proteínas do complexo major de histocompatibilidade (MHC). As células inatas libertam também outros mediadores químicos, como citocinas e quimiocinas, que ativam o sistema imune adaptativo. É muito importante realçar a existência de linfócitos B e T especializados, conhecidos como células reguladoras, uma vez que não só iniciam a resposta imune, uma vez reconhecida a agressão, mas também podem controlá-la, evitando assim uma resposta excessiva do sistema imunitário [155-156].

A sua desregulação pode ser responsável por uma multiplicidade de alterações patológicas, como sejam, por exemplo, a alergia, as doenças autoimunes e a SIDA [157-158]. De salientar, que atualmente, os dados epidemiológicos evidenciam um aumento significativo na prevalência das doenças do sistema imunitário [159].

Este facto despertou o interesse da comunidade científica, o que levou ao desenvolvimento de uma classe particular de moléculas, designadas de imunomoduladoras, capazes de regular a resposta imunitária em doenças mediadas pelo sistema imunitário.

Neste contexto, alguns alimentos funcionais/nutracêuticos pela sua acessibilidade, baixo custo e boa tolerabilidade, podem representar uma abordagem terapêutica inovadora. Na verdade, extratos de plantas, como sejam os flavonoides, alcaloides e polissacáridos, provaram modular a resposta do sistema imunitário e, deste modo, poderem eventualmente ser usados com objetivos terapêuticos [160-161].

Nos últimos anos um grande número de estudos demonstrou os efeitos benéficos para a saúde de vários alimentos funcionais, nomeadamente alguns polifenóis na dieta [162-163]. Os seus mecanismos de ação não estão ainda completamente esclarecidos, no entanto sabe-se que abrangem uma ampla variedade de processos biológicos, incluindo ativação de vias de sinalização, expressão génica, proliferação celular, e diferenciação e preservação da integridade mitocondrial [164]. Na verdade, os polifenóis, cujos metabolitos são os antioxidantes mais abundantes da dieta humana, constituindo um excelente exemplo de moléculas imunomoduladoras, incluem a curcumina, derivado da curcuma longa.

A curcumina, enquanto alimento funcional ou sob a forma de nutracêutico, tem um efeito direto no sistema imunitário (inato e adaptativo), aumentando a celularidade da medula óssea e o número de leucócitos circulantes [165]. De igual modo modula a multiplicação e a resposta de vários tipos de células do sistema imunitário, como sejam os linfócitos T e B, os macrófagos, os neutrófilos, as células exterminadoras naturais (*NK Cells - natural killer cells*) e também as células dendríticas [166]. Como será descrito adiante com maior detalhe, a curcumina bloqueia ainda a expressão de diversas interleucinas induzidas pelo LPS (lipossacarido) nas células dendríticas, tais como a IL-12, IL-1 β , IL-6 e o TNF α (Fig. 8).

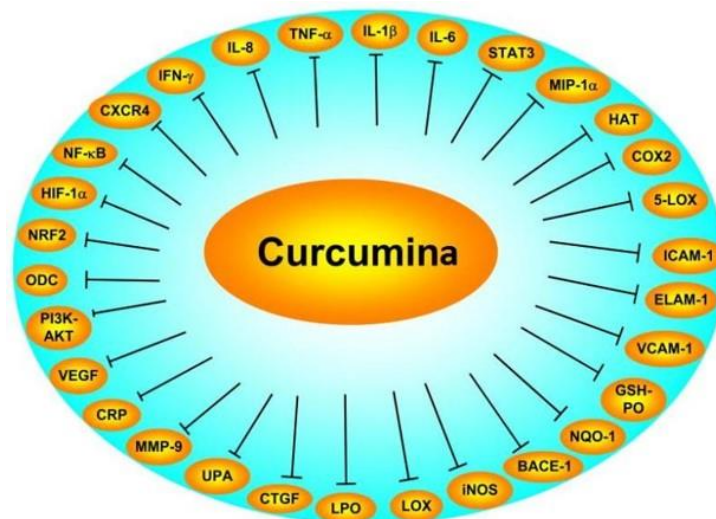


Fig. 8 – Vias de sinalização inibidas pela curcumina (adaptado de Yadav VS)[161]

Para além da curcumina influenciar a resposta do sistema imune inato através de MAMPs (*Microbe Associated Molecular Patterns*), vários estudos sugerem que as propriedades anti-inflamatórias, de quimioprevenção, bem como outros efeitos benéficos da curcumina podem também ser devidos à modulação dos TLR's, quando ativados por moléculas endógenas ou em contexto de infeção crónica [167-169].

Este efeito imunomodulador da curcumina poderá ter implicações importantes no âmbito do tratamento de doenças infecciosas ou não, que têm como denominador comum a inflamação crónica, devido ao seu uso disseminado na alimentação corrente, como alimento funcional, em diversas zonas do globo [170].

Assim, as características acima mencionadas da curcumina, (conhecido como antisséptico desde há longa data) [171], demonstram uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos antimicrobiano, antioxidante, anti tumoral e anti-inflamatório [172], num contexto de baixo custo, pelo que têm despertado enorme interesse da comunidade científica nas últimas décadas. Este facto, justificou a opção por este componente, sob a forma de nutracêutico, nos trabalhos de investigação da presente dissertação.

2.3.2 Nutracêuticos e *Helicobacter pylori*

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial depende da medicina tradicional (principalmente de plantas medicinais) para suas necessidades básicas de saúde [173]. Isso significa que, apenas 20% depende da medicina moderna (compostos majoritariamente sintetizados ou semi-sintetizados).

De salientar que, até 25% dos fármacos modernos é de origem vegetal, 11% dos medicamentos essenciais e básicos é produzido a partir de plantas e 60% dos citostáticos e antibióticos derivam de produtos naturais [174]. Atualmente a medicina tradicional, nomeadamente através da utilização de plantas e dos seus derivados é reconhecida não só nos países em desenvolvimento, mas também nos países industrialmente desenvolvidos.

Numa altura em que a resistência aos antibióticos se encontra em franco crescimento, os produtos naturais, especificamente aqueles que são de origem vegetal, são fontes potenciais para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes eficazes contra infeções [175]. Na verdade, devido ao constante surgimento de micro-organismos resistentes a quase todos os antibióticos convencionais, têm motivado as empresas farmacêuticas a mudar sua estratégia e a desenvolver novas drogas antimicrobianas a partir de plantas medicinais [176].

Embora os antibióticos sintéticos sejam os antimicrobianos dominantes, nas últimas décadas, a incidência de doenças infecciosas aumentou drasticamente, nomeadamente as de origem zoonótica (propagação entre animais e humanos), entre os quais se inclui a infeção por *H. pylori* [177].

Existem inúmeras publicações científicas em todo o mundo que descrevem especificamente a atividade antimicrobiana de plantas e seus derivados contra este micro-organismo. Uma pesquisa realizada na base de dados PubMed com os termos “planta e *Helicobacter*” entre janeiro de 1990 e janeiro de 2020, lista 952 artigos, incluindo extratos vegetais, compostos de plantas e produtos vegetais processados. Um dos primeiros artigos evidenciando o efeito anti-*H. pylori* data de 1991 [178] e desde então, vários artigos sobre este tema têm sido publicados em diversas populações [179-188]. Como já foi previamente

mencionado, nos últimos anos a resistência aos antimicrobianos aumentou drasticamente, ao mesmo tempo que se prevê uma redução na descoberta de novos antibióticos eficazes [189]. A bactéria *H. pylori*, à semelhança do que acontece com outros micro-organismos, para além de desenvolver com facilidade resistência aos antibióticos, apresenta uma dificuldade adicional no que respeita à sua erradicação pelo facto do seu padrão de sensibilidade “*in vitro*” diferir do “*in vivo*” devido a condições específicas nas células da mucosa gástrica [190]. De referir também que este agente bacteriano apresenta uma frequência de mutações muito superior à observada em qualquer outra bactéria [191].

Desde a descoberta deste micro-organismo que se sabe que antibióticos como a amoxicilina, a claritromicina e o tinidazol são considerados fármacos eficazes na sua erradicação [190]. No entanto, como já referido anteriormente, o *H. pylori* é capaz de resistir à antibioterapia, pelo que mesmo com a utilização de novas estratégias, entretanto desenvolvidas, nomeadamente as terapêuticas triplas ou quádruplas, baseadas na combinação de antibióticos, subcitrato de bismuto e inibidores da bomba de prótons, a erradicação é obtida em apenas 80% dos doentes, sendo por vezes também possível o risco de recidiva/infeção [192].

É neste contexto de redução da eficácia das terapêuticas convencionais pelo rápido surgimento de novas estirpes resistentes de *H. pylori*, que os nutracêuticos podem ser uma boa fonte alternativa isoladamente ou em associação com os esquemas terapêuticos mais recentes.

2.3.3 O Nutracêutico Curcumina

A curcumina, derivada de uma planta, tem sido usado no tratamento de várias doenças devido à sua eficácia, acessibilidade e ser fonte rica de antioxidantes [193-194]. É um pigmento amarelo amplamente difundido como especiaria, especialmente na Índia e na China, sendo o principal componente polifenólico obtido a partir do rizoma da *Curcuma longa* (Fig. 9). Os diversos estudos de toxicidade efetuados em humanos mostraram que é bastante seguro, mesmo em altas doses (até 12 g/dia) [195-196].



Fig. 9 – Curcuma longa e curcumina obtida do rizoma

Quimicamente é um diferoloylmetano (Fig. 10) isolado pela primeira vez há mais de 200 anos por dois cientistas alemães (Vogel e Pelletier), mas os primeiros dados sobre a sua atividade biológica antibacteriana só foram publicados na revista Nature em 1949 [197].



Fig. 10 – Estrutura química da curcumina

A sua eficácia tem sido demonstrada clinicamente e as suas propriedades antioxidantes desempenham um papel importante no manejo das doenças inflamatórias crónicas [198]. Na verdade, diversos estudos têm comprovado o seu potencial terapêutico como antifúngico, antiviral, antioxidante e anti-inflamatório [199-202].

O mecanismo exato através do qual exerce o seu efeito anti-inflamatório ainda não se encontra completamente esclarecido, mas pensa-se que desempenha este efeito através da supressão de várias vias de sinalização celular e da

inibição de enzimas como sejam a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a 5-lipooxigenase [203].

De um modo particular a modulação dos níveis de citocinas pela curcumina tem sido relacionada com a inibição da via de sinalização do fator nuclear NF- κ B (Fig. 11) [204].

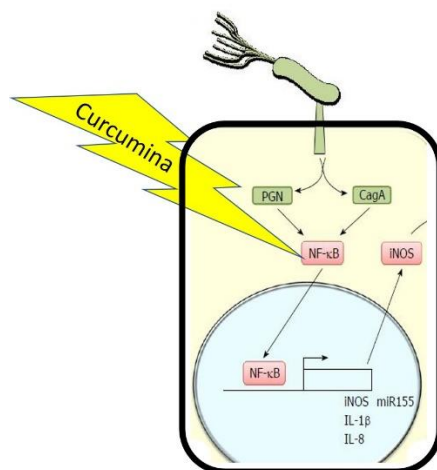


Fig. 11 - Inibição da via de sinalização do fator nuclear NF- κ B pela curcumina

Esta via desempenha um papel chave na inflamação pois este fator demonstrou controlar não só a expressão de mediadores inflamatórios como sejam a COX-2, a sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) e interleucinas, mas também regular a expressão de mais de 400 genes envolvidos na inflamação e outras doenças crónicas [203].

A indução do fator nuclear NF- κ B depende também de outros fatores, nomeadamente da ativação dos TLR's (*toll-like receptors*), particularmente do TLR4 (Fig. 12), seguramente o recetor mais bem estudado da família dos TLR's e que desempenha um papel crucial na regulação do sistema imunitário. A sua ativação induz o recrutamento do MyD88 (fator de diferenciação mielóide) que por sua vez induz ativação do NF- κ B, resultando na modulação do processo inflamatório [205]. O reconhecimento do TLR4 como agente fundamental na ativação do NF- κ B e a consequente regulação do sistema imunitário, fez com que os agonistas dos recetores de TL4 tenham sido

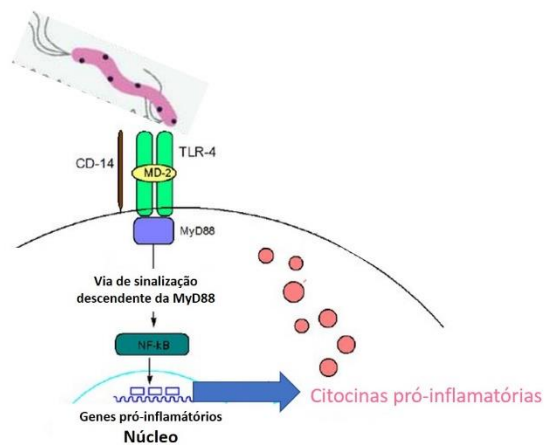


Fig. 12 – Ativação do TLR4 e via descendente da MyD88

aprovados como adjuvantes de vacinas [206]. Neste âmbito facilitam a expansão de células T, aumentam a produção de anticorpos e induzem respostas de memória específicas do antígeno administrado [206].

Nos contextos pré-clínico e clínico, a eficácia da curcumina já foi comprovada na prevenção e tratamento de várias doenças humanas [207].

A sua administração em doentes infetados por *H. pylori*, pode ter dois potenciais objetivos: 1) utilização como adjuvante das terapêuticas clássicas, melhorando as taxas de erradicação [208]; 2) utilização como agente redutor da inflamação, nomeadamente através da inibição da via de sinalização do NF-κB, de modo a impedir a progressão para formas mais graves de lesões a nível da mucosa gástrica [209], isto é, atuando a curcumina como agente de prevenção secundária nos doentes em que não haja indicação formal para a erradicação desta bactéria.

No respeitante à segurança da sua utilização como alimento funcional na dieta, pode referir-se que tem um histórico de segurança estabelecido desde há longa data, pois a curcumina e seus derivados (curcuminóides) foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos da América do Norte e reconhecidos como geralmente seguros [210]. A sua tolerabilidade e perfil de segurança têm sido demonstrados em diversos ensaios clínicos, mesmo com doses diárias que variam entre 4 e 12 g [211,212]. Apesar da segurança estar

bem estabelecida, têm sido atribuídos à curcumina alguns efeitos colaterais em indivíduos saudáveis que receberam doses supra-terapêuticas de curcumina (até 12 g diários), tais como diarreia, cefaleias, erupção cutânea e fezes amarelas [213].

Assim, de acordo com o comitê de peritos em aditivos alimentares das Nações Unidas, da Organização Mundial da Saúde (JECFA) e também da Agência Europeia da Segurança Alimentar (EFSA) a dose ingerida diária de curcumina em humanos deve ser < 3 mg/kg de peso corporal [214].

De referir também que a ingestão de curcumina pode interferir com a eficácia de outros fármacos, nomeadamente antidiabéticos orais e antiagregantes plaquetários [215 - 216], pelo que este fato deve ser tido em conta quando a sua administração a doentes polimedicados.

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 Estabelecimento de um modelo experimental de infecção crónica no ratinho pelo *H. pylori*, estável ao longo do tempo, de modo a permitir a verificação do efeito da bactéria na mucosa gástrica, monitorizando a infecção sem necessidade de efetuar eutanásia (Publicação 1);

3.2 Avaliação do efeito da infecção crónica por *H. pylori* na via de sinalização BMP (*bone morphogenetic protein*) e a sua relação com a expressão de CDX2 e de SOX2 (Publicação 2);

3.3 Demonstração da atividade anti-inflamatória da curcumina na mucosa gástrica de ratinhos infetados cronicamente por *H. pylori* (Publicação 3);

3.4 Avaliação do efeito da curcumina na expressão de COX-2 na mucosa gástrica de ratinhos com infecção crónica por *H. pylori* (Publicação 4).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para atingir os objectivos propostos, realizou-se um estudo em duas fases distintas.

A primeira fase consistiu no desenvolvimento de um modelo experimental de infeção crónica por *H. pylori*. Na segunda fase, verificaram-se as consequências desta infeção crónica e o potencial efeito anti-inflamatório do nutracêutico curcumina.

Estirpe de *H. pylori* e condições de crescimento

A estirpe usada neste estudo foi a de *Sydney* (SS1) [133]. A estirpe foi cultivada em meio agar seletivo para *H. pylori* (agar de Wilgren-Chalgren suplementado com sangue de cavalo defibrinado a 10%, vancomicina (10 mg/L), cefsulodina (2 mg/L), lactato de trimetoprim (5 mg/ L), e fungizona (1 mg/L) (todos da Biogerm, Maia, Portugal) e incubada a 37°C durante 24 horas sob condições microaeróbicas. As colónias foram testadas para urease, catalase e oxidase e foram monitorizadas através de microscopia, com coloração de Gram.

Condições dos Animais e Dieta

Ratinhos C57BL/6 foram mantidos no biotério do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e alojados em gaiolas esterilizadas e ventiladas. Foram alimentados com dieta para roedores 2018S (laboratórios de Harlan, Castellar, Espanha). A água foi fornecida *ad libitum* em garrafas individuais esterilizadas.

Todos os ratinhos tiveram um período de 14 dias de adaptação ao biotério antes do início da experimentação. O estudo foi revisto e aprovado pela Direção geral de Veterinária e todos os procedimentos com animais estavam em conformidade com as normas de utilização de animais de laboratório.

Inoculações

Foram usados ratinhos C57BL / 6 com 8 semanas de idade. Os ratinhos infetados, foram inoculados com 0,1 ml de uma suspensão contendo 10^8 colónias/ml de *H. pylori* (SS1) através de entubação oro-gástrica com uma cânula metálica de 20G de diâmetro (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, EUA). Os ratinhos de controlo foram inoculados com 0,1 ml de uma solução salina.

Teste respiratório com ^{13}C -ureia

O ^{13}C -UBT foi efetuado após um período de 14 horas de jejum. Durante este período, os ratinhos apenas tiveram acesso a água e foram mantidos longe de alimentos ou fezes.

A solução de ureia foi preparada diluindo 100 mg de ^{13}C -ureia e 4,3 g de ácido cítrico em 100 ml de solução salina isotónica. Uma dose de 300 μg de ^{13}C -ureia em 300 μL de solução salina foi administrada a cada ratinho por via oro-gástrica.

De seguida, foram mantidos durante 15 minutos dentro uma seringa aberta de 50 ml. Após este período, a seringa foi fechada durante 1 minuto e coletados 10 ml de ar da seringa num tubo evacuado usando uma agulha. Do mesmo modo foram recolhidas amostras de ar antes da administração da solução de ureia.

A determinação de $^{13}\text{CO}_2$ das amostras foi realizada através de um espectrómetro de massa de relação isotópica ABCA 20-20 (Sercon, Cheshire, Reino Unido). O enriquecimento isotópico das amostras ($\delta^{13}\text{CO}_2$) foi expresso como partes por mil (‰) em relação ao PDB (*Pee Dee Belemnite*).

Imunohistoquímica

Em cada ratinho, metade do estômago desde a porção terminal do esófago até ao duodeno, foi processada para estudo imunohistoquímico. Esta porção do estômago foi fixada em formol tamponado e incluída em parafina. Seguidamente, foram efetuados cortes com 3 μm de espessura e montados em lâminas adesivadas. Após tempo de estufa de uma hora a 65°C , as secções foram desparafinadas, rehidratadas e efetuada a recuperação antigénica.

Recuperação (20 minutos, 94°C) com o EnVision™ Flex Solução de recuperação HIGH pH (50X) (Dako, Glostrup, Dinamarca refª K 8000) em um módulo de pré-tratamento PT Llink (Dako, Glostrup, Dinamarca refª PT10130). A peroxidase endógena foi bloqueada com 2% H₂O₂ em metanol absoluto durante 10 minutos.

A imunohistoquímica foi realizada pelo método da peroxidase indireta. O anticorpo policlonal primário anti-*Helicobacter pylori* (Dako B0471) (diluição de 1-100) foi incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente. A detecção de polímero anti-coelho marcado com HRP (Dako K4010) sistema de coloração foi usado à temperatura ambiente durante 30 minutos e DAB (3,3'-diaminobenzidina) para visualização. As seções foram contrastadas com a coloração de Hematoxilina de Mayer. Foi usado um controlo positivo apropriado e para o controlo negativo, durante a coloração foi omitido o anticorpo primário.

PCR

Neste trabalho foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real, considerada como técnica padrão. Esta técnica incluiu a amplificação de um fragmento de 267 pares de bases gene codificante do RNAr 23S de *H. pylori*, acoplado a uma detecção simultânea do produto por hibridização com sonda e análise de curva de fusão. O DNA foi extraído de uma amostra correspondente a metade do estômago do ratinho, usando um DNA QIAamp mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante. Foi usado um termociclador Light-Cycler® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A PCR e hibridização foram realizadas em capilares de vidro com um volume de 20 µL contendo 3 µL de DNA molde, 1,6 µL de MgCl₂ (25 mmol/L), 0,4 µL de primários sense e anti-sense (20 µmol/L cada), 0,2 µL de sensor e sondas de ancoragem (20 µmol/L cada) e 2 µL de FastStart DNA Master Sondas de Hibridização (Roche Diagnostics). Amplificação por PCR compreendeu um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguidos por 50 ciclos de amplificação (com uma taxa de transição de temperatura de 20°C por segundo) consistindo de 95°C por 0 segundo, ligação a 60°C para 10 segundos e extensão a 72 °C por 17 segundos. Após a amplificação, foi realizado um passo de fusão,

consistindo de 95°C por 0 segundos e arrefecimento a 45°C para 30 segundos (com uma taxa de transição de temperatura de 20°C por segundo) e, finalmente, um aumento lento da temperatura a 85°C a uma taxa de 0,1°C por segundo com aquisição de declínio de fluorescência.

5. ARTIGOS

5.1 **Role of ^{13}C -Urea Breath Test in Experimental Model of *Helicobacter pylori* Infection in Mice**
Helicobacter 2011;16: 320–326

Role of ^{13}C -Urea Breath Test in Experimental Model of *Helicobacter pylori* Infection in Mice

António Mário Santos,* Teresa Lopes,* Mónica Oleastro,† Paula Chaves,‡ Rita Cordeiro,† Maria Ferreira,† Teresa Pereira,‡ Jorge Machado† and António Sousa Guerreiro*

*CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, †Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, ‡Instituto Português de Oncologia Dr. Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

Keywords

Helicobacter pylori, ^{13}C -urea breath test, mouse model.

Reprint requests to: António Mário Santos, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, no. 130, 1169-056 Lisboa, Portugal.
E-mail: antonio.santos@hsmarta.min-saude.pt

Abstract

Background: Animal models have been widely used to study *Helicobacter pylori* infection. Evaluation of *H. pylori* infection status following experimental inoculation of mice usually requires euthanasia. The ^{13}C -urea breath test (^{13}C -UBT) is both sensitive and specific for detection of *H. pylori* in humans. Thus, it would be very useful to have such a test with the same accuracy for the follow-up of this infection in animal models of gastric infection. Accordingly, the purpose of this study was to develop and evaluate a ^{13}C -UBT method for following the course of *H. pylori* infection in a mouse model.

Material and Methods: A total of 50 female C57BL/6 mice were gavaged three times with either 10^8 colony-forming units of *H. pylori* ($n = 29$) or saline solution only ($n = 21$). After 2 months of infection, mice were fasted for 14 hours and ^{13}C -UBT was performed using 300 μg of ^{13}C -urea. The mice were killed, and the stomach was removed and processed for immunohistochemistry and PCR.

Results: The optimal time for breath sample collection in mice was found to be 15 minutes. The ^{13}C -UBT cutoff was set at 3.0‰ δPDB . Using PCR as the gold standard, the sensitivity of ^{13}C -UBT and immunohistochemistry was 96.6 and 72.4%, respectively, while the specificity was 85.7 and 95.2%, respectively.

Conclusions: ^{13}C -UBT was shown to be a reliable method for the detection of *H. pylori* infection in C57BL/6 mice and was even more accurate than immunohistochemistry. The use of ^{13}C -UBT in the mouse model of *H. pylori* infection can be very useful to detect the bacterium without the need to kill the animals in long-term time course studies.

Helicobacter pylori is a gram-negative spiral bacterium discovered by Warren and Marshall in 1980 [1] that colonizes the stomachs of more than half of the world population [2]. *H. pylori* infection represents a major risk factor for peptic ulcer disease [3–5], carcinoma of the stomach and MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma [6–9], and the bacterium was classified as a class I carcinogen in 1994 by the World Health Organization [10]. As many of the mechanisms of *H. pylori*-associated gastric carcinogenesis are still poorly understood [11], it is very important to increase our knowledge concerning this infection. For that purpose, as well as to evaluate new therapeutical approaches, long-term course infection using experimental animal

models can be of great usefulness. Besides several attempts to find an ideal animal model of infection, very few animal species can be persistently colonized following experimental inoculation with *H. pylori* [12–14]. The mouse model has been widely used, as it has a large number of advantages because mice are inexpensive and there are transgenic and knockout mice with resulting pathologies similar to those of *H. pylori*-infected humans [12,14]. However, the evaluation of persistence of *H. pylori* infection following experimental inoculation of mice usually requires euthanasia of the animals and subsequent removal of gastric samples for immunohistochemistry and culture. Until now, the only way of monitoring the infection in live animals was to

perform PCR on mice feces throughout the experiment duration, which represents an expensive and time-consuming task [15]. To overcome this problem, we developed a non-invasive method to detect the presence of the infection in mice based on the ¹³C-urea breath test (¹³C-UBT) used in humans [16]. The ¹³C-UBT is a non-invasive and very accurate method of diagnosing *H. pylori* active infection in humans. It is not usually performed on mice because of a certain lack of specificity due to the difficulty of completely fasting the animals [17,18]. The goal of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of a ¹³C-UBT-based detection method for monitoring *H. pylori* infection in the mouse model, eliminating the need of euthanasia.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

The *H. pylori* strain used in this study was Sydney strain 1 (SS1) [12]. The strain was cultured on *H. pylori* selective agar (Wilkins–Chalgren agar supplemented with 10% defibrinated horse blood, vancomycin (10 mg/L), cefsulodin (2 mg/L), trimethoprim lactate (5 mg/L), and fungizone (1 mg/L) (all from Biogerm, Maia, Portugal) and incubated at 37 °C for 24 hours under microaerobic conditions. Colonies were tested for urease, catalase, and oxidase activities and monitored microscopically, including a Gram stain.

Animal Housing and Diet

Mice were maintained in the Portuguese National Institute of Health animal facility, in a specific pathogen-free animal care holding room. The animals were housed in sterilized ventilated cages and were fed with an autoclavable rodent pellet 2018S diet (Harlan Laboratories, Castellar, Spain). Water was provided *ad libitum* in sterilized individual water bottles. Upon arrival, the mice were acclimated for a minimum of 14 days prior to being used in the experiments. Mice were identified by ear tags. This study was reviewed and approved by the National Animal Care Committee of the Direcção Geral de Veterinária. All procedures with animals were in compliance with the Care and Use of Laboratory Animals.

Animal Inoculations

A total of 50 *Helicobacter* and pathogen-free female C57BL/6 8-week-old mice were used in compliance with guidelines and a protocol approved by the Animal Care and Use Committee of the Direcção Geral de Veterinária. Using a 20-gauge ballpoint metal feeding

tube (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA), 29 mice were inoculated intragastrically with 0.1 mL of *H. pylori* SS1 cell suspension containing 10⁸ colony-forming units/mL on three alternate days. Twenty-one control mice were inoculated with saline solution.

Determination of *H. pylori* Status

After 8 weeks, mice were tested for the presence of *H. pylori* by ¹³C-UBT and by immunohistochemistry and PCR after euthanasia.

At the time of killing, the animals were subjected to fasting for 14 hours and euthanized by cervical dislocation. The stomach was harvested and dissected along the greater curvature. Half of the stomach was used for immunohistochemistry and the other half for PCR analysis. Immediately prior to killing, a modified ¹³C-UBT was performed on all mice.

¹³C-Urea Breath Test

The ¹³C-UBT was performed on the mice after a 14-hours fasting. During the fasting period, the mice only had access to water and were kept away from food and feces by covering the cage floor with a net.

The urea solution was prepared by diluting 100 mg of ¹³C-urea and 4.3 g of citrate adjuvant in 100 mL of isotonic saline. A 300 µg dose of ¹³C-urea in 300 µL of saline was administered to each mouse by intragastric gavage. The mice were then kept for 15 minutes inside an open 50-mL syringe. After that time, the syringe was closed for 1 minute, and 10 mL of the air inside the syringe was collected into an evacuated exetainer using a needle (Fig. 1).

Basal breath samples were collected in evacuated exetainers before ¹³C-urea gavage. The determination of ¹³CO₂ content of samples was performed with an ABCA 20-20 isotope-ratio mass spectrometer (Sercon, Cheshire, UK). Isotope enrichment (δ¹³CO₂) was expressed as parts per thousand relative to PDB (Pee Dee Belemnite).

Immunohistochemistry

For each mouse, half of the stomach was totally processed for immunohistochemistry study to observe the



Figure 1 Fifty milliliter syringe collection of mouse breath.

mucosa from the distal esophagus to the duodenum. Two-micrometer-thick sections were cut from the buffered formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks and mounted onto Superfrost plus slides (EMS, PA, USA). After baking in an oven, the sections were dewaxed, rehydrated, and subjected to epitope antigen retrieval (20 minutes, 94 °C) with Envision TM Flex Target Retrieval Solution High pH (50×) (Dako, Glostrup, Denmark) in a PTlink pre-treatment module (Dako). Endogenous peroxidase was blocked with 2% H₂O₂ in absolute methanol for 10 minutes.

