

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

**Polimorfismos no gene *dupA* de *Helicobacter pylori* e risco de
úlcera duodenal e carcinoma gástrico**

Rafaella Ferreira Avelar Costa

**Belo Horizonte
2011**

Rafaella Ferreira Avelar Costa

**Polimorfismos no gene *dupA* de *Helicobacter pylori* e risco de
úlcera duodenal e carcinoma gástrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz
Co-orientadora: Prof^a. Sílvia Beleza de Moura

**Belo Horizonte
2011**

*Aos meus queridos pais, irmãos e meu lindo Soul,
pelo incentivo, amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pela proteção e pelas oportunidades de crescimento e amadurecimento. Muito obrigada a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

- À minha orientadora Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz
- À minha co-orientadora Prof^a. Silvia Beleza de Moura
- Ao Prof. Gifone Aguiar Rocha
- À Prof^a. Andreia Maria Camargos Rocha
- À Prof^a Taciana de Figueiredo Soares
- Ao Dr. Charles Anacleto
- À Dr^a Juliana Becattini Guerra
- À Prof^a Patrícia Silva Cisalpino
- À Dr^a Adriana dos Santos
- Ao Fabrício Freire de Melo
- À Adriana Alves Oliveira Paim
- Ao Sérgio de Assis Batista
- À Lucélia Silva Barroso de Jesus
- Aos colegas de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia/UFMG
- Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia/UFMG
- Aos amigos do LPB Silvinha, Fernanda, Gisele, Zé e Vanessa
- À todos os funcionários e bolsistas do LPB
- Aos meus pais Carlos Rogélio e Selma
- Aos meus irmãos Felipe e Lorena
- Ao meu pequenino Soul
- A todos meus familiares
- Aos meus amigos do Padreco e CPE
- Aos amigos da PUC-Minas
- Aos amigos da FUNED
- Aos amigos da Especialização em Microbiologia/UFMG
- À CAPES, CNPq e FAPEMIG.

*“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”
(Antoine de Saint-Exupéry)*

RESUMO

O *dupA* (“*duodenal ulcer promoting gene A*”) é constituído por dois genes homólogos ao *virB4*, *jhp0917* e *jhp0918*, que pela inserção de uma base T ou C depois da posição 1385 da região 3’ do *jhp0917*, forma um gene único de 1839 pares de bases. O gene foi descrito como um provável marcador de virulência do *H. pylori* associado exclusivamente à úlcera péptica duodenal em pacientes asiáticos. Entretanto, a pesquisa desse marcador em linhagens isoladas de diferentes populações tem mostrado grande variação na associação com doenças. No Brasil, a prevalência de linhagens consideradas *dupA*-positivas por PCR é muito alta e a presença do gene não tem sido associada com as doenças decorrentes da infecção pelo *H. pylori*. As diferenças observadas na literatura podem-se dever à detecção apenas parcial do gene, quando métodos usuais são usados, visto que polimorfismos que criam *stop codon* prematuros têm sido descritos. O objetivo desse estudo foi investigar, por sequenciamento gênico, a presença de polimorfismos em toda a extensão do gene *dupA* de amostras de *H. pylori* isoladas de pacientes com gastrite (n=26), úlcera duodenal (n=29) e carcinoma gástrico (n=20), usando a metodologia de *Primer Walking*. Das 75 amostras, 41 (54,7%) não apresentaram polimorfismos que geram *stop codons* à montante da posição 1839 e foram consideradas *dupA*-intactas. Por outro lado, 34 (45,3%) amostras apresentaram um ou mais polimorfismos que criam *stop codons* prematuros, rompendo o gene em produtos menores que o descrito como sendo *dupA*. A presença de *dupA* intacto foi mais frequentemente observada nas amostras isoladas de pacientes com úlcera duodenal [n=19 (65,5%)] que naquelas de pacientes com gastrite [n=12 (46,2%)] ou carcinoma gástrico [n=10 (50%)]. Na análise logística, ajustando para sexo e idade, a presença de *dupA* intacto associou-se independentemente com úlcera duodenal ($p=0,02$; OR=5,06; IC 95%=1,22 - 20,96), indicando que o gene é um fator de risco para a doença na nossa população.