Immunostaining was performed by the peroxidase indirect polymer method. Primary polyclonal rabbit anti-*Helicobacter pylori* (Dako) (1/100 dilution) was incubated for 30 minutes at room temperature. The HRP labeled anti-rabbit polymer (Dako) detection staining system was used at room temperature for 30 minutes and DAB (3,3'-diaminobenzidine) for visualization. Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. An appropriate positive control was used. For the negative control, a primary antibody was omitted during the staining.

PCR

A previously described real-time PCR assay [19] was used as the gold standard technique. It included amplification of a 267-bp fragment of the *H. pylori* 23S rRNA gene coupled with a simultaneous detection of the product by probe hybridization and melting curve analysis. DNA was extracted from a sample corresponding to half of the mouse stomach using a QIAamp DNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Then, using the Light-Cycler[®] thermocycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), the PCR and hybridization were carried out in glass capillaries in a volume of 20 µL containing 3 µL of template DNA, 1.6 µL of MgCl₂ (25 mmol/L), 0.4 µL of forward and reverse primers (20 µmol/L each), 0.2 µL of sensor and anchor probes (20 µmol/L each), and 2 µL of FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics). PCR amplification comprised an initial denaturation cycle at 95 °C for 10 minutes, followed by 50 amplification cycles (with a temperature transition rate of 20 °C per second) consisting of 95 °C for 0 second, annealing at 60 °C for 10 seconds, and extension at 72 °C for 17 seconds. After amplification, a melting step was performed, consisting of 95 °C for 0 seconds, cooling to 45 °C for 30 seconds (with a temperature transition rate of 20 °C per second), and finally a slow rise in the temperature to 85 °C at a rate of 0.1 °C per second with continuous acquisition of fluorescence decline.

Results

To determine the ideal fasting time for ¹³C-UBT, 21 mice were maintained under diet and coprophagy restriction, and a ¹³C-UBT was performed every 2 hours, up to 22 hours. The best fasting time result in the C57BL/6 mice was 14 hours (Fig. 2). Fasting mice is always a challenge because of their intense coprophagy habit. Several hours after removing their food, mice will eat almost anything they can reach, including feces, fur, or small residue from their diet, and these have been confounding factors described by other authors [17] that could affect the ¹³C-UBT performance. To clarify this issue, those products were incubated with the same amount of ¹³C-urea used to perform the ¹³C-UBT in mice. The excess δ¹³CO₂ generated over 30 minutes was recovered, and the results were plotted on graphs (Fig. 3). The mean excess of δ¹³CO₂ generated by incubation with feces increased with time and was as high as 2400 δPDB (Fig. 3A) at 30 minutes. The incubation with food and mouse fur also resulted in an excess of generated δ¹³CO₂ capable of confounding the ¹³C-UBT results, however, to a much lower extent (Fig. 3B,C). These results highlight the importance of a careful fasting, avoiding by all means the possibility of the animal's access to any kind of diet, feces, or fur. Although diet and fur produced a much lower excess of ¹³C in solution with ¹³C-urea, they can nevertheless be confounding factors because of the low ¹³C-UBT cutoff value established.

To determine the best time point for breath collection of the ¹³C-UBT, six *H. pylori*-infected and six non-infected mice were randomly selected and 300 µg of ¹³C-urea was given per mouse. The mouse breath

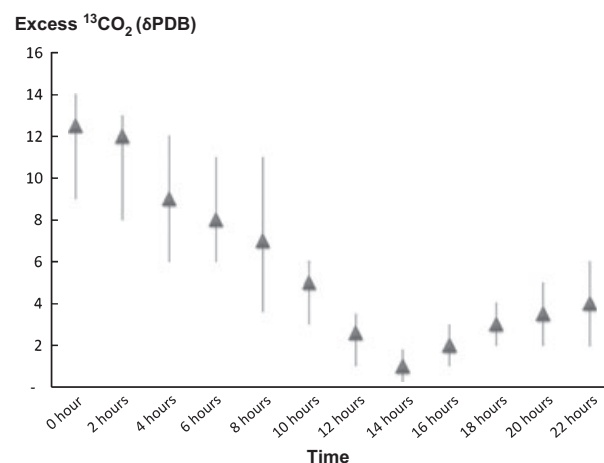


Figure 2 Effect of fasting time on excess δ¹³CO₂ values on *Helicobacter pylori*-negative mice.

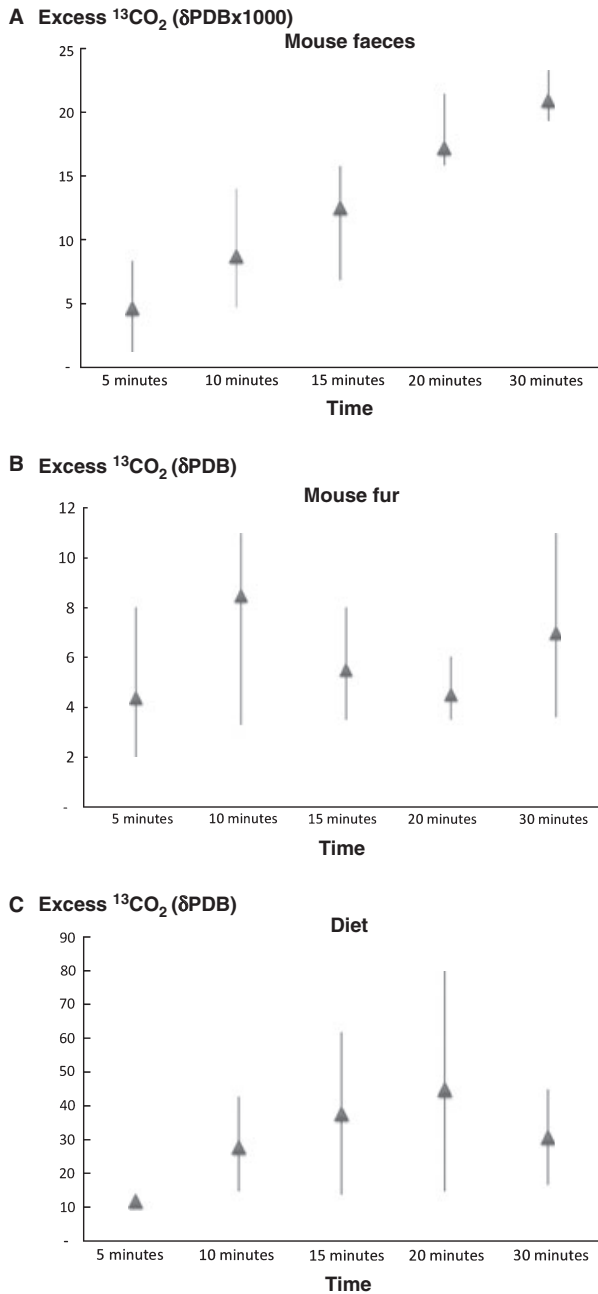


Figure 3 Excess of ^{13}C produced by incubation of mouse faeces (A), diet (B), and mouse fur (C) in a solution containing ^{13}C -urea.

samples were then collected at six time points, corresponding to 0, 5, 15, 25, 60, and 120 minutes. The 15-minutes time point offered the best result for *H. pylori*-positive mice in which the maximum value for ^{13}C production was observed ($\approx 25\%$ δPDB) (Fig. 4). For all of the *H. pylori*-negative mice, the amount of generated excess of $\delta^{13}\text{CO}_2$ was low (between 1 and 2% δPDB) for the entire 120 minutes tested (Fig. 5).

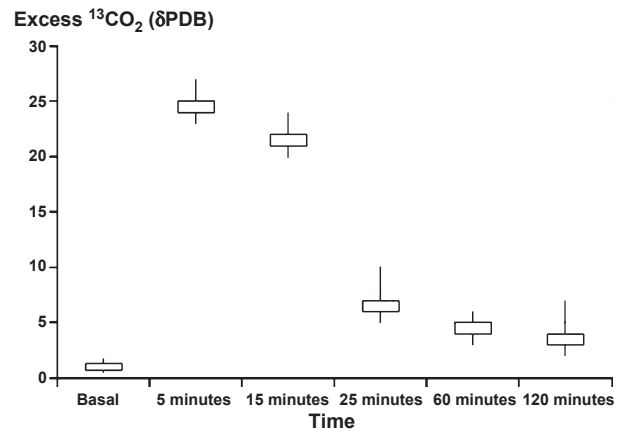


Figure 4 Maximum excess of ^{13}C production in *Helicobacter pylori*-infected mice and best time for breath collection (15 minutes). Values correspond to the maximum excess mean of ^{13}C production obtained for six mice, on three different days.

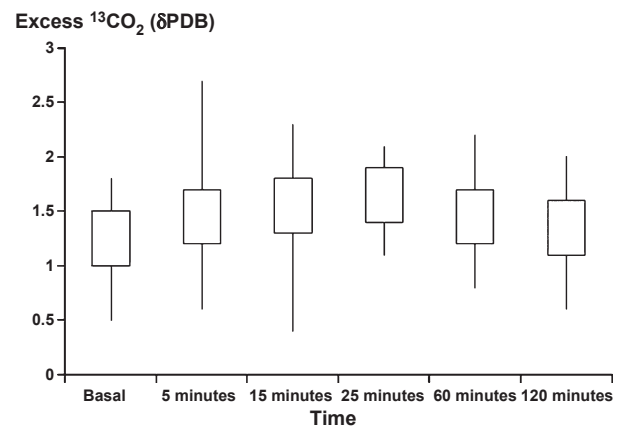


Figure 5 Excess of $^{13}\text{CO}_2$ production in *Helicobacter pylori*-negative mice. Values correspond to the maximum excess mean of ^{13}C production obtained for six mice, on three different days. The arrows indicate bacteria.

To determine the cutoff point, 29 *H. pylori*-infected and 21 non-infected mice were tested with the ^{13}C -UBT. The mean cumulative $^{13}\text{CO}_2$ from the *H. pylori*-infected mice was 10.2% δPDB , which was significantly higher than that obtained from *H. pylori*-negative mice (2.5% δPDB) ($p < .01$, *t*-test). Moreover, the amount of generated excess of $\delta^{13}\text{CO}_2$ was always below the cutoff point at the time of air collection (15 minutes) (Fig. 5). According to these results, the best cutoff point for the ^{13}C -UBT in C57BL/6 mouse was established at 3.0% δPDB (Fig. 6). An important difference between the quantity of ^{13}C detected in *H. pylori*-infected mice in Fig. 4 (assay for determination of the best time for breath collection) compared to that

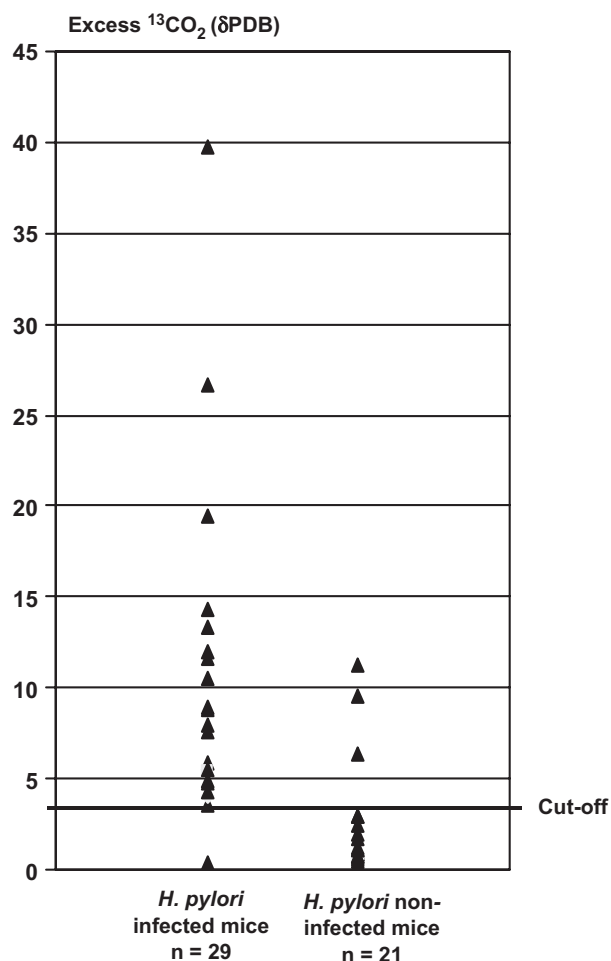


Figure 6 Levels of $\delta^{13}\text{CO}_2$ on *Helicobacter pylori*-infected and non-infected mice and establishment of the cutoff value for the ¹³C-urea breath test.

detected in Fig. 6 (assay for determination of the cutoff) (mean of 25‰ δPDB vs mean of 10.2‰ δPDB, respectively) was observed. The first assay was performed on six mice only, while the second included all 29 *H. pylori*-infected mice. This fact can account for the difference in the ¹³C production observed between the two assays. Comparing those two assays in the group of non-infected mice, no difference was observed (between 1 and 2‰ δPDB versus a mean of 2.5‰ δPDB, respectively).

The 50 mice were classified as *H. pylori*-positive or *H. pylori*-negative according to the determination of *H. pylori* status by PCR on gastric mucosa. Accordingly, all 29 mice inoculated with the *H. pylori* SS1 strain gave a positive PCR result, while a negative PCR result was obtained for all 21 non-inoculated mice. The ¹³C-UBT failed to detect one positive mouse, presenting a low cumulative ¹³CO₂ (0.13‰ δPDB), while

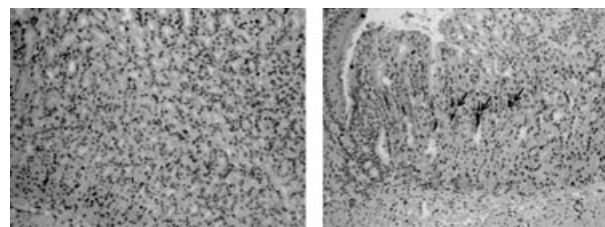


Figure 7 Immunohistochemistry of gastric mucosa (100x). *Helicobacter pylori*-negative mouse (left) and *H. pylori*-positive mouse (right). The arrows indicate bacteria.

immunohistochemistry (Fig. 7) failed to detect eight infected mice, including the one with the negative ¹³C-UBT. In the group of the non-infected animals, ¹³C-UBT gave three false-positive results, all with high levels of cumulative ¹³CO₂ (mean cumulative ¹³CO₂ 9.1‰ δPDB), while immunohistochemistry gave one false positive, this one also with a positive ¹³C-UBT. Using PCR as the gold standard, the sensitivity of ¹³C-UBT and immunohistochemistry was 96.6 and 72.4%, respectively, and the specificity was 85.7% for ¹³C-UBT and 95.2% for immunohistochemistry (Table 1). Predictive positive and negative values for ¹³C-UBT were 90.3 and 94.7%, respectively. For immunohistochemistry, these values were 95.5 and 71.4%, respectively.

Discussion

The mouse model of *H. pylori* infection provides an opportunity to study chronic infection of gastric mucosa.

The present study shows that ¹³C-UBT enabled the documentation of the *H. pylori* status of C57BL/6 mice 2 months following inoculation and that the performance of this test is high. This test is reliable and has an excellent sensitivity (96.6%) and a good specificity (85.7%) using PCR as the gold standard.

The major concerns with this test are the fasting time of mice and also the possible access to feces or other compounds (fur mouse and residual diet pellets) during this period. The mouse tendency for coprophagy can result in false-positive results on ¹³C-UBT from urease-positive bacteria present in feces. These false-positive results can also occur if mice have access to other components (diet or fur) during the fasting period, probably because of urease activity of diet compounds or fecal contamination of mouse fur and food. All these facts can explain the three false-positive results obtained with the ¹³C-UBT. Performing the ¹³C-UBT more than one time, for example, in different days, could minimize the factors affecting the specificity of the test, especially the coprophagy.

Table 1 Performances of ¹³C-UBT and immunohistochemistry for *Helicobacter pylori* detection in mice

	PCR		¹³ C-UBT		Immunohistochemistry	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Inoculated mice, n = 29	29	0	28	1	21	8
Non-inoculated mice, n = 21	0	21	3	18	1	20
Sensitivity (%) ^a	–	–	96.6	–	72.41	–
Specificity (%) ^a	–	–	85.7	–	95.2	–

^aUsing PCR as gold standard.

¹³C-UBT, ¹³C-urea breath test.

Immunohistochemistry showed a higher specificity than ¹³C-UBT, as expected, because specific anti-*H. pylori* antibodies were used. However, it showed a low sensitivity, which may be explained by the fact that some of the stomach fragments analyzed were *H. pylori* negative because of the focal distribution of *H. pylori*. The stomach samples analyzed ranged from the distal esophagus to the duodenum.

To establish the ideal fasting time, several fasting periods were tested and the 14-hours fasting period proved to be the best one. When we shortened or extended the fasting time, we encountered interference possibly from diet and from feces or mouse fur.

The 50-mL syringe we used as a CO₂ collector seems to be ideal for this sized mouse and can be easily adapted to a needle, and the inside air transferred to a 10-mL exetainer.

Animal models of infection are very useful, and previous studies have shown that ¹³C-UBT can be used for detection of *H. pylori* infection and other related species in gerbils [20], dogs [21], ferrets [22], cats [23], and also monkeys [24]. Although several technical difficulties have to be considered and overcome, once well established this test may be very useful as a diagnostic tool in the long-term time experimental mouse model of *H. pylori* infection. The present study has demonstrated the method's good sensitivity and specificity as well as its usefulness.

Having removed the possible confounding factors, namely the possibility of coprophagy during the fasting period, ¹³C-UBT proved to be a reliable method to diagnose active *H. pylori* infection in the mouse model. Besides ¹³C-UBT, PCR on mouse stools is the other technique available for the detection of *H. pylori* colonization in living mice. This method is not affected by the previously mentioned confounding factors described for ¹³C-UBT, although to reach a good accuracy, it was suggested that mice be tested once daily for at least 4 days, increasing the cost and the performing time of the test [15]. In conclusion, ¹³C-UBT can facilitate

long-term time course studies of *H. pylori* infection in small rodents, thus allowing not only the detection of the presence of active infection but also the monitoring of *H. pylori* throughout the entire experimental time period without the killing of the animals. It can be also an important tool in experimental models of gastric cancer, as long-term infection is needed.

Acknowledgements and Disclosures

The authors thank Prof. James Fox from the Division of Comparative Medicine, Massachusetts Institute of Technology, who kindly provided the *H. pylori* strain SS1 used in this study. This work was supported by PTDC/SAU-OSM/66323/2006 research grant from the Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal.

References

- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273–5.
- Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9(Suppl. 2):33–9.
- Blaser MJ. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 1992;102:720–7.
- Graham DY, Go MF. *Helicobacter pylori*: current status. *Gastroenterology* 1993;105:279–82.
- Konturek PCH, Konturek SJ, Konturek JW. Gastric secretion and the pathogenesis of peptic ulcer in the *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 1996;47:5–12.
- Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 1993;341: 1359–62.
- Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991;325: 1132–6.
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325:1127–31.
- Cover T, Blaser M. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology* 2009;136:1863–73.

- 10 IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. In: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 7–14 June 1994. 1994;61:1–241.
- 11 Wen S, Moss S. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009;282:1–8.
- 12 Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386–97.
- 13 Lee A, Fox JG, Otto G, Murphy J. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology* 1990;99:1315–23.
- 14 Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995;267:1655–8.
- 15 Nyan DC, Welch AR, Dubois A, Coleman WG Jr. Development of a noninvasive method for detecting and monitoring the time course of *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2004;72:5358–64.
- 16 Canena J, Reis J, Santos AM, et al. ¹³C-urea breath test (¹³C-UBT) in *Helicobacter pylori* mice model (abstract). *Gastroenterology* 1997;112(Suppl):A82.
- 17 Hammond PD, Stutzenberger FJ, Butler RN, Read LC, Davidson GP. Factors affecting the validity of the ¹³C-urea breath test for in vivo determination of *Helicobacter pylori* infection status in a mouse model. *Helicobacter* 1999;4:260–5.
- 18 Glauser M, Michetti P, Blum AL, Corthésy-Theulaz I. Carbon-14-urea breath test as a noninvasive method to monitor *Helicobacter felis* colonization in mice. *Digestion* 1996;57:30–4.
- 19 Oleastro M, Ménard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthélémy P, Mégraud F. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2003;41:397–402.
- 20 Opekum AR, Ohno T, Graham DY, Yamaoka Y. Novel ¹³C-Urea Breath Test Chamber for Gerbilis (abstract). *Gastroenterology* 2008 134(AS): A-567. Suppl 1: T1804.
- 21 Cornetta AM, Simpson KW, Strauss-Ayali D, McDonough PL, Glead RD. Use of a ¹³C urea breath test for detection of gastric infection with *Helicobacter* spp in dogs. *Am J Vet Res* 1998;59:1364–9.
- 22 McColm AA, Bagshaw JA, O'Malley CFO. Development of a ¹⁴C urea breath test in ferrets colonized with *Helicobacter mustelae*: effects of treatment with bismuth, antibiotics, and urease inhibitors. *Gut* 1993;34:181–6.
- 23 Neiger R, Seiler G, Schmassmann A. Use of urea breath test to evaluate short-term treatments for cats naturally infected with *Helicobacter heilmannii*. *Am J Vet Res* 1999;60:880–3.
- 24 Stadlander CTKH, Stutzenberger FJ. Adaptation of the ¹³C urea breath test as a noninvasive method for detection of *Helicobacter pylori* infection in squirrel monkeys (*Saimiri* spp.). *Lab Anim Sci* 1995;45:239–43.

5.2 Helicobacter pylori and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells. Carcinogenesis 2012 DOI: 10.1093/carcin/bgs233

***Helicobacter pylori* and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells**

Vânia Camilo¹, Rita Barros¹, Sofia Sousa¹, Ana Maria Magalhães¹, Teresa Lopes², António Mário Santos², Teresa Pereira³, Céu Figueiredo^{1,4}, Leonor David^{1,4} and Raquel Almeida^{1,4,*}

¹Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Porto, Portugal, ²CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, ³Instituto Português de Oncologia Dr. Francisco Gentil, Lisboa, Portugal and ⁴Faculty of Medicine of the University of Porto, Porto, Portugal

*To whom correspondence should be addressed. IPATIMUP, Rua Dr. Roberto Frias s/n, 4200–465 Porto, Portugal. Tel: +351 225570700; Fax: +351 225570799; Email: ralmeida@ipatimup.pt

***Helicobacter pylori* infection is the main risk factor for intestinal metaplasia (IM) and gastric cancer development. IM is a pre-neoplastic lesion, induced by the transcription factor CDX2, where the gastric mucosa is converted to an intestinal phenotype. We previously demonstrated that key elements of the bone morphogenetic protein (BMP) pathway co-localize with CDX2 in IM and upregulate CDX2 expression in gastric cell lines. These observations, together with the hypothesis that CDX2 could be repressed by SOX2, led us to test whether *H. pylori*, through BMPs, SOX2 and CDX2 could participate in a molecular network critical for the development of IM. AGS cells with and without SMAD4 knock-down were co-cultured with *H. pylori* or BMP2 to assess the expression of BMP pathway members as well as CDX2 and SOX2 by qPCR and western blot. Proximity ligation assay (PLA) was also performed to evaluate SMAD proteins interaction. Immunohistochemistry and western blot were performed in gastric samples from mice infected with *Helicobacter* spp. to measure Smad4, pSmad1/5/8, Cdx2 and Sox2 expression *in vivo*. Increased expression and activity of the BMP pathway accompanied by CDX2 upregulation and SOX2 downregulation were observed in AGS cells co-cultured with *H. pylori* or BMP2. These effects were impaired by downregulation of the BMP pathway. Finally, infected mice present BMP pathway upregulation, focal Cdx2 expression and decreased Sox2. These results provide a novel link between *H. pylori* infection and the BMP pathway in the regulation of intestinal and gastric-specific genes that might be relevant for gastric IM.**

Introduction

Helicobacter pylori infection is the major risk factor for gastric cancer development. *Helicobacter pylori*, a gram-negative, spiral-shaped microaerophilic bacterium, triggers a stepwise sequence of alterations of the gastric mucosa starting with superficial gastritis, which can progress to chronic gastritis, atrophic gastritis, intestinal metaplasia (IM), dysplasia and ultimately gastric carcinoma (1). *Helicobacter pylori* infection causes severe damage to the gastric mucosa and IM appears in this context as a pre-neoplastic regenerative process consisting of a switch of the gastric mucosa to an intestinal phenotype. IM is the most relevant pre-neoplastic lesion of the stomach affecting about 30% of the individuals infected with *H. pylori* and confers a significantly increased risk for gastric cancer development. The key molecular mediator of this differentiation switch is the transcription factor CDX2, which is a homeobox protein involved in intestinal differentiation both in normal and in aberrant locations (2–5). Under normal conditions, CDX2

expression is restricted to the intestine, but it is ectopically expressed in IM lesions, not only of the stomach, but also of the oesophagus and gall bladder, among other locations. In these ectopic settings, it appears in the context of chronic inflammation/regeneration, like in gastric IM. *Cdx2* null mice are not viable, whereas *Cdx2*^{+/-} mice develop polyp-like lesions in the intestine with loss of *Cdx2* expression and appearance of gastric differentiation (6–8). Conversely, forced expression of *Cdx2* in the stomach of transgenic mice leads to extensive IM, with subsequent progression to gastric cancer (9–11). CDX2 regulation in gastric IM has not been fully uncovered but we have demonstrated that key elements of the bone morphogenetic protein (BMP) pathway co-localize with CDX2 in IM and upregulate CDX2 expression in gastric cell lines (12). Moreover, we and Manzo *et al.* observed an upregulation of CDX2 expression induced by *H. pylori* in a co-culture model with gastric cell lines (13,14).

BMPs constitute the largest subfamily of the transforming growth factor-beta superfamily of growth factors and exert pleiotropic biological effects, ranging from regulation of early developmental processes to organogenesis (15). BMPs are extracellular proteins that initiate signalling through binding to specific transmembrane serine/threonine kinase receptors. Upon ligand binding, type II receptor kinases phosphorylate type I receptors, which in turn phosphorylate the intracellular signal transducers, SMAD proteins. Upon phosphorylation, SMAD1, -5 and/or -8 form a complex with SMAD4 and translocate to the nucleus, where they act as transcriptional regulators (16–18). In the intestine, the BMP signalling pathway, through BMP2 and BMP4, is fundamental for the maintenance of differentiation and architecture of the intestinal epithelium as demonstrated by several mouse models with impairment of the BMP pathway (19–22). Also in humans, mutations of the BMP pathway generate juvenile polyposis with loss of intestinal differentiation (23–25).

Different studies have shown that, in addition to the positive regulation, CDX2 expression could be repressed and SOX2 has emerged as a likely candidate for that role. Benahmed *et al.* (26) showed that Sox2 negatively regulated the *Cdx2* promoter by hampering the action of other transcription factors in an intestinal cell line. Moreover, Asonuma *et al.* (27) showed that SOX2 expression is negatively affected by *H. pylori* and that SOX2 downregulation leads to an upregulation of CDX2 expression in a gastric carcinoma cell line. SOX2 is the sex-determining region Y-box 2 gene, a member of the high mobility group domain proteins and is a crucial transcription factor for the maintenance of cellular pluripotency (28,29). On the other hand, Sox2 is expressed and participates in the development of the foregut-derived organs, such as oesophagus and stomach, and is absent from the hindgut-derived intestine (30). Likewise, in adults, Sox2 was shown to be expressed in the stomach and was absent from the intestine (31,32). These studies have launched SOX2 as a putative gastric transcription factor and this was reinforced by the demonstration of its involvement in the regulation of the stomach-specific genes, pepsinogen and Muc5ac (33–35).

Since *H. pylori* is the main trigger for the development of gastric IM, we aimed at studying if *H. pylori* infection affects the expression and activity of the BMP pathway and if both factors modulate CDX2 and SOX2 expression, hypothesizing that *H. pylori*, through BMPs, SOX2 and CDX2 could participate in a molecular network critical for the development of IM.

Material and methods

Cell culture

Human gastric carcinoma cell line AGS (ATCC) was maintained in RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine

Abbreviations: BMP, bone morphogenetic protein; BSA, bovine serum albumin; IM, intestinal metaplasia; PLA, proximity ligation assay.

serum (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1% antibiotics (10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

The AGS cells with SMAD4 knock-down (AGS-SMAD4i) and respective scrambled control (AGS-Sc) cell lines were maintained in selective puromycin-containing (5 µg/mL) standard medium (12).

Co-culture of AGS cell line with Helicobacter pylori

Helicobacter pylori strains 26695, containing the virulence-associated cag pathogenicity island (cagPAI) and Tx30a, lacking the cag pathogenicity island, were grown for 48 h in selective medium (Pylori-Gelose, BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) at 37°C under microaerophilic conditions (Genbox microaerophilic, BioMérieux). One day prior to co-cultures, AGS cells were seeded (5×10^5) in six-well plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum without antibiotics. The AGS-SMAD4i and AGS-Sc cell lines were seeded 72 h prior to co-cultures in standard medium supplemented with puromycin. One day prior to co-cultures, the medium was replaced by RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum without antibiotics. All co-cultures were performed for 8 h at multiplicities of infection (MOI) of 1:100 or 1:200.

BMP pathway activation

For BMP pathway activation experiments, AGS cells were treated for 24 h with BMP2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) added to the culture medium, at a concentration of 50 or 100 ng/mL. Vehicle solution [4 mM HCl, 0.1% bovine serum albumin (BSA)] was used as the negative control.

Protein extraction and western blot

Whole-cell extracts were obtained by resuspension of cell pellets in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulphate) in the presence of complete protease inhibitors cocktail (Roche, Indianapolis, IN). Quantification of total protein was determined by bicinchoninic acid protein assay (Pierce, Rockford, IL). Protein extraction from gastric samples of mice was performed by tissue disruption, in lysis buffer, using a rotor-stator homogenizer (5 pulses of a 20 s homogenization intercalated with 5 pulses of resting at room temperature) and was then passed 5 times through a 20-gauge needle attached to a sterile plastic syringe. Protein was precipitated with four volumes of ice-cold acetone and incubated on ice for 30 min. Samples were then centrifuged at full speed (4000 rpm) and the supernatant was discarded. Pellets were then washed with ice-cold ethanol and left to 'air-dry'. Pellets were resuspended in a 2D buffer (4% w/v CHAPS, 6 M urea, 2 M thiourea, 10 mM Tris-HCl pH 8.5) and kept at 4°C overnight. Lysates were then centrifuged at 14 000 $\times g$ at 4°C for 5 min, the supernatant was recovered and total protein was quantified using the 2D Quant Kit (Amersham, GE Healthcare, UK). In this study, 50–60 µg of total protein extracts were subjected to standard sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, GE Healthcare, UK) and blotted with primary antibodies overnight at 4°C: mouse monoclonal anti-CDX2 (1:500, Biogenex), mouse monoclonal anti-SOX2 (1:4500, Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-SMAD4 (sc-7966, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-pSMAD1/5/8 (1:1000, Cell Signalling), rabbit monoclonal anti-e-cadherin (1:1000, Cell Signalling), mouse monoclonal anticytokeratin (AE1/AE3, 1:2000, Zymed) and goat polyclonal anti-β-actin (1:8000, Santa Cruz Biotechnology) in 5% BSA in tris-buffered saline 0.01% Tween-20. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were used and developed with the enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, GE Healthcare, UK). Quantification of the western blots was performed using the Quantity One software (BioRad, CA). Each experiment was performed at least twice and a representative result is shown.

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted using TRI Reagent (Sigma, St. Louis, MO) and converted to cDNA using the SuperScript® II Reverse

Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). CDX2 (5'-TTC ACT ACA GTC GCT ACA TCA CC-3' and 5'-TTG TTG ATT TTC CTC TCC TTT GC-3'), SOX2 (5'-AAC GGC TCG CCC ACC TAC AGC-3' and 5'-AGT GGG AGG AAG AGG TAA CC-3'), BMP2 (5'-CTC AGG TCA GCC GGG CTC A-3' and 5'-GTT CTT CCA AAG ATT CTT CAT GG-3') and 18S (5'-CGC GCG CTA GAG GTG AAA TTC-3' and 5'-CAT TCT TGG CAA ATG CTT TCG-3') were amplified with SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a fluorescence reader ABI Prism 7500. The levels of 18S were used for normalization and relative mRNA levels were calculated. Each experiment was carried out in triplicates at least twice. The results are expressed as mean \pm SD of representative triplicates.

Proximity ligation assay

Proximity ligation assays (PLA) were performed using the DuoLink® II Fluorescence Kit (Olink® Bioscience, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after co-culture with both *H. pylori* strains at a multiplicity of infection of 100:1 cells were recovered, fixed with methanol for 5 min and frozen at -20°C. Cells were then incubated at 37°C for 30 min with a blocking solution in a humidity chamber after which the primary antibodies (SMAD4, 1:50 and pSMAD1/5/8, 1:75) were added for overnight incubation at 4°C. In the following day, PLA probes were hybridized for 1 h at 37°C, ligation was performed for 30 min at 37°C and amplification was carried out for 100 min at 37°C to produce rolling circle products. These products were visualized with fluorescently labelled oligonucleotides and the sections counterstained using Duolink II Mounting Medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Samples were examined under a Zeiss Imager Z1 Axio fluorescence microscope equipped with 4',6-diamidino-2-phenylindole and Texas Red filters. PLA products are seen as fluorescent dots. Images were acquired using a Zeiss Axio cam MRm and the AxioVision Rel. 4.8 software. The resulting images were modified using ImageJ as follows: background with radius two was subtracted from the red channel of the RGB images. The result was intensity scaled to suit printing demands. PLA products were quantified using BlobFinder v3.2 (Olink® Bioscience).

Mice infection with Helicobacter pylori and Helicobacter felis

Helicobacter pylori Sydney strain (SS1) was cultured on *H. pylori* selective agar, Wilkins–Chalgren agar supplemented with 10% defibrinated horse blood, vancomycin (10 mg/l), cefsulodin (2 mg/l), trimethoprim lactate (5 mg/l) and fungizone (1 mg/l; Biogerm, Maia, Portugal), and was incubated at 37°C for 24 h under microaerophilic conditions. *Helicobacter felis* strain was cultured on *H. pylori* non-selective agar, Wilkins–Chalgren agar supplemented with 10% defibrinated horse blood and 2 U of Vitox, and was incubated at 37°C for 48 h under microaerophilic conditions. Colonies were tested for urease, catalase and oxidase activities and observed under the microscope by Gram stain. Pathogen-free male C57Bl/6 5-week-old mice were used in compliance with guidelines and a protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the Direção Geral de Veterinária. Mice were subjected to fasting for 10 h and inoculated intragastrically with 0.1 ml of *H. pylori* SS1 or *H. felis* cell suspension containing 10⁸ colony-forming units/ml on 3 consecutive days. Eight weeks after the infection, mice were tested for the presence of the bacteria by ¹³C-urea breath test as described in Santos *et al.* (36) and also by immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

The mice were euthanized by cervical dislocation at 6, 18 and 27 weeks post infection, the stomachs were harvested and dissected along the greater curvature, fixed and embedded in paraffin. Paraffin-embedded samples were serially sectioned at 4 µm, mounted on gelatin-coated slides, dried overnight at 37°C and deparaffinized with clear rite (Thermo Scientific Richard-Allan). Antigen retrieval was performed by boiling the slides in 10 mM citric acid at pH 6.0, in a microwave oven for 20 min. After cooling, slides were incubated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 15 min, followed by blocking with the non-immune serum for 30 min (Dako) diluted 1:5 in 10% BSA (v/v). Excess normal serum was removed and slides were incubated overnight at 4°C with

one of the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-SOX2 (0.4 µg/mL, Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-CDX2 (1:50, Biogenex), rabbit polyclonal anti-pSMAD1/5/8 (1:75, Cell Signalling) and mouse monoclonal anti-SMAD4 (1:50, Santa Cruz Biotechnology) diluted in 5% BSA (v/v). Primary antibody was visualized with biotinylated secondary antibody and an avidin/biotin detection system (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) following the protocol provided by the manufacturer. Slides were developed with diaminobenzidine (Sigma Aldrich) and counterstained with Mayer's haematoxylin, dehydrated and mounted (Thermo Scientific Richard-Allan).

Results

Helicobacter pylori regulates the BMP pathway, CDX2 and SOX2

We assessed whether *H. pylori* activates the BMP pathway and thereafter modulates the expression of CDX2 and SOX2, forming a regulatory network that could be involved in the onset of gastric IM. To test that, we co-cultured AGS cells with two *H. pylori* strains, 26695 and Tx30, at different multiplicities of infection. We studied the expression of BMP2 by real-time PCR and the expression of SMAD4 and the phosphorylated form of SMAD1/5/8 (pSMAD1/5/8), which is generally accepted as the readout of an active BMP pathway, by western blot. A significantly increased expression of BMP2, SMAD4 and pSMAD1/5/8 was observed upon infection of AGS cells with both *H. pylori* strains (Figure 1A and 1B). In addition to characterizing expression, PLA that detects protein interactions was used to see whether interaction of pSMAD1/5/8 with SMAD4 was increased upon *H. pylori* infection. Furthermore, subcellular localization of the complexes was also assessed by this method

(37). The results obtained showed increased interaction between these proteins in cells infected with both *H. pylori* strains, evidenced by the presence of a significantly higher number of dots both in the cytoplasm and in the nucleae (Figure 2). This indicates that the pathway becomes more active upon *H. pylori* infection.

In the same cells, CDX2 and SOX2 expression was assessed by real-time PCR and western blot showing that CDX2 was upregulated, whereas SOX2 was downregulated (Figure 3).

The BMP pathway regulates CDX2 and SOX2

We assessed next whether the BMP pathway regulated SOX2 expression, using upregulation of CDX2 as an internal control (12). To test that, we cultured AGS cells, shown previously to have an active BMP pathway, in the presence of BMP2 in the culture medium (12). We observed that CDX2 and SOX2 expression levels were significantly altered, in an inverse manner, upon addition of BMP2 to the culture medium. CDX2 expression was upregulated, as expected, whereas SOX2 was downregulated (Figure 4A). To further confirm the inverse regulation of CDX2 and SOX2 by the BMP pathway, we characterized the expression of these two proteins in AGS cells with stable SMAD4 knock-down using shRNAs (AGS-SMAD4i) and in the respective scrambled control (AGS-Sc; 12). In accordance with the previous results, we observed a significant upregulation of SOX2 in these cells, concomitant with a downregulation of both SMAD4 and CDX2 (Figure 4B).

Role of the BMP pathway in Helicobacter pylori-induced SOX2 and CDX2 expression

To evaluate if *H. pylori* regulates CDX2 and SOX2 expression through the BMP pathway, we infected AGS-SMAD4i and AGS-Sc with the *H. pylori* strains used previously. The results obtained showed impairment of CDX2 upregulation by *H. pylori* in cells knock-down for SMAD4, as opposed to the negative control (Figure 5). On the contrary, SOX2 continues to be downregulated by *H. pylori* in cells with SMAD4 knock-down (Figure 5).

Mice infected with Helicobacter spp. have CDX2 de novo expression, SOX2 repression and BMP pathway activation

To challenge our hypothesis *in vivo*, we used a mouse model, C57Bl/6 mice, infected with two *Helicobacter* species, *H. pylori* (strain SS1) and *H. felis*. We analysed, by immunohistochemistry, the expression of CDX2, SOX2, SMAD4 and pSMAD1/5/8 in mice infected with both *Helicobacter* spp. for 6, 18 and 27 weeks and in non-infected controls. A total of 12 mice infected with *Helicobacter* spp. were characterized, two infected for 6 weeks, two infected for 18 weeks and two infected for 27 weeks, with each strain. Two non-infected controls were analysed for each time-point. CDX2 *de novo* expression was detected in 7 out of 12 infected mice and in none of the controls (Figure 6A). CDX2 expression was focal and was not accompanied by morphological alterations suggestive of an intestinal phenotype. SOX2 expression was downregulated in all infected mice compared with controls (Figure 6A). Finally, expression of SMAD4 and pSMAD1/5/8 was detected by immunohistochemistry in both controls and infected mice, with an increased and nuclear localized expression in the latter (Figure 6A).

In order to confirm increased expression and activity of the BMP pathway in mice infected with *Helicobacter* spp., we performed western blot for pSMAD1/5/8 with proteins extracted from the stomach of four control mice and in two mice infected with each *Helicobacter* spp. for 18 and 27 weeks. We observed increased pSMAD1/5/8 expression in seven out of the eight infected mice (Figure 6B). Two epithelial markers were used as loading controls of the epithelium compartment, e-cadherin and cytokeratins (data not shown) with similar results.

Discussion

In this study, we showed for the first time that the BMP pathway is upregulated by *H. pylori*. Furthermore, we confirmed CDX2 and identified SOX2 as a novel target of this pathway as well as of *H. pylori* and demonstrated its downregulation concomitantly with CDX2

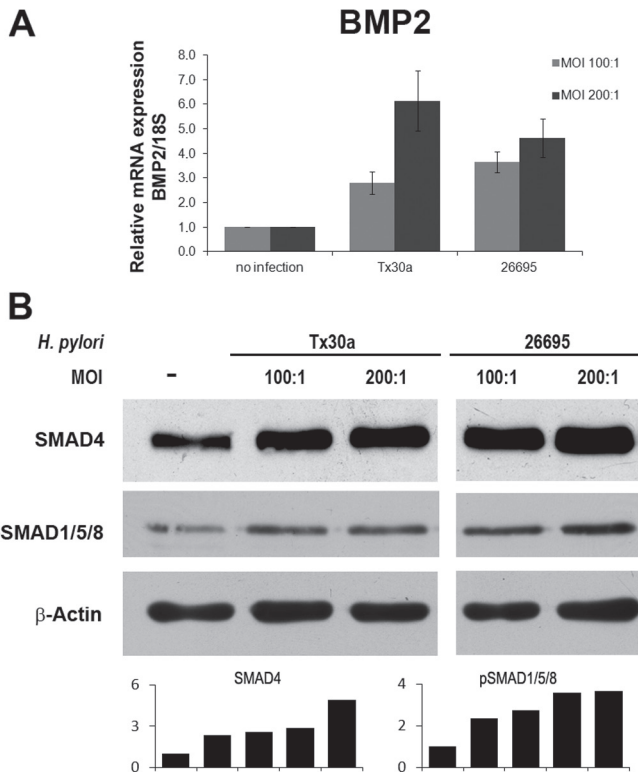


Fig. 1. BMP pathway regulation by *Helicobacter pylori*. (A) Fold increase in BMP2 mRNA expression in AGS cells upon co-culture with *H. pylori* Tx30a and 26695 strains, for 8 h at multiplicities of infection of 100:1 and 200:1. The values obtained with non-infected cells are referred to as 1. BMP2 mRNA levels are normalized with the respective 18S mRNA. (B) Western blot for SMAD4 and pSMAD1/5/8 in the same conditions described above. Non-infected cells were used as control and β-actin was used as a loading control.

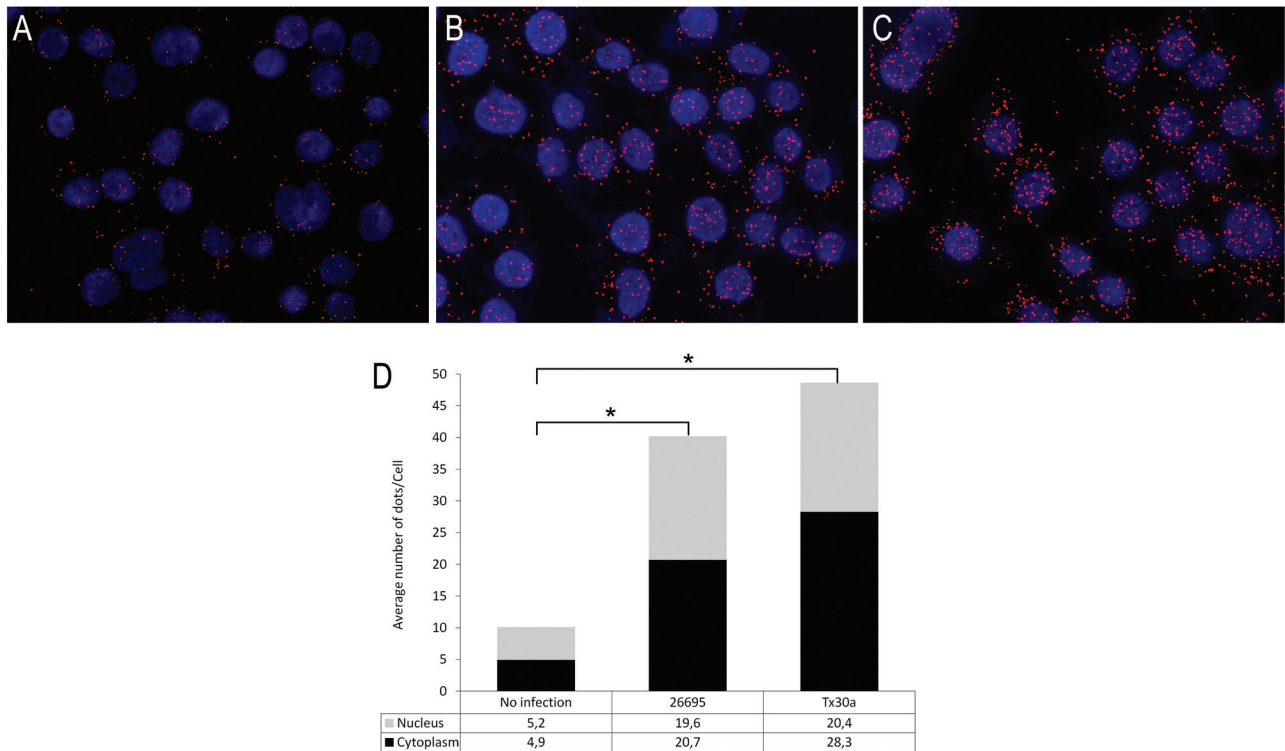


Fig. 2. Interaction between SMAD4 and pSMAD1/5/8 upon co-culture with *Helicobacter pylori*. SMAD4 and pSMAD1/5/8 interactions were determined by PLA in non-infected AGS cells (A) and in AGS cells infected with *H. pylori* 26695 (B) and Tx30a (C) for 3 h at a multiplicity of infection of 100:1. (D) Average number of red fluorescent dots in the cytoplasm and in the nucleus of non-infected cells ($N = 265$ cells), cells infected with 26695 ($N = 319$ cells) and cells infected with Tx30a ($N = 261$ cells). *Average number of red dots per nucleus and per cytoplasm was significantly different with $P = 0.00001$ using Student's t -test. Original magnifications: (A, B, C) 400 \times .

upregulation. These results provide novel information that contributes to understand the molecular events that precede the development of gastric IM, reinforcing the role of the BMP pathway in the whole process.

A frequent outcome of *H. pylori* infection of the gastric mucosa is the aberrant expression of CDX2 and the consequent development of gastric IM, a lesion that results from the transdifferentiation of the gastric mucosa to an intestinal phenotype that predisposes to cancer (1,2). In a previous study, we obtained evidence for the involvement of BMPs in this process, since key elements of this pathway, in particular the activated (phosphorylated) form of the receptor-regulated SMADs, pSMAD1/5/8, were overexpressed in IM lesions and CDX2 was upregulated by the BMPs in AGS cells (12). In the chain of events leading to gastric IM, BMP pathway activation would presumably appear following *H. pylori* infection. Concordantly, in this study, we show for the first time that *H. pylori* upregulates this pathway, demonstrated by the increased expression of BMP2, SMAD4 and pSMAD1/5/8 and by the increased interaction between SMAD4 and pSMAD1/5/8 determined by PLA in *in vitro* co-culture experiments. Most compelling, the results obtained *in vivo* lend support to this hypothesis, since overexpression of pSMAD1/5/8, the hallmark of an active pathway, was observed upon infection of the mouse gastric mucosa with two *Helicobacter* strains and was accompanied by *de novo* CDX2 expression. In accordance with our results, an upregulation of BMP2 was described previously upon *H. pylori* infection of MKN45 gastric cell line, detected by microarray analysis (39). However, this cell line does not have an active BMP pathway due to the lack of SMAD4 expression, and therefore, we did not use it further (12). Our results are also in accordance with a previous observation of an influx of BMP-expressing inflammatory cells to the stomach following infection with *H. pylori*, in human tissues (40). In our study, however, the inflammation developed in mice stomachs was mild, which may explain the also mild activation of the pathway. The BMP pathway was also shown to be involved in the onset of Barrett's oesophagus, which is a lesion similar to gastric IM and also involving

CDX2 (41,42). Two studies have shown that BMPs and pSMAD1/5/8 were overexpressed in different models of oesophagitis and Barrett's oesophagus, with only one of the studies showing association with CDX2 expression (42). The clues that can be taken from the Barrett's oesophagus model reinforce the importance of the BMP pathway in regenerating oesophageal in addition to gastric mucosa after injury, through a transdifferentiation mechanism, and suggest that a certain threshold of BMP activation is probably needed in order to induce intestinal differentiation. In addition, it has also been observed that the BMP pathway is recruited to regenerate the respiratory tract after acute injury, recapitulating the role it has during lung development (43).

Here, we reinforce the previously identified BMP-CDX2 interaction, which we show, in the current study, to be initiated by *H. pylori*. Most interestingly, *Cdx2 de novo* expression was detected in the gastric mucosa of mice infected both with *H. pylori* and *H. felis*, in discrete foci and in the absence of morphological alterations resembling IM. To the best of our knowledge, this is the first description of *Cdx2 de novo* expression in the gastric mucosa of mice upon infection with *Helicobacter* spp. The presence of CDX2 in partial or whole glands of the gastric antrum without further intestinal differentiation was also observed in humans by others and by us (44-47). In humans, this was considered a reversible expression, induced by *H. pylori* infection and not related with IM development. Our interpretation for both human and now mice focal *Cdx2* expression induced by *H. pylori* is that it occurs in cells already committed to terminal gastric differentiation and therefore not capable of initiating a metaplasia process. On the contrary, we speculate that CDX2 expression will lead to gastric IM if occurring in gastric stem cells.

Mice are the most convenient experimental models to study *Helicobacter* spp. infection but it is well known that they also offer limitations since they do not completely mimic the progress of the human disease, developing instead a relatively mild gastritis that does not evolve to IM and rarely develop gastric cancer. Now that we have

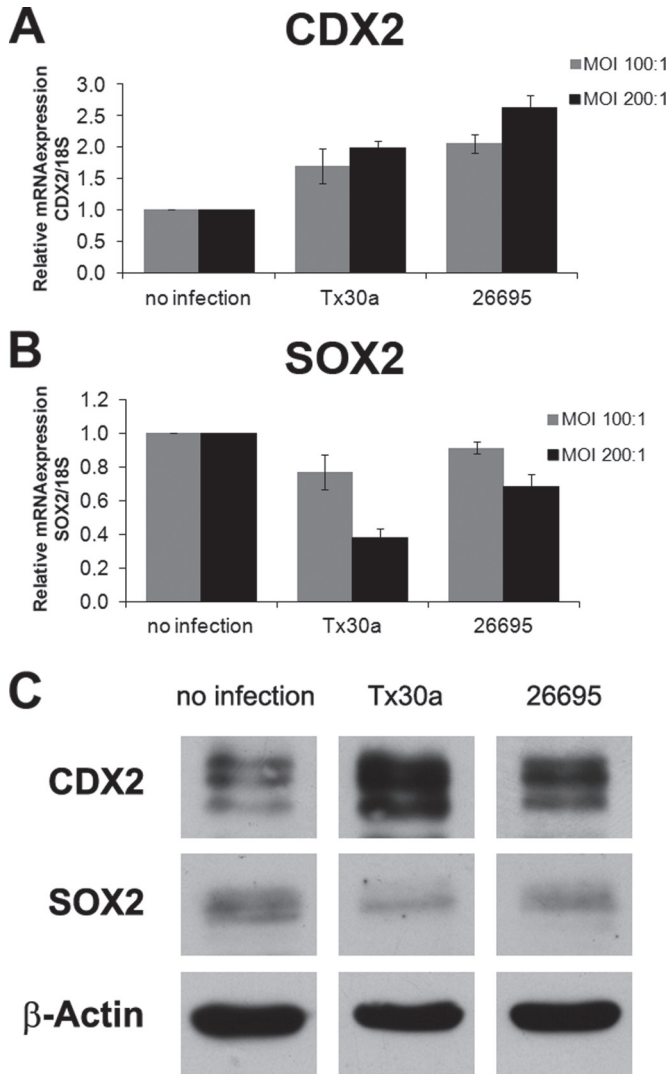


Fig. 3. CDX2 and SOX2 regulation by *Helicobacter pylori*. (A and B) Fold increase in CDX2 and SOX2 mRNA expression in AGS cells upon co-culture with *H. pylori* Tx30a and 26695 strains, for 8 h at multiplicities of infection of 100:1 and 200:1. The values obtained with non-infected cells are referred to as 1. CDX2 and SOX2 mRNA levels are normalized with the respective 18S mRNA. (C) Western blot for CDX2 and SOX2 expression in AGS cells upon co-culture with *H. pylori* strains as previously at a multiplicity of infection of 100:1. Non-infected cells were used as control and β-actin was used as a loading control.

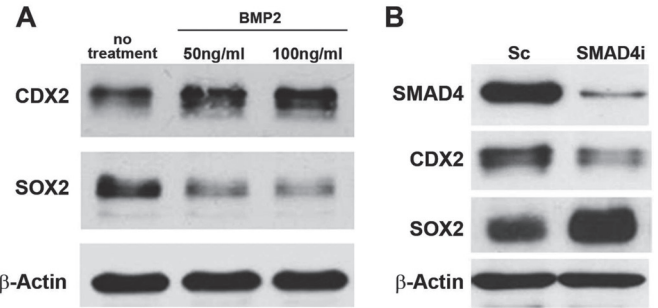


Fig. 4. CDX2 and SOX2 regulation by the BMP pathway. (A) Western blot for CDX2 and SOX2 expression in AGS cells upon activation of the BMP pathway by the addition of BMP2 to the culture medium. Vehicle-treated cells were used as control. (B) Western blot for SMAD4, CDX2 and SOX2 in AGS cells with SMAD4 knock-down (SMAD4i) and respective scrambled control (Sc). β-actin was used as a loading control.

shown aberrant Cdx2 expression in the mice gastric mucosa upon *Helicobacter* spp. infection, it will be interesting to find the missing gaps for IM and gastric cancer development in the animal model (48,49).

In addition to CDX2, we identified SOX2 as a novel target of the regulation by *H. pylori* and by the BMP pathway. SOX2 is emerging as a gastric transcription factor that could be further and cooperatively involved in CDX2 regulation and in IM onset (32). At present, the function of SOX2 in the stomach and in IM is not as clear as the function of CDX2 in intestinal differentiation and IM development. SOX2 is mostly recognized by its involvement in the maintenance of embryonic stem cell pluripotency and is included in the ‘cocktail’ of genes that are able to induce pluripotency in differentiated cells (29). During embryonic development, it is clear that Sox2 is necessary for the foregut differentiation in mouse, whereas in chick embryo, it was demonstrated that SOX2 expression ends in the boundary of the intestine, where CDX2 expression begins, thus being mutually exclusive (30,50). The expression and function of SOX2 in adult tissues is not so well characterized but recently it was shown that it is expressed in the stomach, among other epithelial tissues, in cells with stemness properties critical for normal tissue regeneration. SOX2 expression was not detected in the small intestine and colon, in accordance with previous reports (32). What we show here is that SOX2 expression is strongly downregulated both by *H. pylori* and the BMP pathway, suggesting that activation of an intestinal differentiation program occurs concomitantly with the silencing of a gastric differentiation one, induced or controlled by SOX2. We could not clarify, however, if the BMP pathway acts as a mediator of *H. pylori* in this regulation. Our results suggest that it is not, but other issues need to be taken into account, namely that SMAD4i cells still have some SMAD4, which

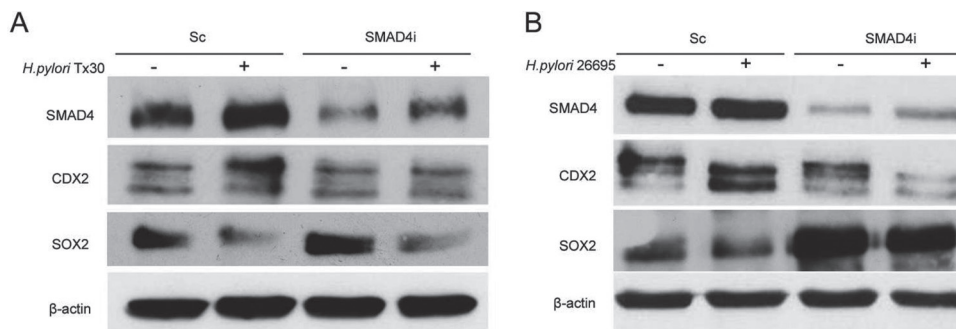


Fig. 5. Role of the BMP pathway in *Helicobacter pylori*-induced SOX2 and CDX2 expression. Western blot for SMAD4, CDX2 and SOX2 in AGS cells with SMAD4 knockdown (SMAD4i) co-cultured with *H. pylori* strains Tx30a (A) and 26695 (B) for 8 h at a multiplicity of infection of 100:1. Scrambled-transfected and non-infected cells were used as controls. β-Actin was used as a loading control.