Palavras-chaves: *Helicobacter pylori*, *dupA*, polimorfismos.

ABSTRACT

The *dupA* (“duodenal ulcer promoting gene A”) is constituted by two *virB4* genes, *jhp0917* and *jhp0918*, that forms one single gene of 1839 base pairs when there is an insertion of a T or C base after the position 1385 of the *jhp0917* 3’ region. The gene was described as a putative virulence marker of *H. pylori* associated exclusively with duodenal peptic ulcer in Asiatic patients. However, the study of this marker in strains isolated from different populations has showed wide variation in its association with diseases. In Brazil, the prevalence of strains considered to be *dupA*-positive by PCR is too high and the presence of the gene has not been associated with the diseases associated with *H. pylori* infection. The differences observed in the literature may be due to the detection of only part of the gene, when conventional methods are used, since polymorphisms that create premature stop codon have been described. The aim of this study was to investigate, by gene sequencing, the presence of polymorphisms in the entire extension of the *dupA* gene from *H. pylori* strains isolated from patients with gastritis (n=26), duodenal ulcer (n=29) and gastric carcinoma (n=20), using the methodology of *Primer Walking*. From the 75 strains, 41 (54.7%) did not have polymorphisms that create stop codons before the 1839 position and were considered as *dupA*-intact. On the other hand, 34 (45.3%) strains had one or more polymorphisms that create premature stop codons, splitting the gene in smaller products than the one described as *dupA*. The presence of the intact *dupA* was more frequently observed in strains isolated from patients with duodenal ulcer [n=19 (65.5%)] than those from patients with gastritis [n=12 (46.2%)] or gastric carcinoma [n=10 (50%)]. In logistic analysis, adjusting for gender and age, the presence of intact *dupA* independently associated with duodenal ulcer ($p=0.02$, OR=5.06, IC 95%=1.22 – 20.96), indicating that the gene is a risk factor for the disease in our population.

Key-words: *Helicobacter pylori*, *dupA*, polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Representação esquemática do gene <i>dupA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> | 24 |
| FIGURA 2 – Diagrama esquemático de duas variantes do gene <i>dupA</i> | 27 |
| FIGURA 3 – Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes ao gene <i>jhp0917</i> | 39 |
| FIGURA 4 – Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes ao gene <i>jhp0918</i> | 39 |
| FIGURA 5 – Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes aos cinco fragmentos do gene <i>dupA</i> completo | 40 |
| FIGURA 6 – Inserção de adenina depois da posição 1733 | 42 |
| FIGURA 7A – Polimorfismos no <i>dupA</i> em linhagens isoladas de pacientes com gastrite | 44 |
| FIGURA 7B – Polimorfismos no <i>dupA</i> em linhagens isoladas de pacientes com úlcera duodenal | 45 |
| FIGURA 7C – Polimorfismos no <i>dupA</i> em linhagens isoladas de pacientes com carcinoma gástrico | 46 |
| FIGURA 8 – Deleção de CTAAA depois da posição 1844 | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – Sequência dos iniciadores e condições das reações de PCR para detecção dos genes <i>jhp0917</i> e <i>jhp0918</i> | 32 |
| TABELA 2 – Sequência dos iniciadores e condições das reações de PCR para detecção da sequência completa do gene <i>dupA</i> | 34 |
| TABELA 3 – Características dos pacientes | 38 |
| TABELA 4 – Inserção de uma base T ou C depois da posição 1385 nas doenças associadas à infecção pelo <i>H. pylori</i> | 41 |
| TABELA 5 – Polimorfismos que levam a <i>stop codons</i> prematuros no gene <i>dupA</i> de acordo com as doenças associadas à infecção pelo <i>H. pylori</i> | 43 |
| TABELA 6 – Número de polimorfismos no <i>dupA</i> de acordo com as doenças associadas à infecção pelo <i>H. pylori</i> , independentemente de criarem ou não <i>stop codon</i> | 49 |
| TABELA 7 – Presença de <i>dupA</i> -intacto de acordo com as doenças associadas à infecção pelo <i>H. pylori</i> | 49 |
| TABELA 8 – Variáveis associadas à infecção por linhagens de <i>H. pylori</i> com o gene <i>dupA</i> -intacto | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