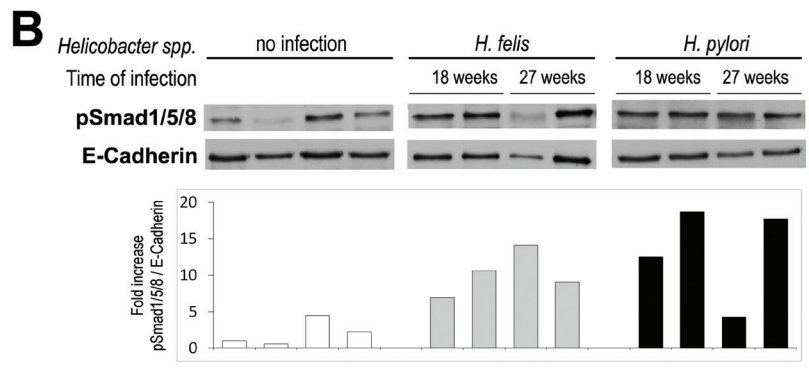
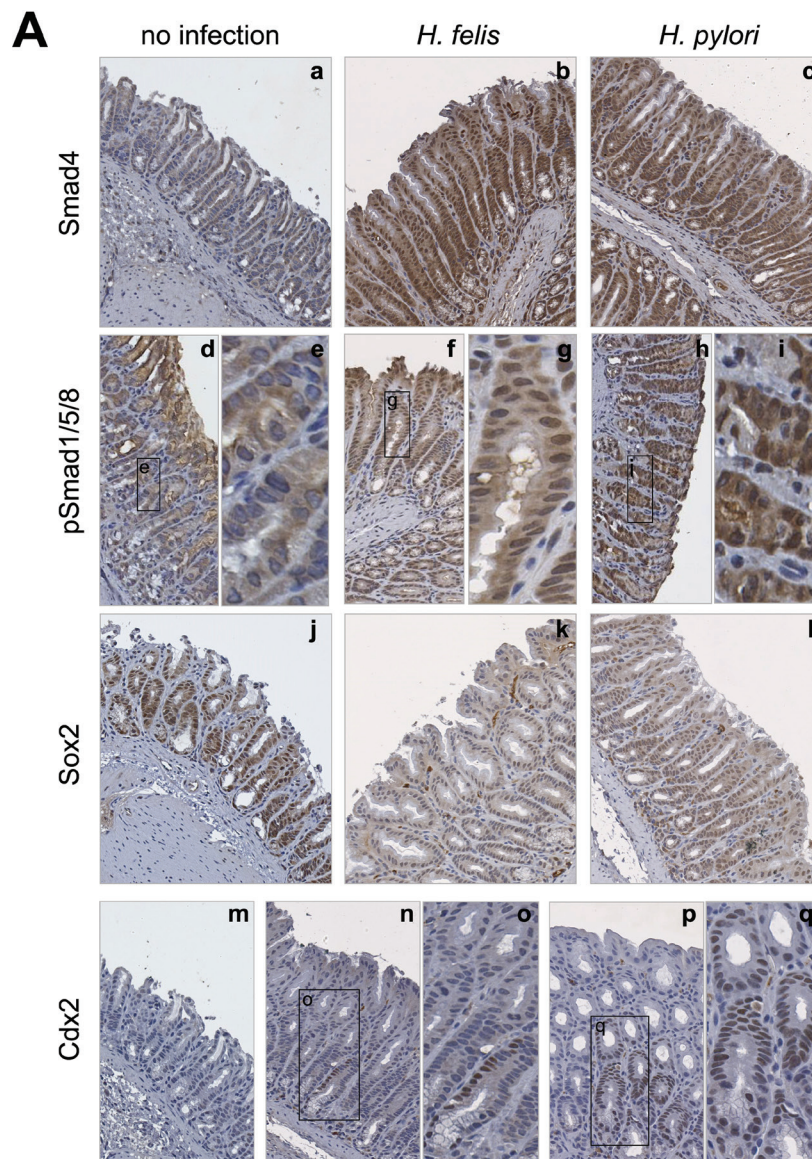


Fig. 6. BMP pathway activation and SOX2 and CDX2 expression in mice infected with *Helicobacter* spp. (A) Immunohistochemistry for Smad4, pSmad1/5/8, Sox2 and Cdx2. a: Smad4 staining in most of the nuclei in the neck region of the gastric antrum mucosa of non-infected mouse; b and c: Smad4 staining both in the foveolar, glandular and neck regions of *Helicobacter felis*- and *Helicobacter pylori*-infected mice, respectively. d–i: pSmad1/5/8 staining the nuclei in the foveolar, glandular and neck region of non-infected (d,e), *H. felis* infected (f,g) and *H. pylori* infected (h,i) mice. j: Sox2 nuclear staining in foveolar, glandular and neck regions of gastric antrum mucosa of non-infected mouse; k and l: Weak staining for Sox2 in foveolar, glandular and neck region of *H. felis*- and *H. pylori*-infected mice, respectively. m: CDX2 staining negative in the normal gastric mucosa; n and o: Focal CDX2 de novo expression in half a gland in the antrum of *H. felis* infected mouse; p and q: Focal whole gland CDX2 de novo expression in the antrum mucosa of *H. pylori* infected mouse. Original magnifications: (a,b,c,d,f,h,j,k,l,m,n,p) 100×; (e,g,i,o,q) 400×. (B) Western blot for pSmad1/5/8 in protein extracts of gastric mucosa from mice infected with *H. pylori* and *H. felis* at 18 and 27 weeks post infection. E-cadherin was used as loading control of the epithelium compartment. Quantification of pSMAD1/5/8 normalized to their respective e-cadherin is depicted in the lower panel, where the white bars represent the non-infected controls and the grey and black bars correspond to the *H. felis*- and *H. pylori*-infected mice, respectively. In this representation, all values were normalized to the first no-infection control.

might be enough to transduce this signal. In accordance with our results, it has been shown that the BMP pathway also represses Sox2 expression in the respiratory tract (51). Altogether, our results show that *H. pylori*, through the BMP pathway upregulates an intestinal differentiation program and downregulates a gastric differentiation one, which will eventually lead to the onset of IM.

Funding

Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)-Programa Operacional Ciência e Inovação 2010 do Quadro Comunitário de Apoio III and FEDER (Project PTDC/SAU-OB/64490/2006). IPATIMUP—Associate Laboratory of the Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education—is partially supported by FCT. FCT (SFRH/BD/63300/2009 to V.C.) and (SFRH/BPD/68276/2010 to R.B.)

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Paula Chaves and Dr António S. Guerreiro for creating the opportunity to use the mouse experimental model and Rui Ferreira for technical assistance.

References

1. Correa,P. (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.*, **52**, 6735–6740.
2. Uemura,N. *et al.* (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.*, **345**, 784–789.
3. Suh,E. *et al.* (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 619–625.
4. Mesquita,P. *et al.* (2006) Metaplasia—a transdifferentiation process that facilitates cancer development: the model of gastric intestinal metaplasia. *Crit. Rev. Oncog.*, **12**, 3–26.
5. Almeida,R. *et al.* (2003) Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J. Pathol.*, **199**, 36–40.
6. Eda,A. *et al.* (2003) Aberrant expression of CDX2 in Barrett’s epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J. Gastroenterol.*, **38**, 14–22.
7. Osawa,H. *et al.* (2004) Aberrant expression of CDX2 in the metaplastic epithelium and inflammatory mucosa of the gallbladder. *Am. J. Surg. Pathol.*, **28**, 1253–1254.
8. Beck,F. *et al.* (1999) Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 7318–7323.
9. Silberg,D.G. *et al.* (2002) Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology*, **122**, 689–696.
10. Mutoh,H. *et al.* (2002) Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 470–479.
11. Mutoh,H. *et al.* (2004) Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice. *Cancer Res.*, **64**, 7740–7747.
12. Barros,R. *et al.* (2008) Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *J. Pathol.*, **215**, 411–420.
13. Barros,R. *et al.* (2009) CDX2 expression is induced by *Helicobacter pylori* in AGS cells. *Scand. J. Gastroenterol.*, **44**, 124–125.
14. Manzo,B.A. *et al.* (2006) *Helicobacter pylori* regulates the expression of inhibitors of DNA binding (Id) proteins by gastric epithelial cells. *Microbes Infect.*, **8**, 1064–1074.
15. von Bubnoff,A. *et al.* (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev. Biol.*, **239**, 1–14.
16. Chen,Y.G. *et al.* (1998) Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev.*, **12**, 2144–2152.
17. Miyazono,K. (2000) Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J. Cell. Sci.*, **113** (Pt 7), 1101–1109.
18. Attisano,L. *et al.* (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, **296**, 1646–1647.
19. Takaku,K. *et al.* (1999) Gastric and duodenal polyps in Smad4 (Dpc4) knockout mice. *Cancer Res.*, **59**, 6113–6117.
20. Haramis,A.P. *et al.* (2004) De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*, **303**, 1684–1686.

21. Hardwick,J.C. *et al.* (2004) Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology*, **126**, 111–121.
22. Auclair,B.A. *et al.* (2007) Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology*, **133**, 887–896.
23. Howe,J.R. *et al.* (1998) Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*, **280**, 1086–1088.
24. Sayed,M.G. *et al.* (2002) Germline SMAD4 or BMPR1A mutations and phenotype of juvenile polyposis. *Ann. Surg. Oncol.*, **9**, 901–906.
25. Barros,R. *et al.* (2009) Juvenile polyps have gastric differentiation with MUC5AC expression and downregulation of CDX2 and SMAD4. *Histochem. Cell Biol.*, **131**, 765–772.
26. Benahmed,F. *et al.* (2008) Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. *Gastroenterology*, **135**, 1238–1247, 1247.e1.
27. Asonuma,S. *et al.* (2009) *Helicobacter pylori* induces gastric mucosal intestinal metaplasia through the inhibition of interleukin-4-mediated HMG box protein Sox2 expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **297**, G312–G322.
28. Boiani,M. *et al.* (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 872–884.
29. Takahashi,K. *et al.* (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663–676.
30. Que,J. *et al.* (2007) Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*, **134**, 2521–2531.
31. Tsukamoto,T. *et al.* (2004) Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **130**, 135–145.
32. Arnold,K. *et al.* (2011) Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*, **9**, 317–329.
33. Tani,Y. *et al.* (2007) Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **133**, 263–269.
34. Park,E.T. *et al.* (2008) Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int. J. Cancer*, **122**, 1253–1260.
35. Mutoh,H. *et al.* (2011) Sox2 expression is maintained while gastric phenotype is completely lost in Cdx2-induced intestinal metaplastic mucosa. *Differentiation*, **81**, 92–98.
36. Santos,A.M. *et al.* (2011) Role of 13C-urea breath test in experimental model of *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter*, **16**, 320–326.
37. Söderberg,O. *et al.* (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods*, **3**, 995–1000.
38. Walsh,D.W. *et al.* (2010) Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol.*, **20**, 244–256.
39. Marcos,N.T. *et al.* (2008) *Helicobacter pylori* induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x. *J. Clin. Invest.*, **118**, 2325–2336.
40. Bleuming,S.A. *et al.* (2006) Altered bone morphogenetic protein signalling in the *Helicobacter pylori*-infected stomach. *J. Pathol.*, **209**, 190–197.
41. Milano,F. *et al.* (2007) Bone morphogenetic protein 4 expressed in esophagitis induces a columnar phenotype in esophageal squamous cells. *Gastroenterology*, **132**, 2412–2421.
42. Castillo,D. *et al.* (2012) Activation of the BMP4 pathway and early expression of CDX2 characterize non-specialized columnar metaplasia in a human model of Barrett’s esophagus. *J. Gastrointest. Surg.*, **16**, 227–37; discussion 237.
43. Masterson,J.C. *et al.* (2011) Bone morphogenetic protein signalling in airway epithelial cells during regeneration. *Cell. Signal.*, **23**, 398–406.
44. Vauhkonen,M. *et al.* (2008) *Helicobacter pylori* infection induces a reversible expression of the CDX2 transcription factor protein in human gastric epithelium. *Scand. J. Gastroenterol.*, **43**, 915–921.
45. Bornschein,J. *et al.* (2009) The combined presence of *H. pylori* infection and gastro-oesophageal reflux disease leads to an up-regulation of CDX2 gene expression in antrum and cardia. *J. Clin. Pathol.*, **62**, 254–259.
46. Barros,R. *et al.* (2010) Relevance of high virulence *Helicobacter pylori* strains and futility of CDX2 expression for predicting intestinal metaplasia after eradication of infection. *Scand. J. Gastroenterol.*, **45**, 828–834.

47. Peleteiro, B. *et al.* (2011) Association between environmental factors and CDX2 expression in gastric cancer patients. *Eur. J. Cancer Prev.*, **21**, 423–431. doi:10.1097/CEJ.0b013e32834ef1aa
48. Marchetti, M. *et al.* (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*, **267**, 1655–1658.
49. Lee, A. *et al.* (1997) A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology*, **112**, 1386–1397.
50. Ishii, Y. *et al.* (1998) Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev. Dyn.*, **213**, 464–475.
51. Domyan, E.T. *et al.* (2011) Signaling through BMP receptors promotes respiratory identity in the foregut via repression of Sox2. *Development*, **138**, 971–981.

Received April 23, 2012; revised June 26, 2012; accepted July 8, 2012

5.3 **Curcumin Inhibits Gastric Inflammation Induced by *Helicobacter Pylori* Infection in a Mouse Model**
Nutrients 2015, 7, 306-320; doi:10.3390/nu7010306

Article

Curcumin Inhibits Gastric Inflammation Induced by *Helicobacter Pylori* Infection in a Mouse Model

António M. Santos ^{1,2,†,*}, Teresa Lopes ^{2,†}, Mónica Oleastro ^{3,†}, Inês Vale Gato ^{3,†}, Pauline Floch ⁴, Lucie Benejat ⁴, Paula Chaves ⁵, Teresa Pereira ⁵, Elsa Seixas ², Jorge Machado ^{3,†} and António S. Guerreiro ^{1,2,†}

¹ Serviço de Medicina 4—Hospital de Santa Marta/Centro Hospitalar de Lisboa Central, Rua de Santa Marta, 50, 1169-024 Lisboa, Portugal; E-Mail: antonioguerreiro@hotmail.com

² CEDOC—Nova Medical School—Faculdade de Ciências Médicas Campo Mártires da Pátria 130, 1169-056 Lisboa, Portugal; E-Mails: maria.lopes@fcm.unl.pt (T.L.); eseixas@igc.gulbenkian.pt (E.S.)

³ Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Avenida Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal; E-Mails: monica.oleastro@insa.min-saude.pt (M.O.); ivaldegato@gmail.com (I.V.G.); jorge.machado@insa.min-saude.pt (J.M.)

⁴ Bacteriology Laboratory, Bordeaux University, 146 rue Léo Saignat F-33000 Bordeaux, France; E-Mails: pauline-floch@hotmail.fr (P.F.); lucie.benejat@u-bordeaux2.fr (L.B.)

⁵ Serviço de Anatomia Patológica—Instituto Português de Oncologia Dr. Francisco Gentil, R. Prof. Lima Basto, 1099-023 Lisboa, Portugal; E-Mails: pchaves@ipolisboa.min-saude.pt (P.C.); tpereira@ipolisboa.min-saude.pt (T.P.)

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: santosbox@netcabo.pt; Tel.: +351-917-292-149; Fax: +351-218-285-636.

Received: 28 October 2014 / Accepted: 9 December 2014 / Published: 6 January 2015

Abstract: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection triggers a sequence of gastric alterations starting with an inflammation of the gastric mucosa that, in some cases, evolves to gastric cancer. Efficient vaccination has not been achieved, thus it is essential to find alternative therapies, particularly in the nutritional field. The current study evaluated whether curcumin could attenuate inflammation of the gastric mucosa due to *H. pylori* infection. Twenty-eight C57BL/6 mice, were inoculated with the *H. pylori* SS1 strain; ten non-infected mice were used as controls. *H. pylori* infection in live mice was followed-up using a modified ¹³C-Urea Breath Test (¹³C-UBT) and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR).

Histologically confirmed, gastritis was observed in 42% of infected non-treated mice at both 6 and 18 weeks post-infection. These mice showed an up-regulation of the expression of inflammatory cytokines and chemokines, as well as of toll-like receptors (TLRs) and MyD88, at both time points. Treatment with curcumin decreased the expression of all these mediators. No inflammation was observed by histology in this group. Curcumin treatment exerted a significant anti-inflammatory effect in *H. pylori*-infected mucosa, pointing to the promising role of a nutritional approach in the prevention of *H. pylori* induced deleterious inflammation while the eradication or prevention of colonization by effective vaccine is not available.

Keywords: *H. pylori*; curcumin; nutritional approach; secondary prevention; mouse model

1. Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is one of the most common human pathogens since it infects the gastric mucosa of about 50% of the world's population [1]. The majority of infections are asymptomatic, acquired by an overwhelming majority of the pediatric population, making the infection life-long without effective bacterial eradication. Additionally, epidemiological studies associating the infection with a higher risk of gastric malignancy lead the World Health Organization for Research in Cancer to classify *H. pylori* as a class I carcinogen [2]. *H. pylori* infection is a major risk factor for gastric cancer development because it triggers a stepwise sequence in the gastric mucosa starting with superficial gastritis, which can progress to chronic gastritis, atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia, and, ultimately, gastric carcinoma [3]. The bacteria induce a host immune response (innate and adaptive), but the persistence of the infection suggests that the response is not effective in eliminating the infection. Furthermore multiple lines of evidence suggest that the immune response contributes to the pathogenesis associated with the infection.

Over the last two decades, several experimental models of *H. pylori* infection have been developed to investigate the pathogenesis of this infection. Using a mouse-adapted *H. pylori* strain (Sidney Strain, SS1), Lee *et al.* established a model of long-term and high bacterial colonization in mice [4]. Although *H. pylori* is known to be non-invasive, an extensive inflammatory reaction is provoked in the gastric mucosa as a consequence of the infection [5]. This reaction is characterized by a mucosal infiltration of inflammatory cells, especially neutrophils, which is mediated by enhanced expression of proinflammatory chemokines and cytokines [6,7].

Given the high prevalence of *H. pylori* infection worldwide, the high costs of antibiotic treatment, and the increasing rates of antibiotic resistance, considerable efforts have been made to develop vaccines against *H. pylori*. However, efficient vaccination has not been achieved in human beings to date [8]. Thus it is essential to find alternative therapies, particularly related to nutrition, such as plant extracts that contain numerous polyphenols, which have been shown to reduce inflammation [9]. Curcumin, a naturally occurring phytochemical and an extract of *Curcuma longa* (turmeric), is known to possess many pharmacologic properties and is widely used in herbal medicine, such as for peptic diseases in

ayurvedic medicine [10]. Moreover, curcumin has proven to exhibit remarkable anticarcinogenic, anti-inflammatory, and antioxidant properties [11,12].

Thus, curcumin may be a potential agent for controlling inflammation associated with *H. pylori* infection. The aim of the present study is to evaluate the anti-inflammatory effect of curcumin using the experimental model of *H. pylori* chronic infection.

2. Experimental Section

2.1. Experimental Infections

A total of 38 pathogen-free male C57BL/6 5-week-old mice (Harlan Laboratories, Castellar, Spain—Genetic code: C57BL/6J0la-Hsd) were used in compliance with the national animal guidelines. The present study was specifically approved by the National Animal Care Committee from the Portuguese General Veterinary Direction.

The animal facility had a regulated room temperature (21 °C–24 °C), humidity (55% ± 10%), and an artificial standard 12-h light/12-h dark cycle.

All mice had *ad libitum* access to tap water and feeding (standard diet—Mmucedola srl-Italy-4RF21 certificate batch: 250202) and were kept in standard mice plastic cages (size 13 cm high, 30 cm length and 20 cm wide) with a Sournalit 3000 bedding (batch: 118/11 with no pre-treatment).

After an acclimatization period of two weeks, the mice were divided into three different groups: Control group (CG), $n = 10$, Infected group (IG), $n = 14$, Infected group treated with Curcumin (IG + C), $n = 14$. Using a 20-gauge ballpoint metal feeding tube (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA), mice were inoculated intragastrically, on three consecutive days, with either 0.1 mL of *H. pylori* SS1 cell suspension containing 10^8 colony-forming units/mL (IG and IG + C) or phosphate buffered saline (PBS) (CG). Two weeks after infection, the IG + C group received 0.5 mL of a lipidic solution of curcumin (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) (500 mg/kg) [13,14], and the IG received PBS; both regimens were given three times a week, for 6 and 18 weeks by gavage.

At Week 6, the five non-infected mice (CG) and seven mice from both the IG and IG + C groups, were killed. The remaining mice of each group were killed at Week 18.

The mice were food-deprived for 14 h prior to euthanization by cervical dislocation. For each mouse, half of the stomach was totally processed for histology and immunohistochemistry, and the remaining half was split in two, one part was immediately conserved at -80 °C in RTL buffer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) with 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) for RNA extraction, and the remaining half was used for DNA extraction.

2.2. Urea Breath Test (^{13}C -UBT) and Quantitative Real-Time PCR (qPCR) for *H. Pylori*

The presence or absence of active *H. pylori* infection was evaluated for all mice one week after the infection, and again at both 6 and 18 weeks after infection, before euthanasia, with an adapted ^{13}C -UBT, as previously described [15].

A qPCR was performed on extracted DNA from the stomach in order to evaluate the putative effect of curcumin treatment on *H. pylori*.

A real-time PCR based on SYBR Green technology was used to quantify *H. pylori* and mouse GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), an epithelial cell target, in stomach DNA extracts. *H. pylori* specific PCR targets the gene encoding 23S rRNA of *H. pylori* as already described [16]. GAPDH primers (mGapdh1for: CTGCAGGTTCTCCACACCTATG; mGapdh1rev: GAATTTGCCGTGAGTGGAGTC) were designed using Primer Express software (Life Technologies). Each sample was tested twice for 23S rRNA and GAPDH (Eurofins, Luxembourg, Luxembourg).

Two standard ranges were prepared, the first one with DNA extract from bacterial calibrated suspension (UFC/mL) of *H. pylori* SS1 strain, the second with DNA from murine epithelial cells (m-Icc12 line) [17] at a known concentration. Two standard curves were obtained and used to quantify the number of bacteria and murine cells, respectively, by μL of DNA. Final results were expressed by the ratio bacteria/ μL of DNA on murine cells/ μL of DNA.

LightCycler(r) 480 SYBR(r) Green I Master Mix (Roche Diagnostics reagent was used according to supplier's recommendations. PCR were performed on Light cycler 480 (Roche Diagnostics, Bâle, Switzerland). Following initial denaturation at 95 °C for 10 min, 45 amplification cycles (95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 15 s) were performed. Fluorescence was measured at 640 nm after each cycle. This was followed by a melting program of 95 °C for 60 s and 38 °C for 50 s at a temperature transition rate of 20 °C/s and 90 °C for 0 s (hold time) at a rate of 0.1 °C/s, with continuous monitoring of the fluorescence. The final step consisted of cooling at 2.2 °C/s to 40 °C. The results are presented as the ratio 23S rRNA/GAPDH.

2.3. Immunohistochemistry and Histology

Sections of buffered formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks (2 μm thick) were cut onto Superfrost plus slides. After baking in an oven, the 2 μm sections were de-waxed, rehydrated, and subjected to epitope antigen retrieval (20 min, 94 °C) with Target Retrieval Solution High pH 50 \times EnvisionTM Flex (Dako, Glostrup, Denmark) in a pre-treatment module PTlink (Dako). Endogenous peroxidase was blocked with 2% H₂O₂ in absolute methanol for 10 min. Immunostaining was performed by the peroxidase-indirect-polymer method. Primary polyclonal rabbit anti-*Helicobacter Pylori* (Dako, Glostrup, Denmark), was incubated for 30 minutes at room temperature. The labeled polymer HRP anti-rabbit (Dako EnVisionTM, Carpinteria, USA) detection staining system was used at room temperature for 30 minutes and DAB (3,3'-diaminobenzidine) for visualization. Sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin. As positive control a mouse gastric specimen previously known to be positive was used for HP. For negative control, primary antibody was omitted during the staining.

For histological analysis, mouse stomach samples were fixed with 10% buffered formalin solution, pH 7.0, routinely processed, and embedded in paraffin. Sections of tissue blocks 4 μm thick were cut onto glass slides and stained with hematoxylin-eosin (H & E). Inflammation was blindly observed and graded from zero to three as described elsewhere [18].

2.4. Real-Time PCR Arrays

For PCR arrays, three mice from each group, CG, IG, and IG + C, at all time-points of the experiment, were randomly chosen and tested individually. Total RNA from mouse stomach samples was extracted

using the RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), including the DNase I digestion step to eliminate residual genomic DNA, as recommended by the manufacturer. Integrity and concentration of each RNA sample was analyzed in the Agilent 2100 Bioanalyzer. Then 500 ng of RNA were reverse transcribed to single-stranded cDNA using the RT² First Strand kit (Qiagen) according to manufacturers' protocols.

Analysis of expression of 84 inflammation mediator genes, as well as of five housekeeping genes (HKG), was performed by PCR array, using the RT² Profiler PCR Array mouse inflammatory response and immunity pathway (SABioscience, Qiagen), in a 384-well format, using the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Data was normalized to the mean values of the five HKG, and the relative amount of RNA was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method.

Fold-change calculations were done using SABiosciences' data analysis software, which automatically calculates the fold-change in gene expression between the infected non-treated mice and the control group (IG *versus* CG), and between the infected and curcumin treated mice and the control group (IG + C *versus* CG). Fold-change values greater than one indicate an up-regulation, while fold-changes less than one indicate a down-regulation.

2.5. Statistical Analysis

Differences on the histology score were tested by the Mann-Whitney U test. Student's *t* test was used for the remaining statistics. Both tests were considered as statistically significant when $p < 0.05$. Results are expressed as averages \pm standard deviation (SD) of *n* observations.

3. Results

3.1. *H. Pylori* Status

At all the time points analyzed, 1 week, 6 and 18 weeks after the infection, *H. pylori* was detected in all the 28 inoculated mice, both by ¹³C-UBT (Supplementary Figure S1) and by immunohistochemistry (Figure 1A), independent of treatment with curcumin.

Mice from the CG were all negative for *H. pylori* infection. Interestingly, from week 1 to week 18, a non-significant reduction in the ¹³CO₂ values assessed by ¹³C-UBT was observed for all the infected mice. These results were confirmed by qPCR, for which no *H. pylori* DNA was detected among the non-infected mice, while no difference in *H. pylori* DNA content was observed between infected mice at 6 and 18 weeks, either treated or non-treated with curcumin (Figure 2).

3.2. Histology

The inflammation of gastric mucosa was analyzed without previous knowledge by the observer. For the CG mice, no inflammation of gastric mucosa was observed at either point in time. Among the infected mice, three of seven (42.8%) presented moderate inflammation (Score 2) at Week 6, and mild inflammation (Score 1) was also observed in three out of seven mice (42.8%) at 18 weeks (Figure 1B,C and Supplementary Table S1). No inflammation of gastric mucosa was observed in the curcumin-treated mice at either 6 or 18 weeks post-infection (Figure 1D). Differences among infected treated and non-treated groups were statistically significant for the 6 weeks of infection ($U = 3.5$, $p = 0.004$), but not for the 18 weeks of infection ($U = 14.0$, $p = 0.209$) (Supplementary Table S1).

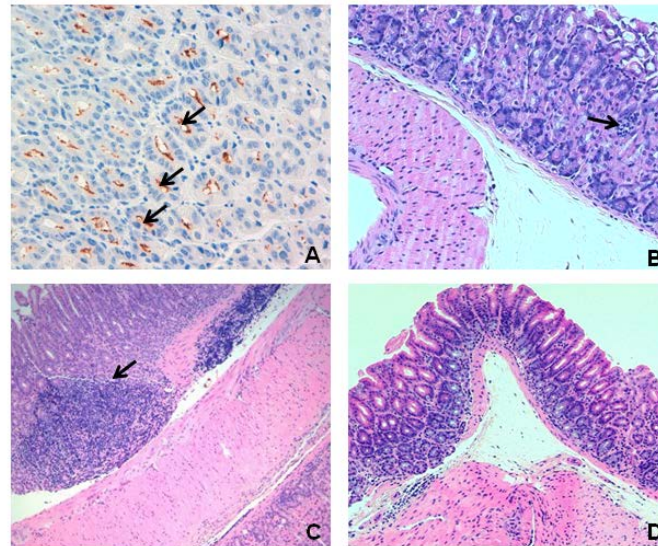


Figure 1. Gastric mucosa of an infected mouse. Immunohistochemistry for *H. pylori*, 40× (black arrows indicate bacteria) (A). Mucosal inflammation at 6 (B) and 18 weeks (C) of the infected non-treated mice (hematoxylin & Eosin (H & E) × 10). Black arrows indicate small lymphoid aggregates at the mucosa (B) and a well-defined lymphoid aggregate at the submucosa (C)—Normal gastric mucosa (H & E × 10) of infected mice treated with curcumin at 18 weeks (D).

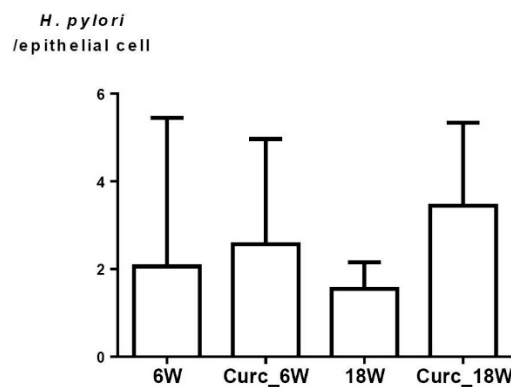


Figure 2. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) evaluating the load of *H. pylori* in the mouse gastric mucosa. Values denote the means of the ratio 23S rRNA/GAPDH, obtained for each of the mice analyzed in each group, each mouse tested in duplicate. 6W and 18W, refer to the groups of infected mice at 6 and 18 weeks, respectively; Curc_6W and Curc_18W, refer to the groups of infected mice, receiving treatment with curcumin, at 6 and 18 weeks, respectively.

3.3. Real-Time PCR Arrays

Of the 84 mouse inflammatory response and immunity pathway genes analyzed, 69 showed at least a three-fold difference in gene expression between normal mice (CG) and the infected non-treated mice (IG). At week 6, up-regulation was observed in 64 genes, while five genes appeared to be down-regulated in the infected mice, (Figure 3A and Supplementary Table S2). At week 18, up-regulation was observed

in 78 genes, and only two genes appeared to be down-regulated in the infected mice (Figure 3B and Supplementary Table S2).

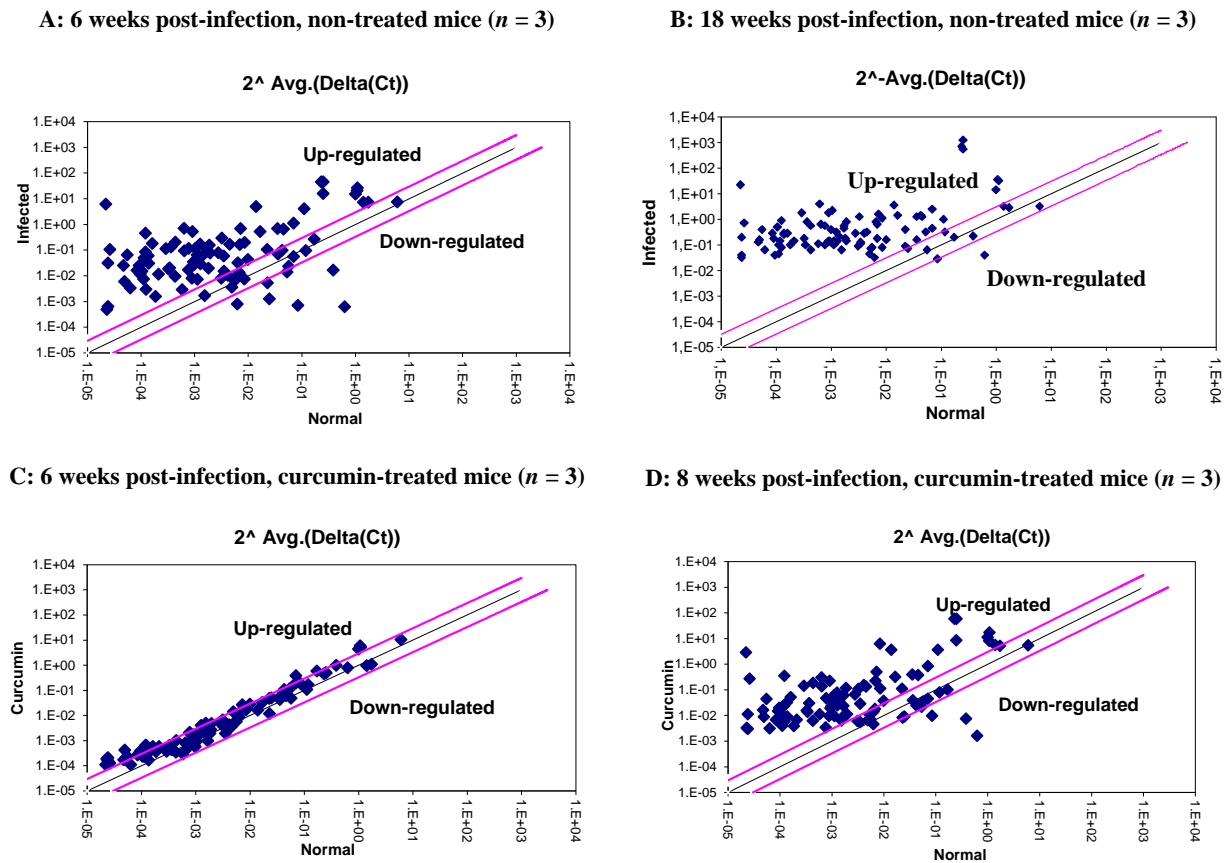


Figure 3. Relative expression level ($2^{-\Delta Ct}$) for the 84 mouse inflammatory response and immunity encoding genes, between normal mice and *Helicobacter pylori*-infected mice at Week 6 post-infection (A) and at Week 18 post-infection (B); and between normal mice and *Helicobacter pylori*-infected mice treated with curcumin at Week 6 post-infection (C) and at Week 18 post-infection (D). Values denote the means obtained for each of the mice analyzed in each group, each mouse tested in duplicate (\pm SD). The grey lines indicate a three-fold change in gene expression threshold.

The treatment of mice with curcumin for 6 and 18 weeks down-regulates the expression of almost all studied genes. This effect was more pronounced at 6 weeks of treatment than at 18 weeks (Figure 3C,D and Supplementary Table S2). The pro-inflammatory cytokines and receptors were included in the group of up-regulated genes, at Week 6, among which were the main genes involved in the immune response against *H. pylori* infection: IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-10, IL-23a, IFN- γ , TNF- α , and FasL (range of fold-change between infected and non-infected mice varied from 23.9 to 1338.6) (Figure 4A).

The same scenario was observed for the chemokines, with special emphasis on CCL2, CCL20, CCL25, CxCL1, CxCL2, and CxCL11, with fold-change ranging from 22.7 to 717.5 (Figure 4B).

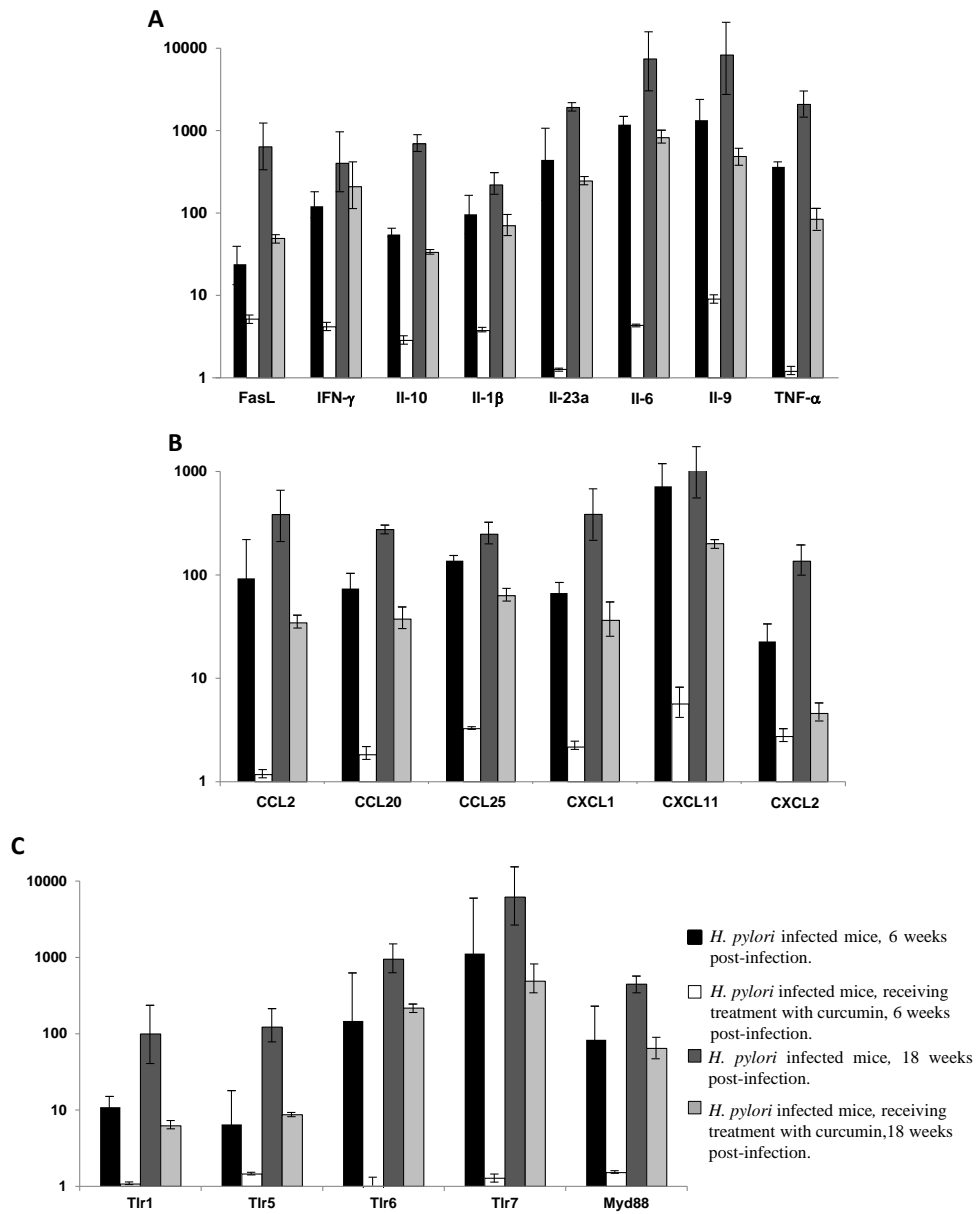


Figure 4. Fold-change in expression of mouse inflammatory response and immunity encoding genes, as determined by PCR arrays and calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method, comparing the *Helicobacter pylori*-infected non-treated mice and the infected and treated with curcumin mice versus non-infected mice, at Week 6 post-infection and at Week 18 post-infection: (A) mouse cytokines; (B) mouse chemokines; (C) mouse toll-like receptors (TLR) and MyD88. Values denote the means obtained for each of the mice analyzed in each group, each mouse was tested in duplicate (\pm SD). $p < 0.05$ for all the comparisons between the infected non-treated and the infected curcumin treated groups except for IFN- γ at Week 18. Values denote the means obtained for each of the three mice analyzed in each group, each mouse was tested in duplicate (\pm SD).

Among the toll-like receptors (TLRs), the genes encoding for TLR1, TLR5, TLR6, and TLR7 showed the largest increase range in the infected mice (range of fold-change from 6 to 1123), as well as the

universal adapter protein MyD88 (fold-change of 83.3), which is used by almost all TLRs to activate the transcription factor nuclear factor kappa beta (NF- κ B) (Figure 4C).

At week 18, up-regulation of the genes was even more pronounced, with fold-change ranging between 400.4 and 8251.1 for the main pro-inflammatory cytokines (Figure 4A), and between 135.5 and 1191.9 for chemokines (Figure 4B). Regarding the TLRs, a marked up-regulation was also observed, with fold-change ranging from 99.2 to 6164.5, and a fold-change of 446.3 for the MyD88 encoding gene (Figure 4C).

An increased in expression of the inducible nitric oxide synthetase (iNOS) was also observed for the infected non-treated mice compared to the control group, at both Week 6 (fold-change of 224) and Week 18 (fold-change of 2161).

Treatment of infected mice with curcumin drastically decreased the expression of all the inflammatory mediators, restoring their levels to those similar to the non-infected mice (Figure 3C,D). Indeed, at Week 6, among the 84 inflammatory response and immunity pathway tested genes, only 18 genes were still more expressed in the treated group than in the control group, with fold-changes varying from 3.2 to 9.0. In comparison with the infected non-treated mice, the levels of fold-change in gene expression for the curcumin-treated mice were significantly lower, averaging 100 times less for the cytokines, 70 times less for the chemokines' group, and 230 times less for the TLRs and MyD88 encoding genes (Figure 4A–C).

At Week 18, 65 out of the 84 genes tested in the curcumin-treated mice were still up-regulated compared to the control group; however the levels of fold-change decreased on average five times when compared to the fold-change observed in the infected non-treated mice (Figure 4A–C). For each gene category the effect of curcumin on the infected mice, compared to the infected non-treated group, was as follows: eleven times decrease in fold-change for the cytokines, seven times for chemokines, and ten times for TLRs and MyD88.

Overall, the effect of curcumin on inflammation due to *H. pylori* infection was more pronounced after 6 weeks of infection than after 18 weeks, even if, in this case, the treatment was more prolonged. Curcumin had a pronounced effect on all inflammatory mediators' encoding genes, with special emphasis on cytokines, chemokines, and TLRs.

4. Discussion

This study focused on the evaluation of the anti-inflammatory properties of curcumin by both histological and molecular approaches, in the context of the chronic infection by *H. pylori*, using the *in vivo* mouse model.

Our data confirm that the mouse-adapted *H. pylori* SS1 strain is well adapted to the mouse stomach milieu, which explains the high infection rate (100%) achieved in this study, even after 18 weeks of infection. Despite the low number of tested mice, the histological analysis performed showed that curcumin was effective in reducing the inflammation of the gastric mucosa of *H. pylori*-infected mice, which was confirmed at the molecular level. At this level the magnitude of the difference in the expression of the inflammatory mediators' encoding genes between the infected curcumin-treated mice and the infected but non-treated ones strongly supports the powerful anti-inflammatory properties of curcumin.

Inhibition of *H. pylori* growth was unlikely to be a mechanism that contributed to the effect of curcumin observed in this study, since positive results regarding the presence of bacteria were still obtained from both ^{13}C -UBT and qPCR. Although the amount of recovered $^{13}\text{CO}_2$ from breath analysis of all infected groups slightly decreased with time during the experiment, it was not significantly different between the groups at all time points, which was corroborated by the qPCR results. Moreover, the *H. pylori* colonization density measured by immunohistochemistry showed a positive result in all mice including the treated ones.

One can speculate that curcumin, although not bactericidal, may affect the expression/amounts of virulent genes.

Recently, Sintara *et al.* [19] in rats using histology and Di Mario *et al.* [20] in humans, using serology, demonstrated that treatment with curcumin significantly improved gastric inflammation associated with *H. pylori* infection despite persistence of the bacterium, supporting the findings of this study. However, these data are not confirmed by Kundu *et al.* [21] who suggested that curcumin acted two ways during protection against *H. pylori* infection, *i.e.* by eradicating *H. pylori* as well as potentially targeting key molecules involved in the *H. pylori*-induced gastric diseases.

According to Goel *et al.* [22], eradication by curcumin may be dependent on a high dose of this chemopreventive agent, the safety of which still has to be confirmed in animals and humans.

There are two main mechanisms by which *H. pylori* (or its products) may produce gastric inflammation. Firstly, the organism may interact with surface epithelial cells, producing either direct cell damage or the liberation of epithelial-derived pro-inflammatory mediators (chemokines). The epithelial chemokine response may be particularly important in the early stages of *H. pylori*-induced inflammation, with the epithelium acting as a crucial first line of defense against microbial infection. Secondly, *H. pylori*-derived products may gain access to the underlying mucosa, thereby directly stimulating host non-specific and specific immune responses involving the liberation of a variety of cytokine messengers [23].

Our data clearly show an increased expression of a set of chemokines (CCL20, CCL5, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CCL25) normally involved in *H. pylori* gastritis [24–26] at both 6 and 18 weeks of infection in mice, which decreased after curcumin treatment.

Still in the context of non-specific (innate) immunity, the literature describes an increase in the secretion of TNF- α , IL-6, and IL-1 β during *H. pylori* infection, with all three polypeptides being predominantly macrophage-derived cytokines with a wide range of pro-inflammatory actions involved in leukocyte recruitment and activation [27,28]. Our study confirmed these data, showing a marked increase in the expression of these cytokines in the infected mice, which decreased significantly after treatment with curcumin.

Innate immune activation depends on the input of multiple microbial stimuli. Similar to other bacteria, *H. pylori* activates several TLRs on epithelial and dendritic cells (DCs). It is possible that different TLRs ligands derived from the same microbe induce distinct and opposite effects on DCs [29–31]. To date, eleven members of the TLRs family have been found to be expressed in mice [32]. TLRs are key molecules mediating the interaction between *H. pylori* and DCs, which is largely dependent on the adaptor protein MyD88 signaling that is used by all TLRs except TLR3 [8]. Our data are consistent with the ones mentioned above, showing a significant increase in MyD88 expression in infected mice, as well as of several TLRs [33]. Once again, treatment of infected mice with curcumin restored the normal range of all these molecules.

With regard to adaptive immunity, the discovery of Th17 cells was a major step in our understanding of CD4 + T cell responses to *H. pylori* infection. The early events in the immune response of immunized and challenged mice include the recruitment of T cells. In murine systems, Th17 cell differentiation depends on the presence of IL-6, transforming growth factor beta (TGF- β 1), and CCL20, which are significantly increased in *H. pylori*-stimulated macrophages. Subsequently, IL-23 that is increased in patients with *H. pylori* gastritis will promote Th17 cell proliferation via the STAT3 pathway [33,34]. The NF- κ B pathway participates in the production of these inflammatory mediators in response to *H. pylori* [35]. In a similar way to that found with the previously described chemokines, the expression of this set of cytokines was also increased in our infected mice (TGF- β was not measured) and decreased significantly after treatment with curcumin. It is worth noting that gastric epithelial cells stimulated by IL-17 also lead to production of chemokines, including CCL25, chemotactic factor for macrophages, activated monocytes, and DCs. In our study, we found an increase in the expression of this cytokine, probably reflecting IL-17 stimulation, the level of which returned to normal after curcumin therapy.

Shi *et al.* [36] suggest that *H. pylori* infection induces a mixed Th17/Th1 cell response and the Th17/IL-17 pathway modulates Th1 cell responses and contributes to pathology. It is generally accepted that *H. pylori* infection results in a Th1-dominant response and gastric inflammation that depends on Th1 cells is characterized by the production of IFN- γ [37–40]. Accordingly, the infected mice in this study showed a strong Th1 response, with high expression of IFN- γ at both 6 and 18 weeks after infection, which regressed after treatment with curcumin mainly at Week 6 post-infection.

We may wonder what the rationale for the beneficial effects of curcumin is in the context of gastric infection by *H. pylori*. The pathogenesis of this infection is associated with bacterial virulence factors that can induce the activation of NF- κ B in gastric epithelial cells [19,41]. This transcription factor is an important regulator of many cellular processes, including the control of immune response and inflammation [42,43]. For example, the NF- κ B pathway participates in the production of inflammatory mediators in *H. pylori*-stimulated macrophages critical for differentiation and proliferation of Th17 cells [35]. Curcumin has many biological attributes, including anti-inflammatory properties [19], and most of these effects can be explained by the efficient inhibition of NF- κ B mediated by this substance [44–46]. Previous studies have shown that curcumin can inhibit NF- κ B activation in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells [47], as well as in rats [48]. In this last study, *H. pylori*-induced gastric inflammation was associated with increased NF- κ B activation and macromolecular leakage, which was reduced by curcumin supplementation. In our study the quantification of NF- κ B by an alternative method (like qPCR or immunohistochemistry) was not performed, which is a clear limitation of the study. Identifying the localization of NF- κ B in the gastric mucosa by immunohistochemistry, if performed, would also have been of informative relevance.

Another point that deserves attention is the observation that despite curcumin fully abolishing the gastric mucosa inflammation, a total remission of gene expression of inflammation markers was not observed. In our study, we also observed a discrepancy between histological inflammatory scores and inflammatory genes by PCR arrays for all infected mice, before or after curcumin treatment, and the more pronounced gene expression observed at Week 18 post-infection in the non-treated mice had no parallelism in higher histological inflammation scores, compared to Week 6 post-infection. One possible explanation for this is the fact that some adaptive host factors may also contribute to mucosal protection. Considering the limited number of mice in each group and that we did not observe a consistent exuberant

mucosal inflammation for any mouse at any time of the experiment, it can be speculated that mouse infection with the human pathogen *H. pylori* might not be the ideal model of inflammation, at least regarding histological parameters.

5. Conclusions

In conclusion, as far as we know, this is one of the few studies using both histological and molecular approaches, showing the important anti-inflammatory role of curcumin in the context of chronic *H. pylori* infection. Taking into account the extensive consumption of polyphenols in the human diet (curcumin and others), our data points to the promising role of a nutritional approach in the control of *H. pylori* induced deleterious inflammation while an effective vaccine is not available.

Acknowledgments

This project was funded by PTDC/SAU-OSM/66323/2006 and SFRH/BPD/34094/2006 research grants from the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal.

Author Contributions

António M. Santo and António S. Guerreiro made the study design and drafted the manuscript. Paula Chaves and Teresa Pereira analyzed the histological samples. Inês Vale Gato and Elsa Seixas performed the molecular genetic studies. Teresa Lopes supervised the animal experiments, participated in the study design and also in the draft of the manuscript. Pauline Floch and Lucie Benejat performed the quantitative real-time PCR for *H. pylori*. Mónica Oleastro and Jorge Machado were responsible for the statistical analysis, microbiology, and also helped with the study design. All authors carefully read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Suarez, G.; Reyes, V.E.; Beswick, E.J. Immune response to *H. pylori*. *World. J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 5593–5598.
2. IARC Working Group. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. In Proceedings of The International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France, 7–14 June 1994; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1994; Volume 61, pp. 1–241.
3. Correa, P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6735–6740.

4. Lee, A.; O'Rourke, J.; de Ungria, M.C.; Robertson, B.; Daskalopoulos, G.; Dixon, M.F. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: Introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **1997**, *112*, 1386–1397.
5. Verbeke, H.; Geboes, K.; van Damme, J.; Struyf, S. The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1825*, 117–129.
6. Backert, S.; Naumann, M. What a disorder: Proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Trends. Microbiol.* **2010**, *18*, 479–486.
7. Chuchart, K.; Sukanya, L.; Don, C.; Kriangkrai, C.; Jiraprapa, W. Investigation of the anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 815–818.
8. Rad, R.; Brenner, L.; Krug, A.; Volland, P.; Mages, J.; Lang, R.; Schwendy, S.; Reindl, W.; Dossumentkova, A.; Ballhorn, W. Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 150–163.
9. Bengmark, S.; Mesa, M.D.; Gil, A. Plant-derived health: The effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr. Hosp.* **2009**, *24*, 273–281.
10. Balachandran, P.; Govindarajan, R. Cancer—An ayurvedic perspective. *Pharmacol. Res.* **2005**, *51*, 19–30.
11. Surth, Y.J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: A short review. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1091–1097.
12. Kewitz, S.; Volkmer, I.; Staeger, M. Curcuma contra cancer? Curcumin and Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Growth Metastasis* **2013**, *6*, 35–52.
13. Premkumar, K.; Kavitha, S.; Santhiya, S.T.; Ramesh, A.R.; Suwanteerangkul, J. Interactive effects of saffron with garlic and curcumin against cyclophosphamide induced genotoxicity in mice. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2004**, *13*, 292–294.
14. Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Newman, R.A.; Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 807–818.
15. Santos, A.; Lopes, T.; Oleastro, M.; Chaves, P.; Cordeiro, R.; Ferreira, M.; Pereira, T.; Machado, J.; Guerreiro, A. Role of ¹³C-urea breath test in experimental model of *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter* **2011**, *16*, 320–326.
16. Oleastro, M.; Ménard, A.; Santos, A.; Lamouliatte, H.; Monteiro, L.; Barthélémy, P.; Mégraud, F. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 397–402.
17. Ferrand, J.; Lehours, P.; Schmid-Alliana, A.; Mégraud, F.; Varon, C. *Helicobacter pylori* infection of gastrointestinal epithelial cells *in vitro* induces mesenchymal stem cell migration through an NF-κB-dependent pathway. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/0029007.
18. Jones, N.L.; Day, A.S.; Jennings, H.; Patrick, T.; Shannon, P.T.; Galindo-Mata, E.; Sherman, P.M. Enhanced disease severity in *Helicobacter pylori*-infected mice deficient in Fas signaling. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 2591–2597.
19. Sintara, K.; Duangporn, T.-N.; Suthiluk, P.; Naruemon, K.; Tanittha, C. Curcumin suppresses gastric NF-kappaB activation and macromolecular leakage in *Helicobacter pylori*-infected rats. *World. J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 4039–4046.

20. Di Mario, F.; Cavallaro, L.G.; Nouvenne, A.; Stefani, N.; Cavestro, G.M.; Iori, V.; Maino, M.; Comparato, G.; Fanigliulo, L.; Morana, E. A curcumin-based 1-week triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection: Something to learn from failure? *Helicobacter* **2007**, *12*, 238–243.
21. Kundu, P.; de, R.; Pal, I.; Mukhopadhyay, A.K.; Saha, D.R.; Swarnakar, S. Curcumin alleviates matrix metalloproteinase-3 and -9 activities during eradication of *Helicobacter pylori* infection in cultured cells and mice. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/0016306.
22. Goel, A.; Kunnumakkara, A.; Aggarwal, B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 787–809.
23. Bodger, K.; Crabtree, J. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br. Med. Bull.* **1998**, *54*, 139–150.
24. Wu, Y.; Tsai, H.; Lin, W.; Hsu, P.; Shun, C.; Wu, M.; Hsu, P. Upregulation of CCL20 and recruitment of CCR6+ gastric infiltrating lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 4357–4363.
25. Yoshida, A.; Isomoto, H.; Hisatsune, J.; Nakayama, M.; Nakashima, Y.; Matsushima, K.; Mizuta, Y.; Hayashi, T.; Yamaoka, Y.; Azuma, T. Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Clin. Immunol.* **2009**, *130*, 290–297.
26. Eck, M.; Schmausser, B.; Scheller, K.; Toksoy, A.; Kraus, M.; Menzel, T.; Müller-Hermelink, H.; Gillitzer, R. CXC chemokines Gro/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, *122*, 192–199.
27. Crabtree, J.; Shallcross, R.; Heatley, R.; Wyatt, J. Mucosal tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Gut* **1991**, *32*, 1473–1477.
28. Noach, L.; Bosma, N.; Jansen, J.; Hoek, F.; Deventer, S.; Tytgat, G. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* **1994**, *29*, 425–429.
29. Redecke, V.; Hacker, H.; Datta, S.K.; Fermin, A.; Pitha, P.M.; Broide, D.H. Cutting edge: Activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2739–2743.
30. Dillon, S.; Agrawal, A.; Van, D.T.; Landreth, G.; McCauley, L.; Koh, A. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses *in vivo*, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 4733–4743.
31. Pulendran, B. Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 2457–2465.
32. Rad, R.; Ballhorn, W.; Volland, P.; Eisenächer, K.; Mages, J.; Rad, L.; Ferstl, R.; Lang, R.; Wagner, H.; Schmid, R. Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 2247–2257.
33. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801.
34. Kabir, S. The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity. *Helicobacter* **2011**, *16*, 1–8.

35. Zhuang, Y.; Shi, Y.; Liu, X.; Zhang, J.; Liu, T.; Fan, X.; Luo, J.; Wu, C.; Yu, S.; Chen, L. *Helicobacter pylori*-infected macrophages induce Th17 cell differentiation. *Immunobiology* **2011**, *216*, 200–207.
36. Shi, Y.; Liu, X.; Zhuang, Y.; Zhang, J.; Liu, T.; Yin, Z.; Wu, C.; Mao, X.; Jia, K.; Wang, F. *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 5121–5129.
37. Eaton, K.A.; Mefford, M.; Thevenot, T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 7456–7461.
38. Karttunen, R.; Karttunen, T.; Ekre, H.P.; MacDonald, T.T. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut* **1995**, *36*, 341–345.
39. Bamford, K.B.; Fan, X.; Crowe, S.E.; Leary, J.F.; Gourley, W.K.; Luthra, G.K.; Brooks, E.G.; Graham, D.Y.; Reyes, V.E.; Ernst, P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* **1998**, *114*, 482–492.
40. Smythies, L.E.; Waites, K.B.; Lindsey, J.R.; Harris, P.R.; Ghiara, P.; Smith, P.D. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 1022–1029.
41. Brandt, S.; Kwok, T.; Hartig, R.; König, W.; Backert, S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9300–9305.
42. Ghosh, S.; Karin, M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* **2002**, *109*, 81–96.
43. Li, Q.; Verma, I.M. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 725–734.
44. Singh, S.; Aggarwal, B.B. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24995–25000.
45. Kumar, A.; Dhawan, S.; Hardegen, N.J.; Aggarwal, B.B. Curcumin (diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 775–783.
46. Jobin, C.; Bradham, C.A.; Russo, M.P.; Juma, B.; Narula, A.S.; Brenner, D.A.; Sartor, R.B. Curcumin blocks cytokine-mediated NF- κ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- κ B kinase activity. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 3474–3483.
47. Foryst-Ludwig, A.; Neumann, M.; Schneider-Brachert, W.; Naumann, M. Curcumin blocks NF- κ B and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *316*, 1065–1072.
48. Lambert, J.D.; Hong, J.; Yang, G.; Liao, J.; Yang, C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 284–291.

- 5.4 **Cyclooxygenase inhibition with curcumin: a new therapeutic approach against *Helicobacter pylori* infection?**
Nutrire (2018) 43: 7. <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0070-5>

RESEARCH

Open Access



Cyclooxygenase inhibition with curcumin in *Helicobacter pylori* infection

António Mário Santos^{1,2*}, Teresa Lopes², Mónica Oleastro³, Teresa Pereira⁴, Carolina Coimbra Alves², Elsa Seixas², Paula Chaves⁴, Jorge Machado³ and António Sousa Guerreiro^{1,2}

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection increases the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) on the host's gastric mucosa. The inhibition of COX-2 activity with natural products would be a major advantage. This study aims to clarify the possible effect of curcumin on COX-2 inhibition in gastric mucosa of *H. pylori* infected mice.

Methods: We inoculated 30 pathogen-free male C57BL/6 mice with *H. pylori* (SS1 Sidney strain) that were randomly divided in two different groups: infected group (IG) treated with phosphate-buffered saline (PBS) ($n = 15$) and infected group treated with curcumin 500 mg/kg (IG + C) ($n = 15$). A group of 15 non-infected mice were used as control (CG). Two weeks post-infection, both IG and CG groups received 0.5 ml of PBS, while the IG + C group received curcumin for 6, 18, and 27 weeks.

Results: The analysis by immunohistochemistry and by PCR array at 6, 18, and 27 weeks post-infection showed a significant increase on COX-2 expression on the IG mice compared to the CG mice. The group treated with curcumin (IG + C) showed a significant downregulation of COX-2 at all points of the experiment, when compared to the IG + C mice.

Conclusion: Chronic *H. pylori* infection induces a significant increase in COX-2 expression. Treatment with curcumin significantly decreases the COX-2 expression, and the addition of curcumin to the diet may be an interesting approach for areas of high *H. pylori* prevalence.

Keywords: *H. pylori*, Curcumin, Experimental model, COX-2

Background

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection is associated with several gastroduodenal disorders such as chronic gastritis, peptic ulcer disease, MALT lymphoma, and gastric distal carcinoma [1, 2]. Nevertheless, the exact mechanisms involved in the development of these disorders remain unclear. It has been reported that *H. pylori* increases cell proliferation of the gastric mucosa and the eradication of the infection returns cell proliferation to normal levels [3–5]. The hyperplastic changes observed in *H. pylori*-induced gastritis are thought to be associated with pre-cancerous changes [6, 7]. Although the

precise mechanisms involved in these changes are not all yet clear, it has been described that cyclooxygenase-2 (COX-2) is implicated in these alterations observed in gastric mucosa of mice infected with *H. pylori* [8].

COX-2 whose expression induced by cytokines, growth factors, and tumor promoters has been shown to play a role as an immediate-early response in inflammation [9].

Several studies in humans and animals show that *H. pylori* upregulates the expression of COX-2 both at mRNA and protein levels, which might be one of the mechanisms leading to several gastric diseases [10].

So far, the clinical approach to target COX-2 has been via inhibition of its activity with non-steroidal inflammatory drugs (NSAIDs).

It was found that the prolonged intake of NSAIDs was able to produce serious side effects and also that the chronic use of salicylates can damage the gastric mucosa

* Correspondence: santosbox@netcabo.pt

¹Serviço Medicina 4 Hospital Sta. Marta C H Lisboa Central, Rua de santa Marta, Lisbon, Portugal

²Nova Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Campo Mártires da Pátria 130, 1169-056 Lisbon, Portugal

Full list of author information is available at the end of the article

[11] and produce gastrointestinal bleeding [12]. For this reason, the medical community looks with concern to this class of drugs.

Despite all these facts, the inhibition of COX-2 would be of major interest in many pathological conditions, in which its expression is chronically upregulated, such as *H. pylori* gastritis, autoimmune diseases, and several types of cancer [13].

Targeting COX-2 expression with natural compounds may therefore represent a promising strategy, by which the same preventive and therapeutic benefits may be obtained although avoiding the adverse side effects of COX-2 enzymatic inhibition.

Nowadays, there is a global interest in nutraceuticals, a huge source of biologically active molecules that remain largely unexplored, with proven anti-inflammatory properties and whose role is being increasingly recognized in improving health care [14–16].

Curcumin, the nutraceutical used in the present study, is the main component of the plant *Curcuma longa*, a gold-colored spice commonly used in the Indian subcontinent, not only for health care but also for the preservation of food. This nutraceutical has been shown to exhibit antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, antibacterial, antifungal, and anticancer activities. These effects are mediated through the regulation of various transcription factors, growth factors, inflammatory cytokines, protein kinases, and other enzymes [17–20].

The high prevalence of *H. pylori* infection all over the world [21], the high costs of treatment, and the high level of treatment failure due to antibiotic resistance lead the scientists trying to develop a vaccine against *H. pylori* infection. Although the large amount of investigation was produced in this field, so far, this kind of vaccine is not yet available.

So, it would be of major interest to find a treatment with anti-inflammatory activity of plant-derived molecules, like curcumin, modulating the COX-2 activity but without the side effects of NSAIDs.

The aim of the present work was to study the expression of COX-2 during treatment with curcumin on gastric mucosa of mice in *H. pylori* experimental chronic infection model.

Methods

Animal housing and study design

A total of 45 pathogen-free male C57BL/6 5-week-old mice (Harlan Laboratories, Castellar, Spain) were used in compliance with the guidelines and protocols approved by the National Animal Care Committee from the Portuguese General Veterinary Direction. After arrival, the mice were randomly divided in cages (5 mice per cage) with ad libitum access to acidified tap water (1 bottle per cage) and sterilized standard diet (Mmucedolasrl-

4RF21 certificate batch: 250202). Then, the mice were kept for 2 weeks for acclimatization purposes before starting the experimental procedure. The animal facility has a positive pressure local exhaust ventilation, with 15–20 air changes per hour, room temperature between 21 and 24 °C, regulated relative humidity (55% ± 10%), and an artificial standard 12 h light/12 h dark cycle of 250 lx intensity.

After the acclimatization period and using a 20-gauge ballpoint metal feeding tube (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, Mass.), 30 mice were inoculated intragastrically, on three consecutive days, with 0.1 ml of *H. pylori* SS1 strain (Sidney strain) cell suspension containing 10⁸ cfu/ml. The presence or absence of active *H. pylori* infection was evaluated for all mice 1 week after the infection and then at 6, 18, and 27 weeks post-infection, before euthanasia, with an adapted ¹³C-UBT, as previously described [22].

Two weeks later, the infected mice were randomly divided in two different groups: infected group treated with phosphate-buffered saline (PBS; IG), *n* = 15, and infected group treated with curcumin (IG + C), *n* = 15. The remaining 15 non-infected mice were used as control group (CG).

The CG and the IG groups received 0.5 ml of PBS, while the IG + C group received 0.5 ml of a lipidic solution of curcumin (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) (500 mg/kg) [19]. The two regimens were given three times a week, for 6, 18, and 27 weeks post-infection by gavage.

Five mice from each group were euthanized at 6, 18, and 27 weeks post-infection.

Sampling

Animals were fasted for 14 h and then euthanized by cervical dislocation. For each mouse, half of the stomach was placed in buffered formalin to be fully processed for *H. pylori* and COX-2 immunohistochemistry analysis and the remaining half was immediately conserved at –80 °C in RTL buffer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), with 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal), for RNA extraction.

Immunohistochemistry

Sections of buffered formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks with 2 µm thickness were cut onto Superfrost Plus slides. After baking in an oven, the sections were de-waxed, rehydrated, and subjected to epitope antigen retrieval (20 min, 94 °C) with Target Retrieval Solution High pH 50× Envision™ Flex (Dako, Ref.: DM828) in a pre-treatment module PTlink (Dako, Code No. PT10130). Endogenous peroxidase was blocked with 2% H₂O₂ in absolute methanol for 10 min. Immunostaining was performed by the c.

Immunohistochemistry for *H. pylori* was done using a primary polyclonal rabbit anti-*H. pylori* (Dako B0471, Glostrup, Denmark) incubated for 30 min at room temperature. As positive control, a mouse gastric specimen previously known to be positive for *H. pylori* was used. For negative control, primary antibody was omitted during the staining. Immunohistochemistry for COX-2 was done using a primary rabbit monoclonal anti-COX-2, clone SP21 (Cell Marque 240R-14, 1:1500), and incubated overnight at 4 °C temperature. An appropriate positive control was used. For negative control, primary antibody was omitted during the staining. The visualization was done using labeled polymer HRP anti-rabbit (Dako EnVision™ K4011) detection staining system at room temperature for 30 min and DAB (3,3'-diaminobenzidine). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

The area of immunostaining was accessed with image software analysis Aperio ImageScope™ v11.1.2.760. Positive area of immunostaining was measured only when software analysis detected strong staining [23].

Real-time PCR arrays

For PCR arrays, three mice from each group, CG, IG, and IG + C, were randomly selected and tested individually. Total RNA from stomach mice samples was extracted using the RNeasy Mini kit (QiagenGMBH, Hilden, Germany), including the DNase I digestion step to eliminate residual genomic DNA. Integrity and concentration of each RNA sample was analyzed in the Agilent 2100 Bioanalyzer. Then, 25.0 ng to 5.0 µg RNA were reverse-transcribed to single-stranded cDNA using the RT2 First Strand kit (Qiagen, Germany). All procedures were performed according to manufacturer's protocols.

Analysis of expression of COX-2 gene as well as of five housekeeping genes (HKG), was performed by PCR array, using the RT2 Profiler PCR Array Mouse Inflammatory response and Immunity pathway (SABioscience, Qiagen), in a 384-well format, using the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Data was normalized to the mean values of the five HKG, and the relative amount of RNA was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Fold change calculations were done using SABiosciences' data analysis software, which automatically calculates the fold change in gene expression between the infected non-treated mice and the control group (IG versus CG) and between the infected and curcumin-treated mice and the control group (IG + C versus CG). Fold change values greater than one indicate an upregulation, while fold changes less than one indicate a downregulation [23].

Statistical analysis.

Differences were tested by Student's *t* test, being considered as statistically significant when $P < 0.05$. Results are

expressed as averages \pm standard deviations (SD) of *n* observations.

Results

H. pylori status

All the 30 inoculated mice (IG and IG + C) were *H. pylori*-positive by ^{13}C -urea breath test (data not shown) and by immunohistochemistry (Fig. 1). All mice from control group (CG) were negative for both methods.

COX-2 immunostaining

The area of COX-2 immunostaining was accessed with the Aperio ImageScope software. The microscope image was digitalized by the software (Fig. 2a) and was automatically processed. When strong immunostaining was detected (Fig. 2b), the area was quantified (dark-brown areas) as number of pixels.

In the IG (PBS) group, the production of COX-2 was significantly upregulated (area of positive immunostaining pixels) at week 6 ($393\text{--}544 \times 10^3$ pixels), week 18 ($242\text{--}614 \times 10^3$ pixels), and week 27 ($129\text{--}175 \times 10^3$ pixels) post-infection. The curcumin treatment significantly decreased the expression of COX-2 at all time points: $175\text{--}206 \times 10^3$ pixels ($p = 0.0012$) at week 6, $134\text{--}149 \times 10^3$ pixels ($p = 0.0010$) at week 18, and $87\text{--}97 \times 10^3$ pixels ($p = 0.047$) at week 27 (Fig. 3).

PCR array of COX-2

The analysis by PCR array of COX-2 showed at least a 50,000-fold increase in gene expression between the control group (CG) and the infected group (IG) of mice at 6, 18, and 27 weeks post-infection (IG vs CG) (Fig. 4).

At all time points of the experiment, COX-2 gene expression in the curcumin-treated mice (IG + C) was still upregulated compared to the control group (CG); however, the

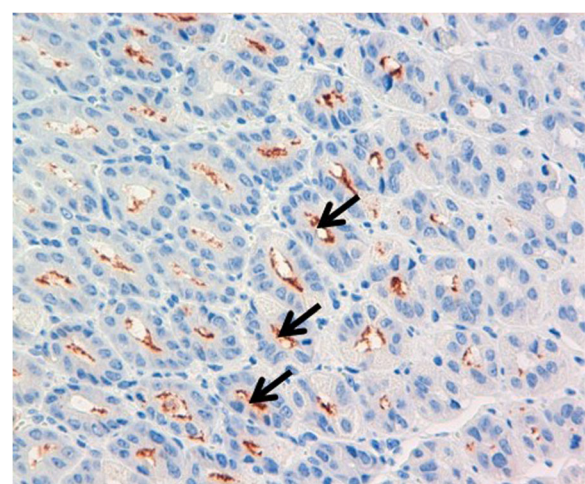


Fig. 1 Immunohistochemistry of the gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected mouse, $\times 100$ (black arrows indicate bacteria)

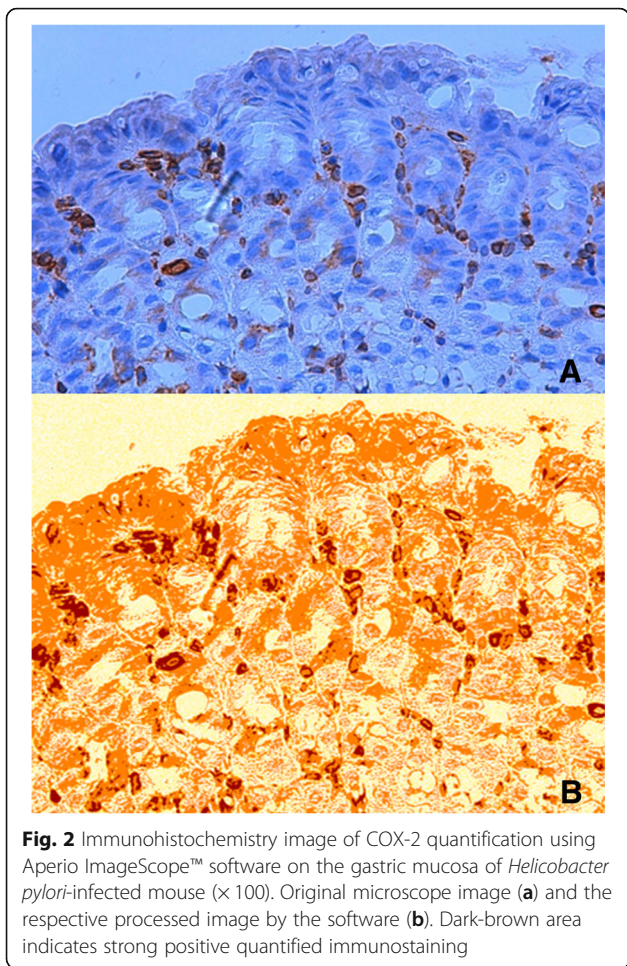


Fig. 2 Immunohistochemistry image of COX-2 quantification using Aperio ImageScope™ software on the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected mouse (× 100). Original microscope image (a) and the respective processed image by the software (b). Dark-brown area indicates strong positive quantified immunostaining

levels of fold change significantly decreased on average at least 8000 times when compared to the fold change observed in the mice infected group (IG), with p values < 0.005 at all time points of the experiment (IG vs IG + C) (Fig. 4).

Discussion

As described previously, COX-2 is a key enzyme in the prostanoid synthesis. Under physiological conditions, it is only found in minor concentrations and is induced in several pathological conditions [24, 25] such as *H. pylori* infection. Our study shows that the mouse-adapted *H. pylori* SS1 strain seems to be very well adapted to the mice stomach milieu, which explains the high infection rate with this strain even after 27 weeks post-infection (100%), and we had a strong expression of COX-2 as early as 6 weeks post-infection and a similar result at 18 and 27 weeks post-infection. This increased expression was observed at mRNA expression level and also at the protein expression level. In *H. pylori* infection, both bacterial and host factors are believed to contribute to gastric mucosal damage. Regarding host factors, it is suspected that inflammatory responses may be involved in *H. pylori*-induced gastritis [26–28]. Romano et al. [29] reported that adhesion of *H. pylori* on cultured gastric cancer MKN28 cells results in COX-2 mRNA expression. However, it is unclear whether the direct effect of *H. pylori* on gastric cells is crucial for COX-2 expression in vivo, because COX-2 protein was not expressed even at 2 weeks post-*H. pylori* infection in some experimental models [30].

The high and uncontrolled expression of COX-2 may induce tissue damage and tumor growth, and the suppression of COX-2 is related with the inhibition of gastric carcinoma cell growth. The administration of dietary

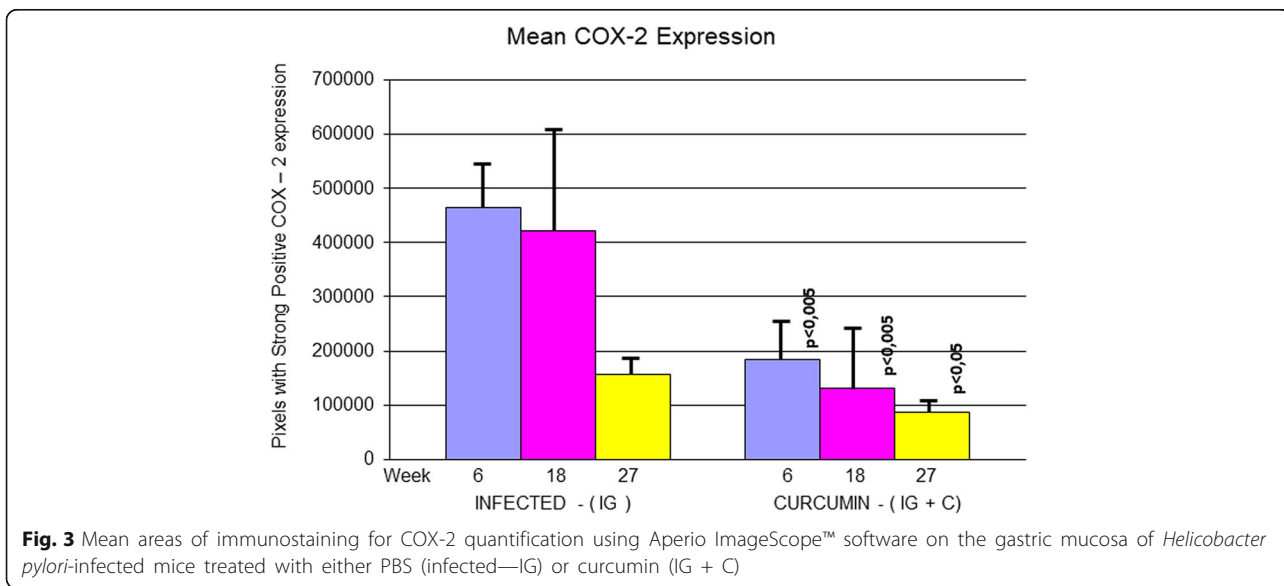


Fig. 3 Mean areas of immunostaining for COX-2 quantification using Aperio ImageScope™ software on the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected mice treated with either PBS (infected—IG) or curcumin (IG + C)

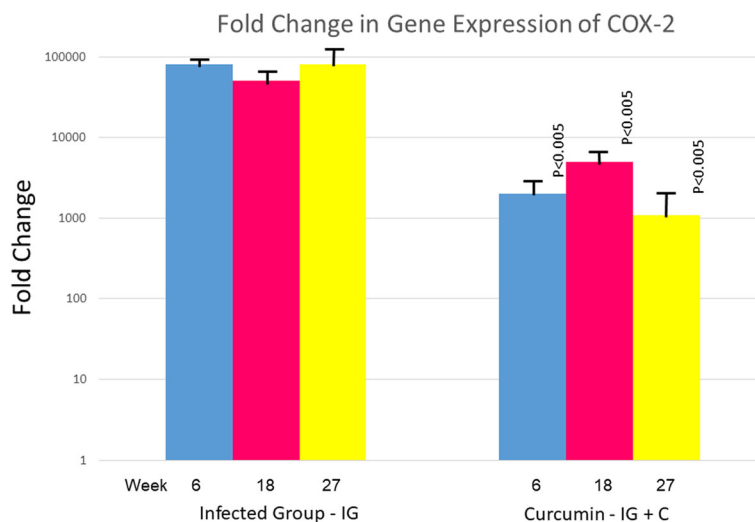


Fig. 4 Fold change expression of COX-2 in the gastric mucosa as determined by PCR arrays and calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method, comparing the *Helicobacter pylori*-infected non-treated mice (IG) and the infected and treated with curcumin mice (IG + C) versus non-infected mice (CG) at weeks 6, 18, and 27 post-infection. Values denote the means obtained for each of the mice analyzed in each group; each mouse was tested in duplicate (\pm SD). $p < 0.005$ for all the comparisons between the infected non-treated and the infected curcumin-treated groups

curcumin to a human xenograft model in nude mice decreased metastasis of breast cancer to the lung, supported by the suppressed expression of NF- κ B and COX-2 [31].

The use of all NSAIDs, selective and nonselective, is associated with a range of potential adverse effects, including an increased risk of adverse cardiovascular effects. Both COX-2 selective NSAIDs (coxibs) and nonselective NSAIDs may increase such risk. A survey made in our country showed that these drugs are widely prescribed, despite the potential harmful side effects [32].

The administration of anti-inflammatory COX-2 inhibitors to inhibit/modulate the COX-2 expression has been ineffective since the risks prevail over the benefits. Clinical demonstration of severe side effects due to the failure of the classical COX-2 inhibitors to discriminate between an aberrant pathological versus homeostatic functional activation state raised the concern that direct COX-2 enzymatic inhibition might not sufficiently represent an appropriate clinical strategy to target COX-2 [33].

Several nutraceuticals have been shown to exert modulatory effect on COX-2 at various levels of its molecular regulation, and therefore, they have been considered as an effective alternative strategy to control the pathogenic expression of COX-2 [34, 35]. The safety, tolerability, and non-toxicity of curcumin are well established not only in experimental models but also in human trials [36–39].

In the present study, *H. pylori* infection increased the expression of COX-2 at all time points of the experiment while curcumin inhibited COX-2

expression at both mRNA and protein levels at all same time points of the chronic infection. It has been described that the anti-inflammatory mechanism of curcumin is in part due to its ability to suppress NF- κ B pathway, the main regulator of the inflammatory response [40, 41]. Despite of that curcumin, also demonstrates direct inhibition activity of COX-2 [42, 43].

Conclusions

H. pylori upregulates the expression of COX-2 both at mRNA and protein levels which might be one of the mechanisms implicated in the development of gastric diseases.

Nutraceuticals, like curcumin, are currently receiving recognition as being beneficial in many diseases, and evidences indicate that the mechanism of action of natural compounds involves an extensive range of biological processes, including anti-inflammatory properties without the harmful effects of the NSAIDs.

Data from our study confirm the important role of curcumin in COX-2 downregulation in the chronic *H. pylori* mice infection.

As curcumin can inhibit COX-2 expression at both gene and protein expression without the secondary effects of the NSAIDs or COXIBs, we can conclude that the supplementation of diet in humans with curcumin may be a possible novel therapeutic approach against gastric inflammation induced by *H. pylori* infection. The supplementation of diet with this nutraceutical may be an interesting approach for areas of high *H. pylori* prevalence. Results from ongoing clinical trials will provide a deeper understanding of curcumin's potential therapeutic properties.

Abbreviations

CG: Control group; COX-2: Cyclooxygenase-2; COXIBs: Highly selective COX-2 inhibitors; *H. pylori*: *Helicobacter pylori*; IG + C: Infected group plus curcumin; IG: Infected group; NSAIDs: Non-steroidal inflammatory drugs; PBS: Phosphate-buffered saline; PCR: Polymerase chain reaction

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

This work was supported by PTDC/SAU-OSM/66323/2006 research grant from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal.

Availability of data and materials

The datasets generated used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

All authors made a significant contribution to the research and the development of the manuscript, helped design the study, and directed the study's implementation, including quality assurance and control. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the relevant clinical research ethics committee and with those of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and protocol from the study which was approved by the National Animal Care Committee from the Portuguese General Veterinary Direction.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Serviço Medicina 4 Hospital Sta. Marta C H Lisboa Central, Rua de santa Marta, Lisbon, Portugal. ²Nova Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Campo Mártires da Pátria 130, 1169-056 Lisbon, Portugal. ³Department of Infectious Diseases, National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, Av. Padre Cruz, 1600 Lisbon, Portugal. ⁴Department of Pathology, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Rua Prof. Lima Basto, Lisbon, Portugal.

Received: 14 August 2017 Accepted: 8 February 2018

Published online: 05 May 2018

References

- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;321(8336):1273–5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92719-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92719-8).
- Wessler S, Krisch LM, Elmer DP, Aberger F. From inflammation to gastric cancer—the importance of hedgehog/GLI signaling in *Helicobacter pylori*-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases. *Cell Commun Signal*. 2017;15(1):15. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0171-4>.
- Canales J, Valenzuela M, Bravo J, et al. *Helicobacter pylori* induced phosphatidylinositol-3-OH kinase/mTOR activation increases hypoxia inducible factor-1 α to promote loss of cyclin D1 and G0/G1 cell cycle arrest in human gastric cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:92. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00092.4>.
- Lynch DA, Mapstone NP, Clarke AM, Sobala GM, Jackson P, Morrison L, et al. Cell proliferation in *Helicobacter pylori* associated gastritis and the effect of eradication therapy. *Gut*. 1995;36:346–50.
- Lynch DA, Mapstone NP, Clarke AM, Jackson P, Dixon MF, Quirke P, et al. Cell proliferation in the gastric corpus in *Helicobacter pylori* associated gastritis and after gastric resection. *Gut*. 1995;36:351–3.
- Rosania R, Varbanova M, Wex T, Langner C, Bornschein J, Giorgio F, et al. Regulation of apoptosis is impaired in atrophic gastritis associated with gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2017;17:84. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0640-7>.
- Solcia E, Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Padovan L, Calistri D, et al. Intestinal and diffuse gastric cancers arise in a different background of *Helicobacter pylori* gastritis through different gene involvement. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:58–22.
- Xiao F, Furuta T, Takashima M, Shirai N, Hanai H. Involvement of cyclooxygenase-2 in hyperplastic gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15:875–86.
- DuBois RN, Awad J, Morrow J, Roberts LJ, Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- α and phorbol ester. *J Clin Invest*. 1994;93:493–8.
- JL Wallace AB, McKnight W. COX-1 contribute to the inflammatory response in rat and mice: implication of gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology*. 1998;115:101–9.
- Langman MJ. Epidemiological evidence for the association of aspirin and acute gastrointestinal bleeding. *Gut*. 1970;11:627–34.
- Mellemkjær L, Blot WJ, Sørensen HT, Thomassen L, McLaughlin JK, Nielsen GL, et al. Upper gastrointestinal bleeding among users of NSAIDs: a population-based cohort study in Denmark. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53:173–81.
- Yunes P, Behrad D, Mostafa G, Narges J, Fatemeh B, Behrang SV. Molecular mechanisms of curcumins suppressing effects on tumorigenesis, angiogenesis and metastasis, focusing on NF-KB pathway. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016; <https://doi.org/10.1016/j.cytofr.2015.12.004>.
- Miller F, French M. Organizing the entrepreneurial hospital: hybridizing the logics of healthcare and innovation. *Res Policy*. 2016;(8):1534–44. <https://doi.org/10.1016/j.respol.2016.01.009>.
- Sharma V, Singh L, Verma N, Smarak G. The nutraceutical amino acids—Nature's Fortification for Robust Health College of Engineering and Technology (Pharmacy), Bareilly, India. *Brit J Pharmaceut Res*. 2016;11:1–20. Article no.BJPR.24415 ISSN: 2231-2919, NLM ID: 101631759. DOI: 10.9734/BJPR/2016/24415
- At B, Cl K, Me G. The basis of structure/function claims of nutraceuticals. *Clin Rev Allerg Immunol*. 2016:1–13. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8536-9>.
- Aggarwal B, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:1–75. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1.
- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:787–809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016>.
- Aggarwal BB, Young-Joon S, Shishodia S, Editors. The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. *Ser Adva Exper Med Biol*. 2007;595: XXI, 489. p. 77 illus.
- Sarkar A, Ronita D, Mukhopadhyay A. Curcumin as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases. *World J Gastroenterol*. 2016;22:2736–48. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i9.2736>.
- Hooi JK, Lai WY, Ng WK, Suen M, Underwood F, Tanyingoh D, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2017;153:420–9.
- Santos A, Lopes T, Oleastro M, Chaves P, Cordeiro R, Ferreira M, et al. Role of 13C-urea breath test in experimental model of *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter*. 2011;16:320–6. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00847.x>.
- Santos AM, Lopes T, Oleastro M, et al. Curcumin inhibits gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. *Nutrients*. 2015;7(1):306–20. <https://doi.org/10.3390/nu7010306>.
- Chaoui W, Leger DY, Liagre B, Beneytout JL, Hmamouchi M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009;23:549–56. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00738.x>.
- Katsukawa M, Nakata R, Takizawa Y, Hori K, Takahashi S, INOUE H. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801:1214–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.07.004>.
- Blaser MJ. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology*. 1992;102:720–7.
- Crabtree JE. Role of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. *Dig Dis Sci*. 1998;43:465–555.
- Kalisperati P, Spanou E, Pateras IS, Korkolopoulou P, Varvarigou A, Karavokyros, et al. Inflammation, DNA damage, *Helicobacter pylori* and gastric tumorigenesis. *Front Genet*. 2017;8:20. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00020>.

29. Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, et al. Helicobacter pylori up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN28 gastric mucosal cells in vitro. *J Biol Chem*. 1998;273:28560–3.
30. Takahashi S, Fujita T, Akira Y. Role of cyclooxygenase-2 in Helicobacter pylori induced gastritis in Mongolian gerbils. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(4):G791–8.
31. Panda AK, Chakraborty D, Sarkar I, Khan T, Sa G. New insights into therapeutic activity of curcumin. *J Exp Pharmacol*. 2017;9:31–45. <https://doi.org/10.2147/JEP.S70568>.
32. Areia M, Pereira A, Banhudo A, Coutinho G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastroprotection gap among family physicians: results from a survey. *GE J Port Gastreterol*. 2013;20:243–9.
33. Scarpignato C, Lanas A, Blandizzi C, Lems WF, Hermann M, Hunt RH, the International NSAID Consensus Group. Safe prescribing of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with osteoarthritis—an expert consensus addressing benefits as well as gastrointestinal and cardiovascular risks. *BMC Med*. 2015;13:55. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0285-8>.
34. Bhagat N, Chaturvedi A. Spices as an alternative therapy for cancer treatment. *Sys Rev Pharm*. 2016;7:46–56. <https://doi.org/10.5530/srp.2016.7.7>.
35. Shrotriya S, Kundu JK, Na HK, Surh YJ. Diallyl trisulfide inhibits phorbol ester-induced tumor promotion, activation of AP-1, and expression of COX-2 in mouse skin by blocking JNK and Akt signaling. *Cancer Res*. 2010;70:1932–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
36. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(3):283–99. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x>.
37. Yang N, Sampathkumar K, Loo J. Recent advances in complementary and replacement therapy with nutraceuticals in combating gastrointestinal illnesses. *Clin Nutr*. 2017;36(4):968–79. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.08.020>.
38. Abbas SH, Abdulridha MK, Najeb AA. Potential benefit of curcumin adjuvant therapy to the standard Helicobacter pylori eradication therapy in patients with peptic ulcer disease. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10(5):313–7. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i5.17462>.
39. Judaki A, Rahmani A, Feizi J, Asadollahi J, Ahmadi K, Ahmadi H, et al. Curcumin in combination with triple therapy regimens ameliorates oxidative stress and histopathologic changes in chronic gastritis-associated Helicobacter pylori infection. *Arq Gastroenterol*. 2017;54(3):177–82. <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.201700000-18>
40. Shaoguang W, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*. 2009;15(9):1016–22. <https://doi.org/10.1038/nm.2015>.
41. Han F, Ren J, Zhang J, Sun Y, Ma F, Liu Z, et al. JMJD2B is required for Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis via regulating COX-2 expression. *Oncotarget*. 2016;7:38626–37. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9573>.
42. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:59–73. <https://doi.org/10.1038/nri2216>.
43. Waldner MJ, Neurath MF. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol*. 2009;31(2):249–56. doi:<https://doi.org/10.1007/s00281-009-0161-8>.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6. DISCUSSÃO

A infecção por *H. pylori* afeta a grande maioria da população mundial e está associada à patologia gastroduodenal, nomeadamente a gastrite crónica, a doença ulcerosa péptica, o linfoma MALT e também o cancro gástrico.

Nas duas últimas décadas, foram desenvolvidos vários modelos experimentais de infecção por *H. pylori* com o objetivo de investigar a patogénese desta infecção. Um destes modelos foi criado por Lee e colaboradores, através da utilização da estirpe de *Sidney* (SS1), tendo esta metodologia sido reproduzida por nós no presente trabalho.

Em todos os modelos experimentais, tão importante como a colonização eficaz da mucosa gástrica por *H. pylori*, é a confirmação da sua permanência nos animais de experiência ao longo do tempo.

O teste respiratório com ^{13}C -ureia é o método não-invasivo preferencial para diagnosticar a infecção por *H. pylori* em humanos. Ficou demonstrado na presente tese que, mesmo em pequenos animais de experiência, como os ratinhos C57BL/6, o teste respiratório pode ser utilizado com sucesso apresentando elevada sensibilidade (96,6%) e especificidade (85,7%), utilizando o PCR como *gold standard* (estudo pioneiro). Este método tem ainda a grande vantagem de monitorizar a infecção ao longo do tempo, sem ser necessário realizar a eutanásia dos ratinhos [217].

A infecção por *H. pylori* induz inflamação da mucosa gástrica e a consequente resposta imune do hospedeiro (inata e adaptativa), mas a sua persistência sugere que esta resposta não é eficaz na eliminação da infecção, podendo a mesma ser um fator de patogenicidade.

Assim, o processo inflamatório da mucosa gástrica induzido por *H. pylori*, pode ter como consequência o desenvolvimento de metaplasia intestinal em cerca de 30% dos indivíduos infetados [217]. Esta transformação da mucosa de tipo gástrico em mucosa de tipo intestinal, representa uma condição pré-neoplásica aumentando de modo significativo o risco de cancro do estômago [218]. Um dos mediadores moleculares fundamentais para esta transformação é o fator de

transcrição CDX2, que é uma proteína “*homebox*” envolvida na diferenciação do epitélio intestinal, quer em situações normais, quer em situações patológicas [219-222].

No primeiro caso, a expressão de CDX2 encontra-se apenas presente no intestino, no entanto em situações patológicas, pode ser encontrada ectopicamente no estômago, no esófago e na bexiga, entre outras localizações. Sabe-se através de diversos estudos [223-226] que a via de sinalização do BMP (*Bone Morphogenic Protein*) aumenta a expressão de CDX2 e consequentemente a diferenciação intestinal. A sua expressão pode ser inibida sob ação da SOX2 [227].

Um dos trabalhos da presente tese [228] demonstrou que a infeção por *H. pylori* aumenta a expressão de BMP e consequentemente a de CDX2. Por outro lado, esta infeção diminui a expressão de SOX2, um dos fatores que controla negativamente a expressão de CDX2. Assim, a infeção por *H. pylori* contribui para o estabelecimento de metaplasia intestinal através de uma dupla ação, o aumento da expressão de CDX2 associado à inibição de SOX2. De salientar que a identificação de CDX2 “de novo”, no trabalho em que fui co-autor, constituiu também um estudo pioneiro, em que foi utilizado um modelo “in vivo” de infeção experimental induzida através de duas estirpes de *Helicobacter* (*Helicobacter pylori* e *Helicobacter felis*).

De referir que, a presença de CDX2 nas glândulas da mucosa gástrica do antro tem sido observada mesmo sem a presença de metaplasia. Esta situação é considerada uma situação reversível induzida por *H. pylori* não relacionada com o desenvolvimento de metaplasia intestinal. Uma possível explicação para esta disparidade pode dever-se ao facto de as alterações histológicas só surgirem quando são envolvidas as células estaminais da mucosa gástrica “stem cells” e não as células que já atingiram a sua fase final de diferenciação [229-231].

No presente trabalho demonstrámos que através da via de sinalização do BMP, o micro-organismo induz a diferenciação intestinal e por outro lado reduz a programação de diferenciação em mucosa de tipo gástrico. Na verdade, a expressão de SOX2, um dos fatores que controla negativamente a CDX2 (que contribui para a diferenciação intestinal) encontra-se inibida pela infeção por *H.*

pylori. Este facto, pode ser um dos motivos pelo qual vários autores no passado não encontraram expressão de SOX2 em tecido de metaplasia intestinal [232 - 234].

Apesar da resposta imune da mucosa gástrica na presença de *H. pylori* se caracterizar pela sua infiltração por células inflamatórias, especialmente neutrófilos, mediada pela expressão aumentada de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, a grande maioria dos doentes infetados permanece assintomática. Na verdade, só uma pequena percentagem de doentes desenvolve doença, principalmente úlcera péptica, sendo mandatária a erradicação da bactéria nestes casos.

No entanto, a infeção por *H. pylori* também está fortemente associada ao desenvolvimento de cancro do estômago contribuindo de um modo decisivo para esta situação, a inflamação crónica causada por esta bactéria [235], através de diversos mecanismos [236], muitos deles ainda desconhecidos. De entre estes, a indução da COX-2 que é expressa na mucosa com inflamação, tem um papel crucial na génese tumoral, ativando a sinalização da prostaglandina E2 (PGE2) [237]. Na verdade, neste contexto tem sido descrito que no tecido neoplásico gástrico, a COX-2 se encontra fortemente expressa e as vias da COX-2 e da PGE2 ativadas de modo continuado [238].

A ausência até ao momento de uma vacina eficaz, os elevados custos das terapêuticas de erradicação com antimicrobianos, impossíveis de serem utilizadas em larga escala e de um modo prolongado (efeitos secundários, aparecimento de resistências, elevado custo), justificam a necessidade de se encontrarem alternativas. Neste âmbito, o uso de fármacos inibidores da COX-2 (AINEs), embora lógico, também não é uma opção tendo em conta os seus múltiplos efeitos secundários.

Pelo contrário, no domínio dos alimentos funcionais e/ou nutracêuticos (terapêutica alternativa), estes podem ser utilizados em larga escala, desde a infância, fundamentalmente num contexto da prevenção secundária, com a intenção de impedir o desenvolvimento/progressão de condições/lesões pré-neoplásicas.

Assim, a utilização destes produtos para combater os efeitos deletérios da bactéria parece lógica e promissora, nomeadamente devido ao seu baixo custo, à acessibilidade e à segurança que apresentam no consumo a longo prazo. No entanto, os estudos em que se utilizaram alimentos funcionais/nutracêuticos para tratar a infeção por *H. pylori* têm tido limitações importantes, nomeadamente o diminuto número de estudos em humanos, bem como a heterogeneidade da sua eficácia *in vivo* e *in vitro*.

Apesar destas importantes limitações, o resultado global é promissor no que respeita à redução da inflamação da mucosa e aos efeitos secundários comparativamente às terapêuticas convencionais. Na verdade, diversas terapêuticas alternativas provaram ser úteis na manutenção de baixos níveis bacterianos, no controlo da inflamação, modulando a resposta imune, inibindo a aderência ao epitélio gástrico e neutralizando alguns dos fatores de virulência bacteriana, tais como a enzima urease e a toxina vacuolizante [239-240].

Assim, apesar de não haver evidência que tratamentos alternativos (não convencionais) erradiquem *H. pylori*, a maioria dos estudos demonstraram que alguns alimentos funcionais/nutracêuticos, de que é exemplo a curcumina, têm excelente efeito anti-inflamatório, imunomodulador e de um modo geral uma atividade gastroprotetora, apesar da permanência da bactéria.

Deste modo, como já foi previamente mencionado, os alimentos funcionais/nutracêuticos poderão ser utilizados preferencialmente na modulação da inflamação da mucosa gástrica, num contexto de prevenção secundária, enquanto uma vacina não estiver disponível.

Foi com este objetivo, que após desenvolvermos um modelo crónico estável de infeção crónica em ratinhos, optámos não só por confirmar a resposta inflamatória da mucosa gástrica na presença de *H. pylori*, como demonstrar também a atividade anti-inflamatória do nutraceutico curcumina quer a nível histológico quer a nível molecular.

A opção pela curcumina, que é um fitoquímico que ocorre naturalmente e que constitui um extrato de *Curcuma longa* (açafreão-da-terra), deveu-se às suas conhecidas propriedades farmacológicas, nomeadamente anti-inflamatórias,

antioxidantes e anticarcinogénicas, devidamente documentadas em animais [241] e também em humanos [242].

De um modo simplificado, podemos dizer que há dois mecanismos principais através dos quais o micro-organismo pode induzir inflamação na mucosa gástrica: 1. Produção de lesão direta no contacto com as células epiteliais da superfície gástrica e indução da libertação de mediadores pró-inflamatórios (quimiocinas); 2. Acesso às camadas mais profundas da mucosa induzindo a libertação de citocinas [243].

O nosso trabalho, à semelhança de outros [244 - 246], demonstrou nos ratinhos infetados, um aumento significativo da expressão de diversas quimiocinas habitualmente envolvidas na gastrite induzida por *H. pylori*, tais como a CCL20, CCL5, CXCL1, CXCL10, CXCL11 e CCL25. De igual modo, verificou-se um aumento significativo da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Estes mediadores encontram-se habitualmente envolvidos na imunidade inata e são responsáveis pelo recrutamento e ativação dos leucócitos no local da inflamação [247 - 248]. O tratamento dos ratinhos com curcumina diminuiu de forma significativa a expressão de todos estes mediadores da inflamação.

Ainda no domínio da imunidade inata, os recetores *Toll-like* (TLRs) são moléculas fundamentais na interação entre *H. pylori* e as células dendríticas (DCs). Esta interação é realizada através de uma proteína comum (MyD88) para todos os TLRs, à exceção do TLR3 [249]. No nosso trabalho a infeção pelo *H. pylori* aumentou não só a expressão de MyD88, bem como da grande maioria dos TLRs. O tratamento com curcumina dos ratinhos infetados normalizou a expressão de todos estes mediadores.

Assim, o nosso trabalho, pioneiro da demonstração “in vivo” das propriedades anti-inflamatórias da curcumina em contexto de infeção crónica no animal de experiência, põe em evidência que o consumo de polifenóis na dieta poderá eventualmente constituir uma abordagem nutricional no controlo dos efeitos deletérios da inflamação gástrica provocada pelo *H. pylori* em humanos enquanto se aguarda pela descoberta de uma vacina eficaz.

Na verdade, os nutracêuticos, como a curcumina, são reconhecidos atualmente como potencialmente benéficos em múltiplas patologias, nomeadamente pelas suas propriedades anti-inflamatórias [250]. O mecanismo de ação destes produtos envolve uma extensa gama de mecanismos biológicos, não completamente conhecidos, mas que seguramente tem propriedades anti-inflamatórias sem os efeitos nocivos dos anti-inflamatórios não esteroides.

Os resultados do nosso estudo, confirmaram que a infeção crónica pelo *H. pylori* aumenta a expressão de COX-2 [251]. Este aumento, observado a nível de expressão de mRNA e também a nível de expressão proteica, verificou-se logo na 6ª semana após infeção tendo um resultado semelhante sido observado nas 18ª e 27ª semanas. O tratamento com curcumina inibiu de um modo persistente, a expressão de COX-2 (mRNA e proteína) durante todo o estudo.

Assim, consideramos relevantes os resultados por nós obtidos, visto que o aumento descontrolado da expressão de COX-2 pode induzir lesão tecidual e crescimento tumoral e a sua supressão relacionar-se com a inibição do crescimento de células de carcinoma gástrico [252].

Deste modo, podemos inferir que a suplementação da dieta com curcumina em humanos, poderá eventualmente contribuir para a redução da inflamação da mucosa gástrica induzida por *H. pylori*. Este fato pode ser da maior importância, nomeadamente em áreas de alta prevalência de infeção (com acesso restrito a outros tratamentos dispendiosos com múltiplos efeitos secundários impossíveis de utilizar em larga escala), ao contribuir para a diminuição dos efeitos nefastos da inflamação crónica da mucosa gástrica, nomeadamente a eventual progressão para cancro do estômago.

Assim, a utilização da curcumina deverá ser considerada como uma abordagem com interesse terapêutico, fundamentalmente no âmbito da prevenção secundária.

7. CONCLUSÕES

1 - O modelo experimental pioneiro de infeção crónica por *H. pylori* por nós utilizado, demonstrou ser eficaz e o teste respiratório com ^{13}C -Ureia um método fidedigno, não só na confirmação da infeção dos ratinhos, mas também na sua monitorização ao longo de todo o período de experimentação. A utilização deste método de diagnóstico permitiu ainda evitar o sacrifício dos animais para confirmação da presença de *H. pylori*.

2 - Demonstrámos de modo pioneiro que a infeção por *H. pylori* afeta a expressão e atividade da via de sinalização do BMP. A ativação desta via de sinalização aumentou a expressão de CDX2 e reduziu a expressão de SOX2 podendo deste modo ser um contributo importante para o desenvolvimento da metaplasia intestinal.

3- Os nossos trabalhos experimentais, igualmente pioneiros, de demonstração “in vivo” das propriedades anti-inflamatórias da curcumina em contexto de infeção crónica, evidenciaram que o consumo de polifenóis na dieta poderá constituir uma abordagem terapêutica no controlo dos efeitos deletérios da inflamação gástrica provocada por *H. pylori*.

8. FUTURAS ÁREAS DE INVESTIGAÇÃO

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente sobre a utilização de nutracêuticos na redução da colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori* e simultaneamente na inflamação provocada por esta bactéria.

Relativamente ao desenvolvimento de futuras áreas de investigação com curcumina, no âmbito da infeção por *H. pylori*, torna-se necessário:

- 1) Resolver a limitação evidenciada em alguns estudos pela ausência de padronização dos ingredientes ativos e falta de testes rigorosos para avaliação da sua eficácia, nomeadamente nos estudos em humanos;
- 2) Minimizar a baixa dissolução e instabilidade química deste nutracêutico através de sistemas de libertação para aumentar a seletividade, especificidade e rapidez. Deste modo, podem obter-se maiores concentrações de curcumina no local de ação e assim aumentar significativamente a sua biodisponibilidade. Neste contexto, têm também sido desenvolvidos com sucesso novas formulações e sistemas baseados em nanotecnologia ou mesmo associação com outras moléculas que melhoram a sua absorção têm também sido desenvolvidos recentemente com sucesso [253];
- 3) Verificar através de ensaios clínicos em humanos, se o tratamento com curcumina pode impedir a transformação da mucosa de tipo gástrico em mucosa de tipo intestinal, através do aumento da expressão de SOX2 (o inibidor natural da CDX2) ou mesmo por intermédio da repressão direta de CDX2.
- 4) Verificar se num futuro próximo, a administração de curcumina em humanos, pode impedir o desenvolvimento/progressão de metaplasia intestinal. Em caso afirmativo, os nossos resultados experimentais poderiam constituir uma mais valia, no âmbito da prevenção secundária da infeção.

- 5) Testar em humanos, o potencial efeito da curcumina na evolução da metaplasia intestinal em doentes que necessitem de realizar a erradicação de *H. pylori*.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Kidd M and Modlin IM. A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. *Digestion* 1998;59(1):1-15. DOI: 10.1159/000007461
- 2 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;323(8390):1311–1315. DOI:10.1016/S0140-6736(84)91816-6.
- 3 Warren JR. *Helicobacter*: the ease and difficulty of a new discovery (Nobel lecture). *ChemMedChem* 2006;1(7):672-85. DOI: 10.1002/cmdc.200600121
- 4 Owen RJ. *Helicobacter*- species classification and identification. *Br Med Bull* 1998;54(1):17-30. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011667.
- 5 Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Campylobacter* and *Helicobacter*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston 1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8417/>
- 6 Correa P, Willis D, Allison M and Gerszten E. *Helicobacter pylori* in pre-Colombian mummies. *Gastroenterology* 1998;114:A956-G3919. DOI: 10.1016/s0016-5085(98)83893-6.
- 7 Blaser MJ, Chen Y, Reibman J. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? *Gut* 2008;57(5):561-567. DOI: 10.1136/gut.2007.133462.
- 8 Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2017; 153(2): 420-429. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.04.022.
- 9 Oleastro M, Pelerito A, Nogueira P et al. Prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* Infection in a healthy pediatric population in the Lisbon area. *Helicobacter* 2011;16(5):363-372. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00858.x.
- 10 Kivi M, Tindberg Y, Sörberg M et al. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5604–5608. DOI: 10.1128/jcm.41.12.5604-5608.2003.

- 11 Tindberg Y, Bengtsson C, Granath F et al. Helicobacter pylori infection in Swedish school children: lack of evidence of child-to-child transmission outside the family. *Gastroenterology* 2001;121(2): 310–316. DOI: 10.1053/gast.2001.26282.
- 12 Delport W, Cunningham M, Olivier B et al. A population genetics pedigree perspective on the transmission of Helicobacter pylori. *Genetics* 2006; 174(4):2107–2118. DOI: 10.1534/genetics.106.057703.
- 13 Schwarz S, Morelli G, Kusecek B et al. Horizontal versus familial transmission of Helicobacter pylori. *PLoS Pathog* 2008;4(10):e1000180. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000180.
- 14 Rizzatti G, Matteo MV, Ianiro G, et al. Helicobacter pylori in metabolic related diseases. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2018;64:297-309. DOI: 10.23736/S1121-421X.18.02490-X.
- 15 Gravina AG, Zagari RM, De Musis C et al. Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review. *World J Gastroenterol* 2018;24(29):3204-3221. DOI: 10.3748/wjg.v24.i29.3204
- 16 Capurso G, Lahner E, Marcheggiano A, et al. Involvement of the corporal mucosa and related changes in gastric acid secretion characterize patients with iron deficiency anemia associated with Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(11):1753–1761. DOI: 10.1046/j.1365-2036.2001.01101.x.
- 17 Pelicano R, Franceschi F, Saracco G et al. Helicobacters and extragastric diseases. *Helicobacter* 2009;14(suppl 1):58–68. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2009.00699.x.
- 18 Arnold DM, Bernotas A, Nazi I, et al. Platelet count response to H. pylori treatment in patients with immune thrombocytopenic purpura with and without H. pylori infection: a systematic review. *Haematologica* 2009; 94(6): 850–856. DOI: 10.3324/haematol.2008.005348.
- 19 Franceschi F, Navarese EP, Mollo R, et al. Helicobacter pylori and atherosclerosis. A review of the literature. *Recent Progr Med* 2009;100(2): 91–96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350802>.
- 20 Rogha M, Nikvarz M, Pourmoghaddas Z et al. Is Helicobacter pylori infection a risk factor for coronary heart disease? *ARYA Atheroscler* 2012; 8(1): 5–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3448393/>

- 21 Isaeva GSH, Abuzarova ER, Valeeva IUV et al. Helicobacter pylori in patients with disorders of hepatobiliary system. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2009;2:96–101. <http://europepmc.org/abstract/MED/19459487>
- 22 Pirouz T, Zounubi L, Keivani H et al. Detection of Helicobacter pylori in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. Dig Dis Sci 2009; 54(7):1456–1459. DOI: 10.1007/s10620-008-0522-5.
- 23 Zhou X, Zhang C, Wu J, Zhang G. Association between Helicobacter pylori infection and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. Diabetes Res Clin Pract 2013; 99(2):200–208. DOI: 10.1016/j.diabres.2012.11.012.
- 24 Shin DW, Kwon HT, Kang JM et al. Association between metabolic syndrome and Helicobacter pylori infection diagnosed by histologic status and serological status. J Clin Gastroenterol 2012;46(10):840–845. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3182522477.
- 25 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report Gut 2017;66:6-30. DOI:10.1136/gutjnl-2016-312288
- 26 Kabamba ET, Tuan VP, Yamaoka Y. Genetic populations and virulence factors of Helicobacter pylori. Infection, Genetics and Evolution 2018;60: 109-116. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.02.022.
- 27 Chang W-L, Yeh Y-C, Sheu B-S. The impacts of H. pylori virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. J Biomed Sci 2018; 25(1):1-9. DOI: 10.1186/s12929-018-0466-9.
- 28 Kim JM. H. pylori Virulence Factors: Toxins (CagA, VacA, DupA, OipA, IceA). In: Kim N. (eds) Helicobacter pylori 2016:77-88. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-287-706-2_5.
- 29 Kabamba ET, Tuan VP, Yamaoka Y. Genetic populations and virulence factors of Helicobacter pylori. Infect Genet Evol 2018;60:109-116. doi:10.1016/j.meegid.2018.02.022.
- 30 Linz B, Windsor H, McGraw J. et al. A mutation burst during the acute phase of Helicobacter pylori infection in humans and rhesus macaques. Nat Commun 2014;5:4165. <https://doi.org/10.1038/ncomms5165>.

- 31 Amieva, M R and El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2008;134(1):306-23.
- 32 Clyne M, Rowland M. The Role of Host Genetic Polymorphisms in *Helicobacter pylori* Mediated Disease Outcome. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2019. pp 1-22. Springer, New York, NY. DOI: 10.1007/5584_2019_364.
- 33 Mard SA, Khadem H, Sebghatulahi V, Ahmadi B. Dietary Factors in Relation to *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterol Res Pract* 2014; 826910. Doi:10.1155/2014/826910.
- 34 Haixin M, Hongbin T. Vitamin C and *Helicobacter pylori* Infection: Current Knowledge and Future Prospects. *Front Physiol* 2018;9:1103. DOI: 103389/fphys.2018.01103.
- 35 Hyunju K, Hyeyoung K. Astaxanthin and beta-caroten in *Helicobacter pylori*-induced Gastric Inflammation: A Mini-review on Action Mechanisms. *J Cancer Prev* 2017;22(2):57-61. DOI: 10.15430/JCP.2017.22.2.57
- 36 Loh JT, Beckett AC, Scholz MB, Cover TL. High-salt conditions alter transcription of *Helicobacter pylori* genes encoding outer membrane proteins. *Infect Immun* 2018; 86(3): e00626-17. DOI: 10.1128/IAI.00626-17.
- 37 Amilon KR, Letley DP, Winter JA, et al. Expression of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin A (*vacA*) is influenced by a potential stem-loop structure in the 5' untranslated region of the transcript. *Mol microbiol* 2015;98(5):831-846. DOI:10.1111/mmi.13160.
- 38 González CA, Pera G, Agudo A, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2003; 107: 629-634. DOI:10.1002/ijc.11426.
- 39 Simán JH, Forsgren A, Berglund G, Florén CH. Tobacco smoking increases the risk for gastric adenocarcinoma among *Helicobacter pylori*-infected individuals. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:208-213. DOI: 10.1080/003655201750065988
- 40 Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(25):14648–14653. DOI: 10.1073/pnas.93.25.14648.

- 41 Israel D, Peek R Jr. Mechanisms of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammation. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition). Academic Press: 1517 – 1545. DOI: 10.1016/B978-0-12-809954-4.00063-3.
- 42 Waskito L, Miftahussurur M, Lusida M, et al. Distribution and clinical associations of integrating conjugative elements and *cag* pathogenicity islands of *Helicobacter pylori* in Indonesia. Scientific Report 2018;8:6073. DOI:10.1038/s41598-018-24406-y.
- 43 Brandt S, Kwok T, Hartig R, et al. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(26):9300–9305. DOI: 10.1073/pnas.0409873102.
- 44 Franco A, Johnston E, Krishna U, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. Cancer Res 2008; 68:379–87. DOI: 10.1158/0008-5472.
- 45 van Doorn L, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998;115: 58–66. DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70365-8.
- 46 Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010; 7: 629–41. <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2010.154>
- 47 Kim J, Kim J, Jung H, et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* in Korean isolates do not influence proinflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human gastric epithelial cells, nor do these factors influence the clinical outcome. J Gastroenterol 2000; 35: 898–906. DOI: 10.1007/s005350070003.
- 48 Cover T, Blaser M. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 1992; 267: 10570–10575. <http://www.jbc.org/content/267/15/10570.short>
- 49 Wroblenski L, Peek R Jr, Wilson K. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev 2010;23(4): 713–739. DOI: 10.1128/CMR.00011-10.
- 50 Blaser M, Atherton J. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest. 2004; 113(3): 321–333. DOI: 10.1172/JCI20925.

- 51 Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270(30):17771–17777. DOI: 10.1074/jbc.270.30.17771.
- 52 Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133(3):926–936. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.056.
- 53 Li H, Xu CX, Zang LF, Huang LH. PBX1 attributes as a determinant of connexin 32 downregulation in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2017;23(29):5345-5355. DOI: 10.3748/wjg.v23.i29.5345.
- 54 Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7(11): 629–641. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.154
- 55 Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133(3):926–936. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.056
- 56 Basso D, Zambon CF, Letley DP, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135(1):91–99.
- 57 Sugimoto M, Yamaoka Y. The association of *vacA* genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(9): 835–842.
- 58 Ogiwara H, Graham DY, Yamaoka Y. *vacA* i-region subtyping. *Gastroenterology* 2008;134(4):1267. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.062.
- 59 Thi Huyen Trang T, Thanh Binh T, Yamaoka Y. Relationship between *vacA* types and development of gastroduodenal diseases. *Toxins* 2016; 8(6):182. DOI: 10.3390/toxins8060182.
- 60 Bakhti SZ, Latifi-Navid S, Mohammadi S, et al. Relevance of *Helicobacter pylori* *vacA* 3'-end region polymorphism to gastric cancer. *Helicobacter* 2016;21:305–316. DOI: 10.1111/hel.12284.

- 61 Cheng XJ, Yan J, Shen YF. Dominant *cagA/vacA* genotypes and coinfection frequency of *H. pylori* in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang Province and correlations among different genotypes, coinfection and severity of the diseases. *Chin Med J* 2005;118(6):460-467. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788126>.
- 62 Jeyamani L, Jayarajan J, Leelakrishnan V, Swaminathan M. *CagA* and *VacA* genes of *Helicobacter pylori* and their clinical relevance. *Indian J Pathol Microbiol* 2018;61:66-9. <http://www.ijpmonline.org/text.asp?2018/61/1/66/228163>
- 63 Ali P, Reza G, Hamed E, Mohammad J, et al. Risk of gastric cancer in association with *Helicobacter pylori* different virulence factors: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis* 2018;118: 214-219. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.03.004.
- 64 Brennan DE, Dowd C, O'Morain C, et al. Can bacterial virulence factors predict antibiotic resistant *Helicobacter pylori* infection? *World Journal of Gastroenterology* 2018;24(9):971-981. DOI: 10.3748/wjg.v24.i9.971.
- 65 Montecucco C & Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mo/ Cel/ Biol* 2001;2:457-466. <https://www.nature.com/articles/35073084>
- 66 Barer M, Elliot TS, Berkeley D, et al. Cytopathic effects of *Campylobacter pylori* urease. *J Clin Pathol*, 1988;41. DOI: 10.1136/jcp.41.5.597-a.
- 67 Wroblewski LE, Shen L, Ogden S, et al. *Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation. *Gastroenterology* 2009;136:236-246. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.011
- 68 Debowski AW, Walton SM, Chua EG, et al. *Helicobacter pylori* gene silencing in vivo demonstrates urease is essential for chronic infection. *PLoS Pathog* 2017;13(6): e1006464. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006464
- 69 De Reuse H, Vinella D, Cavazza C. Common themes and unique proteins for the uptake and trafficking of nickel, a metal essential for the virulence of *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2013;3:94. doi:10.3389/fcimb.2013.00094.
- 70 Denkhaus E, Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42(1): 35–56. DOI: 10.1016/s1040-8428(01)00214-1

- 71 Ge R-G, Wang D-X, Hao M-C, Sun X-S. Nickel trafficking system responsible for urease maturation in *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 2013;19(45):8211-8218. DOI: 10.3748/wjg.v19.i45.8211.
- 72 Lusi E, Santino I, Petrucca A, et al. The Human Nickel Microbiome and its relationship to Allergy and Overweight in Women. *bioRxiv* 546739. DOI: 10.1101/546739
- 73 Wustner S, Anderl F, Wanisch A, et al. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transferase contributes to colonization and differential recruitment of T cells during persistence. *Sci Rep* 2017 ;7(1): 13636. DOI: 10.1038/s41598-017-14028-1.
- 74 Hutton ML, D'Costa K, Rossiter AE, et al. A *Helicobacter pylori* homolog of eukaryotic flotillin is involved in cholesterol accumulation, epithelial cell responses and host colonization. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:219. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00219
- 75 El Mortaji L, Aubert S, Galtier E, et al. The sole DEAD-Box RNA helicase of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* is essential for colonization. *mBio* 2018; 9(2): e02071. DOI: 10.1128/mBio.02071-17.
- 76 Makristathis A, Hirschl AM, Mégraud F, Bessède E. Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2019;24(Suppl.1): e12641. DOI: 10.1111/hel.12641.
- 77 Mounsey A, Leonard EA. Noninvasive Diagnostic Tests for *Helicobacter pylori* infection. *Am Fam Physician* 2019 Jul 1;100(1):16-17. <https://www.aafp.org/afp/2019/0701/p16.html>.
- 78 Nishikawa Y, Ikeda Y, Murakami H, et al. Classification of atrophic mucosal patterns on Blue LASER Imaging for endoscopic diagnosis of *Helicobacter pylori*-related gastritis: a retrospective, observational study. *PLoS ONE*. 2018; 13(3): e0193197. DOI: 10.1371/journal.pone.0193197.
- 79 Itoh T, Kawahira H, Nakashima H, Yata N. Deep learning analyzes *Helicobacter pylori* infection by upper gastrointestinal endoscopy images. *Endosc Int Open*. 2018;6:E139-E144. DOI: 10.1055/s-0043-120830.
- 80 Kanemitsu T, Yao K, Nagahama T, et al. Extending magnifying NBI diagnosis of intestinal metaplasia in the stomach: the white opaque substance marker. *Endoscopy*. 2017;49:529-535. DOI: 10.1055/s-0043-103409.

- 81 Jorge Reis, Teresa Lopes, Sousa Guerreiro, et al. Detecção ultra-rápida do *Helicobacter pylori* (Hp). O valor do one-minute test. / Ultra rapid detection of *Helicobacter pylori* (Hp). Value of one-minute test. *Arquivos Hepato-Gastroenterológicos Portugueses* 1994;3:1(6): 5-8.
- 82 Sabbagh P, Mohammadnia-Afrouzi M, Javanian M et al. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:55-66. DOI: 10.1007/s10096-018-3414-4.
- 83 Mohammadian T and Ganji L. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy 2019;38(1). DOI: 10.1089/mab.2018.0032
- 84 Kotilea K, Bontems P, Touati E. Epidemiology, Diagnosis and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2019. Springer, New York.
- 85 Palau M, Piqué N, Comeau AM, et al. Detection of *Helicobacter pylori* Microevolution and Multiple Infection from Gastric Biopsies by Housekeeping Gene Amplicon Sequencing. *Pathogens* 2020;9,97. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020097>.
- 86 Klein PD, Graham DY. Minimum analysis requirements for the detection of *Helicobacter pylori* infection by the ¹³C-urea breath test. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1865-1869. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8237934>
- 87 Pinto A, Canena J, Reis J, et al. Infecção por *Helicobacter pylori* numa população de doentes com dispepsia não ulcerosa. *J Port Gastroenterologia* 1997;4:2(Suppl):28.
- 88 Santos A, Reis J, Canena J, et al. Can you keep ¹³C Urea breath test samples from your patients for long time? *Gastroenterology* 1997;112; Suppl: A278
- 89 Canena J, Reis J, Santos A, et al. ¹³C Urea breath test (UBT) in *Helicobacter pylori* mice model. *Gastroenterology* 1997; 12; Suppl: A82.
- 90 Best LMJ, Takwoingi Y, Siddique S, et al. Non-invasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018, Issue 3. Art. No. CD012080. DOI: 10.1002/14651858.CD012080.pub2.
- 91 Tepes B, Malfertheiner P, Labenz J, Aygen S. Modified *Helicobacter* test using a new test meal and a ¹³C-urea breath test in *Helicobacter pylori*

- positive and negative dyspepsia patients on proton pump inhibitors. Prospective Study. *World J Gastroenterol* 2017;23:5954-61. DOI: 10.3748/wjg.v23.i32.5954.
- 92 Sabbagh P, Mohammadnia-Afrouzi M, Javanian M et al. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection: ideals, options, and limitations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:55. DOI: 10.1007/s10096-018-3414-4.
- 93 El-Shabrawi M, El-Aziz NA, El-Adly TZ, et al. Stool antigen detection versus ¹³C-urea breath test for non-invasive diagnosis of pediatric *Helicobacter pylori* infection in a limited resource setting. *Arch Med Sci* 2018;14(1):69–73. DOI:10.5114/aoms.2016.61031.
- 94 Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, et al Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56:772-781. DOI: 10.1136/gut.2006.101634.
- 95 Federico A, Gravina AG, Miranda A, et al. Eradication of infection: Which regimen first? *WJG* 2014;20(3):665-72. DOI: 10.3748/wjg.v20.i3.665.
- 96 Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2013;62(1):34-42. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302254.
- 97 Oleastro M, Cabral J, Ramalho PM, et al. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from Portuguese children: a prospective multicentre study over a 10 year period. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011;66(10):2308-11. DOI: 10.1093/jac/dkr293
- 98 Osato MS, Reddy R, Reddy SG, et al. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or clarithromycin in the United States. *Arch Intern Med* 2001;161(9):1217-20. DOI:10.1001/archinte.161.9.1217.
- 99 McMahon BJ, Hennessy TW, Bensler JM, et al. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med* 2003;139(6): 463-9. DOI: 10.7326/0003-4819-139-6-200309160-00008
- 100 Cabrita J, Oleastro M, Matos R, et al. Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). *J Antimicrob Chemother* 2000;46(6):1029-31. DOI: 10.1093/jac/46.6.1029

- 101 Mégraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004;53:1374-1384. DOI: 10.1136/gut.2003.022111
- 101 Almeida N, Romãozinho JM, Donato MM et al. Helicobacter pylori antimicrobial resistance rates in the central region of Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(11):1127-1133. DOI: 10.1111/1469-0691.12701.
- 102 Lopo I, Libânio D, Pita I, et al. Helicobacter pylori antibiotic resistance in Portugal: Systematic review and meta-analysis. *Helicobacter* 2018;23: e12493. DOI: 10.1111/hel.12493.
- 103 Dang, B.N. and Graham, D.Y. Helicobacter pylori infection and antibiotic resistance: a WHO high priority? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14: 383–384. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.57.
- 104 Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW et al. ACG Clinical Guideline: treatment of Helicobacter pylori infection. *Am J Gastroenterol* 2018; 113(7): 212–239. DOI: 10.1038/s41395-018-0132-6.
- 105 Ikuse T, Blanchard TG, Czinn SJ. Inflammation, Immunity, and Vaccine Development for the Gastric Pathogen Helicobacter pylori. In: Backert S. (eds) *Molecular Mechanisms of Inflammation: Induction, Resolution and Escape by Helicobacter pylori*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2019; vol 421. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-030-15138-6_1.
- 106 D'Costa K, Chonwerawong M, Tran LS, Ferrero RL. Mouse Models Of Helicobacter Infection And Gastric Pathologies. *J Vis Exp* 2018;(140), e56985. DOI:10.3791/56985.
- 107 Lee JY. Animal Models of H. pylori Infection. In: Kim N. (eds) *Helicobacter pylori* 2016. Springer, Singapore. DOI:10.1007/978-981-287-706-2_55.
- 108 Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG. Establishment of gastric Campylobacter pylori infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect Immun* 1987;55:2789. <https://iai.asm.org/content/55/11/2789.short>.
- 109 Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C and Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes." *Infect Immun* 1996;64(7): 2445-8. <https://iai.asm.org/content/64/7/2445.short>.

- 110 Eaton KA, Kersulyte D, Mefford M, et al. Role of *Helicobacter pylori* cag region genes in colonization and gastritis in two animal models. *Infect Immun* 2011;69(5): 2902-8. DOI: 10.1128/IAI.69.5.2902-2908.2001.
- 111 Dubois A, Berg DE, Incecik ET, et al. Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease." *Infect Immun* 1996;64(8): 2885-91.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757808>
- 112 Dubois A, Fiala N, Heman-Ackah LM, et al. Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans." *Gastroenterology* 1994;106(6):1405-17.
[https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(94\)90392-1/abstract](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(94)90392-1/abstract)
- 113 Dubois A, Lee CK, Fiala N, et al. Immunization against natural *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *Infect Immun* 1998; 66(9): 4340-6. <https://iai.asm.org/content/66/9/4340.short>
- 114 Mysore JV, Wigginton T, Simon PM, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology* 1999;117(6):1316-25. DOI: 10.1016/s0016-5085(99)70282-9
- 115 Solnick JV, Canfield DR, Hansen LM and Torabian SZ. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease in specific - pathogen-free rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immun* 2000;68(5):2560-5. DOI: 10.1128/iai.68.5.2560-2565.2000.
- 116 Rossi G, Rossi M, Vitali CG, et al. A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1999; 67(6):3112-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338528>.
- 117 Perkins SE, Fox JG, Marini RP, Shen Z, Dangler CA and Ge Z. Experimental infection in cats with a cagA+ human isolate of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1998;3(4): 225-35. DOI: 10.1046/j.1523-5378.1998.08037.x.
- 118 Esteves MI, Schrenzel MD, Marini RP, et al. *Helicobacter pylori* gastritis in cats with long-term natural infection as a model of human disease. *Am J Pathol* 2000;156(2):709-21. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64774-8.
- 119 Simpson KW, Strauss-Ayali D, Straubinger RK, et al. *Helicobacter pylori* Infection in the Cat: Evaluation of Gastric Colonization, Inflammation and

Function. *Helicobacter* 2001; 6(1): 1-14. DOI: 10.1046/j.1523-5378.2001.00010.x.

- 120 Neiger R and Simpson KW. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *J Vet Intern Med* 2000;14(2):125-33. DOI: 10.1892/0891-6640(2000)014<0125:iidacf>2.3.co;2.
- 121 Strauss-Ayali D, Scanziani E, Deng D and Simpson KW. *Helicobacter* spp. infection in cats: evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric *Helicobacter* spp. *Vet Microbiol* 2001;79(3):253-65. DOI: 10.1186/1297-9716-42-42.
- 122 Cantorna MT, Balish E. Inability of human clinical isolates of *Helicobacter pylori* colonize the alimentary tract of germ-free rodents. *Can J Microbiol* 1990;36:237. DOI: 10.1139/m90-041.
- 123 Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S. Isolation of a spiral shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun* 1988; 56: 2843. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3169989>.
- 124 Lee A, Chen MH, Coltro N. Long term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induced atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Med Microbiol* 1990;280:38. DOI: 10.1016/s0934-8840(11)80939-4.
- 125 Dick-Hegedus E, Lee A. Use of a mouse model to examine anti-*Helicobacter pylori* agents. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:909-15. DOI: 10.3109/00365529108996241.
- 126 Lee A, Fox JG, Hazell SL. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect Immun* 1993;61:1601-1610. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8478048>.
- 127 Karita M, Kouchiyama T, Okita K and Nakazawa T. New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: Success in both nude and euthymic mice. *Am J Gastroenterol* 1991; 86:1596 – 1603. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1951236>.
- 128 Marchetti M, Arico B, Burroni D. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995; 267:1655-1658. DOI: 10.1126/science.7886456.
- 129 McColm AA, Bagshaw J, O'Malley C. Development of a mouse model of gastric colonization with *Helicobacter pylori*. *Gut* 1995;37(Suppl 1): A50.

- 130 Brzozowski T, Konturek P, Karczewska E, et al. The mouse model of infection with cytotoxin expressing strain of *Helicobacter pylori* in studying the pathogenesis of chronic gastric ulcer. *Gut* 1996;39(Suppl 3): A101 (572).
- 131 Wang X, Sjunnesson H, Sturegard E, Wadstrom T, Willen R, Aleljung P. Dietary components influences the ability to recover *H. pylori* from infected Balb/c mice. *Gut* 1997;41(Suppl 1): A442.
- 132 Michetti P, Wadstrom T, Kraehenbuhl JP, et al. Frontiers in *Helicobacter pylori* research-pathogenesis, host response, vaccine development and new therapeutic approaches. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:717-722.
- 133 Lee A, O'Rourke J, DeUngria MC, et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterol* 1997;112(4):1386-1397.
- 134 Murata H, Mitsuji S, Suetsugu S, et al. Endoscopic examination of *Helicobacter pylori* infected gastric ulcer model in the Mongolian gerbils. *Gastroenterol* 1997; 112 (Suppl): A732.
- 135 Ge Z, Sheh A, Feng Y, et al. *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice with different gastrointestinal microbiota have contrasting gastric pathology, microbial and host immune responses *Sci Rep* 2018;8:8014 DOI:10.1038/s41598-018-25927-2.
- 136 Ranjbar R, Mohammadi A. Synergistic effects of combined curcumin and antibiotic in ameliorating an animal model of *Helicobacter pylori* infection. *Biomedical Research* 2018;29(8):1702-1707. DOI: 10.4066/biomedicalresearch.29-18-277
- 137 McClements DJ. Recent developments in encapsulation and release of functional food ingredients: delivery by design. *Current opinion in Food Science* 2018; 23(1):80-84. DOI: 10.1016/j.cofs.2018.06.008.
- 138 Yeung AWK, Mocan A, Atanasov AG. Let food be thy medicine and medicine be thy food: A bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. *Food Chem.* 2018 Dec 15; 269:455-465. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.139. Epub 2018 Jun 30.

- 139 Srivastava RK. Need of Nutraceuticals / Functional Food Products for Health Benefits to World-Wide People. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science* 2018;1(4): 1-13. DOI: 10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2408.
- 140 Mozaffarian D., Wu J.H. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 58: 2047–2067. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.06.063.
- 141 Sahin I, Bilir B, Ali S, et al. Soy Isoflavones in Integrative Oncology: Increased Efficacy and Decreased Toxicity of Cancer Therapy. *Integr Cancer Ther* 2019;18:1534735419835310. DOI: 10.1177/1534735419835310.
- 142 Aghajanpour M, Reza M, Zia N Obeidavi, Moradi N. Functional foods and their role in cancer prevention and health promotion: A comprehensive review. *American Journal of Cancer Research* April 2017;7(4):740-769. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469951>.
- 143 Gupta S, Chauhan D, Mehla K, et al. An overview of nutraceuticals: current scenario. *J Basic Clin Pharma* 2010; 1(2):55-62. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3979184/>
- 144 Kwak N, Jukes DJ. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control.* v. 12, p.99-107, 2001. DOI: 10.1016/S0956-7135(00)00028-1
- 145 Andlauer W, Fürst P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International* 2002;35(2-3): 171-176, 2002. DOI: 10.1016/S0963-9969(01)00179-X.
- 146 Roberfroid M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease* 2002;34(2): 105-110, 2002. DOI: 10.1016/s1590-8658(02)80176-1.
- 147 Hungenholtz J, Smith EJ. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 2002;13:497-507. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00367-1.
- 148 Zhao J. Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application. *Recent Pat Biotechnol* 2007; 1(1):75-97.

- 149 Janeway CA, Travers P, Walport Mark, Shlomchik M. *Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença*, 5ª ed, Editora Artmed, 2002.
- 150 Yatim, K.M.; Lakkis, F.G. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10: 1274–1281. DOI: 10.2215/CJN.10031014.
- 151 Rudin CM, Thompson CB. B-Cell Development and Maturation. *Seminars in Oncology* 1998; 25(4): 435-46.
- 152 Cruvinel WDM, Júnior DM, Antonio J et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória, *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010;50(4):434-447. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008> 55(11).
- 153 László M, Notarangelo LD. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nature Rev Immunology* 2007;7:851-61. <https://doi.org/10.1038/nri2195>.
- 154 Martí A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune function relationships. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*. *Obes Rev* 2001; 2:131–140. DOI: 10.1046/j.1467-789x.2001.00025.x
- 155 Van Lochem EG, Van der Velden VHJ, Wind HK, et al. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes And Disease-Induced Shifts. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;60(1):1-13. DOI: 10.1002/cyto.b.20008.
- 156 McHeyzer-Williams MG: B cells as effectors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15(3): 354-61. DOI: 10.1016/s0952-7915(03)00046-3.
- 157 Gray D, Gray M, Barr T. Innate responses of B cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(12):3304-10. DOI: 10.1002/eji.200737728.
- 158 Wen L, Roberts SJ, Viney JL, Wong FS, Mallick C, Findly RC. Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in alpha beta(+) T cells. *Nature* 1994;369(6482): 654-8. DOI: 10.1038/369654a0.
- 159 Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int J Celiac Dis*. 2016,3,151–155. DOI: 10.12691/ijcd-3-4-8.

- 160 Nilius B, Appendino G. Spices: The savory and beneficial science of pungency. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2013;164:1–76. DOI: 10.1007/112_2013_11.
- 161 Yadav VS, Mishra KP, Singh DP, et al. Immunomodulatory Effects of Curcumin, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2008;27(3):485-497. DOI: 10.1080/08923970500242244.
- 162 Estrela JM, Mena S, Obrador E, et al. Polyphenolic phytochemicals in cancer prevention and therapy: Bioavailability versus bioefficacy. *J Med Chem* 2017;60(23): 9413 – 9436. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01026.
- 163 Annuzzi G, Bozzetto L, Costabile G, et al. Diets naturally rich in polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: A randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2014;99(3): 463–471. DOI: 10.3945/ajcn.113.073445.
- 164 Jagetia GC and Aggarwal BB. ‘Spicing up’ of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol* 2007;27:19–35.
- 165 Kim GY, Kim KH, Lee SH, et al. Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-kappa B as potential targets. *J Immunol* 2005;174:8116–8124.
- 166 Gradisar H, Keber MM, Pristovsek P and Jerala R. MD-2 as the target of curcumin in the inhibition of response to LPS. *J Leukoc Biol* 2007;82:968–974.
- 167 Lubbad A, Oriowo MA and Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem* 2009;322:127–135.
- 168 Chearwae W and Bright JJ. 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and curcumin modulate the expression of Toll-like receptors 4 and 9 in autoimmune T lymphocyte. *J Clin Immunol* 2008;28:558–570.
- 169 Lingfeng Chen, Weitao Fu, Lulu Zheng, et al. Recent progress in the discovery of myeloid differentiation 2 (MD2) modulators for inflammatory diseases. *Drug Discovery Today*; 23 (6):1187-1202. doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.015.
- 170 Bordignon R, Volpato A, Glombowsky P, et al. Nutraceutical effect of vitamins and minerals on performance and immune and antioxidant

systems in dairy calves during the nutritional transition period in summer. *J. Therm Biol* 2019; 84:451-459.

- 171 Aggarwal B, Surh Y-J, Shishodia S (2007). *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. Springer, Boston, MA. DOI: 10.1007/978-0-387-46401-5.
- 172 B.B. Aggarwal, Y. Takada, and O. V. Oommen. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opin Invest Drugs* 2004;13:1327–1338.
- 173 Akerele O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum* 1993;14(4):390-5.
- 174 Rates SM. Plants as a source of drugs. *Toxic* 2001;39(5):603-613. DOI: 10.1016/s0041-0101(00)00154-9.
- 175 Al Mofleh IA. Spices, herbal xenobiotics and the stomach: friends or foes? *World J Gastroenterol* 2010;16: 2710-2719. DOI: 10.3748/wjg.v16.i22.2710
- 176 Silva NCC, Fernandes JÁ. Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2010;16:402-413.
- 177 Dikid T, Jain SK, Sharma A, et al. Emerging and re-emerging infections in India: An overview. *Indian J Med Res* 2013;138:19-31.
- 178 Cassel-Beraud AM, Le Jan J, Mouden JC et al. Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity in vitro of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1991;59:9-23.
- 179 Higuchi K, Arakawa T, Ando K, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* with a Chinese herbal medicine without emergence of resistant colonies. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1419-1420. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01419.x
- 180 Ankli A, Heinrich M, Bork P, et al. Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 43-52. DOI: 10.1016/S0378-8741(01)00355-5
- 181 Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H t al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal

- disorders. *J Ethnopharmacol* 2009;122: 402-405. DOI: 10.1016/j.jep.2008.12.021
- 182 Robles-Zepeda RE, Velázquez-Contreras CA, Garibay-Escobar A et al. Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against *Helicobacter pylori*. *J Med Food* 2011; 14: 1280-1283. DOI:10.1089/jmf.2010.0263.
- 183 Nariman F, Eftekhari F, Habibi Z, Falsafi T. Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. *Helicobacter* 2004; 9: 146-151. DOI: 10.1111/j.1083-4389.2004.00211.x
- 184 Hajimahmoodi M, Shams-Ardakani M, Saniee P, et al. In vitro antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Nat Prod Res* 2011; 25: 1059-1066. DOI: 10.1080/14786419.2010.501763
- 185 Wang YC, Huang TL. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43:295-300. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.09.008
- 186 Fabry W, Okemo P, Ansorg R. Activity of east African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy* 1996;42: 315-317. DOI: 10.1159/000239460
- 187 Ndip RN, Malange Tarkang AE, Mbullah SM, et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J Ethnopharmacol* 2007;114:452-457. DOI:10.1016/j.jep.2007.08.037
- 188 Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J Ethnopharmacol* 2003;88:175-179. DOI: 10.1016/S0378-8741(03)00217-4
- 189 Abdallah EM. Plants: An alternative source for antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences* 2011;1:16-20
- 190 Ahamed F, Chandrappa NR, Abdallah EM. A comparative study of diagnosis methods for detection of *Helicobacter Pylori* in gastro-duodenal diseases in human. *Ulutas Med J* 2015;1:64-67.
- 191 Tadjrobehkar O, Abdollahi H. Novel reduction strategy of Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7:e13081
- 192 Moghaddam MN. In vitro Inhibition of *Helicobacter pylori* by some spices and medicinal plants used in Iran. *Global Journal of Pharmacology* 2011;5:176-180.

- 193 Rahmani AH, Shabrmi FM, Aly SM. Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014;6:125–36. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057339>
- 194 Al-Bukhari, M.I., 1976. Division (71) on Medicine. In: *The Collection of Authentic Sayings of Prophet Mohammad (Peace be upon him)*. Al-Bukhari, S. (Ed.), 2nd Edn., Hilal Yayinlari, Ankara, Turkey
- 195 Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol* 1978;43:86–92. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1978.tb02240.x.
- 196 Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*. 2006; 6: 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-10>.
- 197 Aggarwal B. et al. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 2019;30(2): 85 – 94. DOI: 10.1016/j.tips.2008.11.002.
- 198 He Y, Yue Y, Zheng X, et al. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: How are they linked? *Molecules* 2015;20:9183–213. DOI: 10.3390/molecules20059183
- 199 Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol* 2015;83:111–24. DOI: 10.1016/j.fct.2015.05.022
- 200 Zandi K, Ramedani E, Mohammadi K, et al. Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line. *Nat Prod Commun* 2010;5:1935–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21299124>
- 201 Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res Int* 2014;2014:186864. DOI: 10.1155/2014/186864.
- 202 Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane) *Free Radic Biol Med*. 2007;43:568–80. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.009.

- 203 Kunnumakkara AB, Sailo BL, Banik K et al. Chronic diseases, inflammation and spices: How are they linked? *J Transl Med* 2018,16(1):14. DOI: 10.1186/s12967-018-1381-2
- 204 Liu Y, Chen L, Shen Y et al. Curcumin ameliorates ischemia-induced limb injury through immunomodulation. *Med Sci Monit* 2016;22: 2035–42
- 205 Vaure, C.; Liu, Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.* 2014, 5, 316.
- 206 Kumar S, Sunagar R and Gosselin E. Bacterial Protein Toll-Like Receptor Agonists: A Novel Perspective on Vaccine Adjuvants. *Front Immunol* 2019; 1144. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01144
- 207 Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G et al. Curcumin, the golden nutraceutical: Multitargeting for multiple chronic diseases. *Br. J. Pharmacol* 2017,174,1325–1348.
- 208 Judaki A, Rahmani A, Feizi J et al. Curcumin in combination with triple therapy regimes ameliorates oxidative stress and histopathologic changes in chronic gastritis-associated *Helicobacter pylori* infection. *Arquivos de Gastroenterologia* 2017;54(3):177-182. DOI: 10.1590/s0004-2803.201700000-18
- 209 Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347:1175–1186.
- 210 Gupta, S.C.; Patchva, S.; Aggarwal, B.B. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J.* 2013, 15, 195–218
- 211 Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* 2011;16, 4567–4598.
- 212 Luca SV, Macovei I, Bujor A et al. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Crit Rev Food Sci Nutr*;2019: 1–34
- 213 Sharma RA, Euden SA, Platton SL et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004;10: 6847–6854.
- 214 Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 2889–2895
- 215 Neerati P, Devde R, Gangi AK. Evaluation of the effect of curcumin capsules on glyburide therapy in patients with type-2 diabetes mellitus.

- Phytother Res 2014;28(12):1796-800. DOI: 10.1002/ptr.5201. Epub 2014 Jul 17.
- 216 Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA et al. . Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca²⁺ signaling. *Biochem Pharmacol.* 1999 Oct 1;58(7):1167-72
- 217 Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Chaves P, Cordeiro R, Ferreira M, Pereira T, Machado J, Guerreiro AS. Role of ¹³C-urea breath test in experimental model of *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter.* 2011;16(4):320-6. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00847.x.
- 218 Pimentel-Nunes P, Libânio D, Marcos-Pinto R, Areia M et al. Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European *Helicobacter* and Microbiota Study Group (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED) guideline update 2019 *Endoscopy* 2019;51(4): 365-388. DOI: 10.1055/a-0859-1883.
- 219 Suh E and Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996;16:619–625.
- 220 Mesquita P, Raquel A, Nuno L et al. Metaplasia—a transdifferentiation process that facilitates cancer development: the model of gastric intestinal metaplasia. *Crit Rev Oncog* 2006;12:3–26.
- 221 Almeida R, Silva E, Santos-Silva F et al.. Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol* 2003;199:36–40.
- 222 Barros R, Pereira B, Duluc I et al. Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *J Pathol* 2008;215:411–420.
- 223 Barros R, Marcos N, Reis CA et al. CDX2 expression is induced by *Helicobacter pylori* in AGS cells. *Scand. J. Gastroenterol* 2009;44:124–125.
- 224 Manzo BA, Crabtree JE, Campbell MF et al. *Helicobacter pylori* regulates the expression of inhibitors of DNA binding (Id) proteins by gastric epithelial cells. *Microbes Infect* 2006;8:1064–1074.
- 225 Benahmed F, Gross I, Gaunt SJ et al. Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse *Cdx2* homeobox gene. *Gastroenterology* 2008;135:1238–1247
- 226 Beck F. Homeobox genes in gut development. *Gut* 2002;51:450-454.

- 227 Niu H, Jia ., Li, T. et al. SOX2 Inhibition Promotes Promoter Demethylation of CDX2 to Facilitate Gastric Intestinal Metaplasia. *Dig Dis Sci* 2017; 62: 124–132. DOI: 10.1007/s10620-016-4361-5
- 228 Camilo V, Barros R, Sousa S, et al. Helicobacter pylori and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells , *Carcinogenesis* 2010;33(10):1985–1992. DOI:10.1093/carcin/bgs233
- 229 Li XL, Eishi Y, Bai Y, et al. Expression of the SRY-related HMG- box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2004;24: 257-63.
- 230 Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, et al. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of the Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 1997;74:35-44.
- 231 Asonuma,S. et al. Helicobacter pylori induces gastric mucosal intestinal metaplasia through the inhibition of interleukin-4-mediated HMG box protein Sox2 expression. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 2009;297: G312–G322.
- 232 Mutoh H, Sashikawa M, Sugano K. Sox2 expression is maintained while gastric phenotype is completely lost in Cdx2-induced intestinal metaplasticmucosa, *Differentiation* 2011; 81:92–98. DOI: 10.1016/j.diff.2010.10.002
- 233 Koulis A, Buckle A, Boussioutas A. Premalignant lesions and gastric cancer: Current understanding. *World J Gastrointest Oncol* 2019;11(9):665-678. doi:10.4251/wjgo.v11.i9.665
- 234 Yuan T, Ni Z, Han C. et al. SOX2 interferes with the function of CDX2 in bile acid-induced gastric intestinal metaplasia. *Cancer Cell Int* 2019;19: 24 DOI: 10.1186/s12935-019-0739-8
- 235 Take S, Mizuno M, Ishiki K et al. Risk of gastric cancer in the second decade of follow-up after Helicobacter pylori eradication. *J Gastroenterol* 2020;55: 281–288. DOI: 10.1007/s00535-019-01639-w
- 236 Díaz P, Valderrama MV, Bravo J, Quest AFG. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. *Front Microbiol* 2018;9:5. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00005
- 237 Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci* 2016;107: 391–397. DOI:10.1111/cas.12901.
- 238 Zhao J, Wen S, Wang X, & Zhang, Z. Helicobacter pylori modulates cyclooxygenase-2 and 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase in gastric cancer. *Oncology Letters* 2017;14: 5519-5525. DOI: 10.3892/ol.2017.6843

- 239 Silva LN, Zimmer KR, Macedo AJ & Trentin DS. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem Rev* 2016;116(16): 9162-9236. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00184
- 240 Wang Y-C. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases *World J Gastroenterol* 2014;20(30): 10368–10382. DOI: 10.3748/wjg.v20.i30.10368.
- 241 Surth YJ. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: A short review. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1091–1097.
- 242 Kewitz S, Volkmer I, Staeger M. Curcuma contra cancer? Curcumin and Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Growth Metastasis* 2013;6:35–52.
- 243 Bodger K, Crabtree J. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull* 1998; 54:139–150.
- 244 Wu Y, Tsai H, Lin W et al. Upregulation of CCL20 and recruitment of CCR6+ gastric infiltrating lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis. *Infect Immun* 2007;75:4357–4363.
- 245 Yoshida A, Isomoto H, Hisatsune J et al. Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Clin Immunol* 2009;130: 290–297.
- 246 Eck M, Schmausser B, Scheller K et al. CXC chemokines Gro/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clin Exp Immunol* 2000;122: 192–199.
- 247 Crabtree J, Shallcross R, Heatley R, Wyatt J. Mucosal tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Gut* 1991;32:1473–1477.
- 248 Noach L, Bosma N, Jansen J, et al. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:425–429.
- 249 Redecke V, Hacker H, Datta SK et al. Cutting edge: Activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004;172: 2739–2743.
- 250 Sintara K, Duangporn T-N, Suthiluk et al. Curcumin suppresses gastric NF-kappaB activation and macromolecular leakage in *Helicobacter pylori*-infected rats. *World J Gastroenterol* 2010;16: 4039–4046.
- 251 Santos, A.M., Lopes, T., Oleastro, M. et al. Cyclooxygenase inhibition with curcumin in *Helicobacter pylori* infection. *Nutrire* 2018;43:7. DOI: 10.1186/s41110-018-0070-5.

- 252 Tiwari SK, Shaik AS, Shaik AP et al. Gene expression patterns of COX-1, COX-2 and iNOS in H. Pylori infected histopathological conditions. *Microbial pathogenesis* 2019;135: 103634. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103634.
- 253 Layal Slika & Digambara Patra. A short review on chemical properties, stability and nano-technological advances for curcumin delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery* 2020;17(1): 61-75. DOI: 10.1080/17425247.2020.1702644