ATPase – Família de enzimas que catalisam a hidrólise do ATP

babA – Gene associado à proteína BabA

BabA – Blood group antigen-binding adhesin

cagA – *Cytotoxin associated gene A*

CagA – Proteína associada ao gene *cagA*

cag PAI – Ilha de patogenicidade *cag*

°C – Grau Celsius

C – Citosina

c-Src – Família de tirosina quinases

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DP – Desvio padrão

dupA – *Duodenal ulcer promoting gene A*

EPIYA – Sequência dos aminoácidos ácido glutâmico, prolina, isoleucina, tirosina e alanina

F – Forward

FtsK/ SpoIIIE – Família de ATPases

g – Força centrífuga relativa

G – Guanina

IC – Intervalo de confiança

IL-8 – Interleucina 8

jhp0917/jhp0918 – Genes homólogos ao *virB4*

Kb – Quilobase

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Quilodalton

L – Litro

Lyn – Família de tirosina quinases

MALT – Tecido linfóide associado à mucosa

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – Minutos
mL – Mililitro
 μ l – Microlitros
mm – Milímetro
mM – Milimolar
 μ m – Micrômetro
N – Número
ng – Nanogramas
nt – Nucleotídeos
NTP – Nucleosídeo trifosfatado
OR – Razão de chance
p – Nível de significância
pb – Pares de bases
PCR – Reação em cadeia da polimerase
Pfu – *Pyrococcus furiosus*
pH – Potencial de hidrogênio
R – Reverse
RNA – Ácido ribonucleico
s – Segundos
sabA – Gene associado à proteína SabA
SabA – Sialic acid-binding adhesin
SHP-2 – Protein-tyrosine phosphatase 2
T – Timina
Taq – *Thermus aquaticus*
TraD/ TraG – Potenciais NTP hidrolases
Tris-HCL – Tris(hidroximetil)aminometano
U – Unidade enzimática
vacA – *Vacuolating cytotoxin gene A*
VacA – Citotoxina vacuolizante A
virB4 – Gene associado à ATPase VirB4 de *Agrobacterium tumefaciens*
VirB4 – Família de ATPases
% – Porcentagem

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 13 |
| 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 Características do <i>Helicobacter pylori</i> | 16 |
| 2.2 Aspectos epidemiológicos da infecção por <i>H. pylori</i> | 17 |
| 2.3 Doenças associadas à infecção por <i>H. pylori</i> | 18 |
| 2.4 Marcadores de virulência do <i>H. pylori</i> | 19 |
| 2.5 <i>dupA</i> | 22 |
| 3.0 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Objetivo Geral | 29 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 29 |
| 4.0 PACIENTES E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 Origem das amostras de <i>H. pylori</i> | 30 |
| 4.2 Extração de DNA das amostras de <i>H. pylori</i> | 31 |
| 4.3 Detecção dos genes <i>jhp0917</i> e <i>jhp0918</i> | 32 |
| 4.4 Determinação da sequência completa do <i>dupA</i> | 33 |
| 4.4.1 Amplificação por “Primer Walking Technology” | 33 |
| 4.4.2 Purificação e sequenciamento dos fragmentos | 35 |
| 4.5 Análise estatística | 36 |
| 5.0 RESULTADOS | 38 |
| 5.1 População | 38 |
| 5.2 Detecção dos genes <i>jhp0917</i> e <i>jhp0918</i> por PCR | 39 |
| 5.3 Detecção dos fragmentos necessários à obtenção da sequência completa do <i>dupA</i> | 40 |
| 5.3.1 Pesquisa da inserção de base T ou C depois da posição 1385 que caracteriza o <i>dupA</i> descrito por Lu e colaboradores (2005a) | 41 |
| 5.3.2 Pesquisa da inserção de adenina depois da posição 1733, descrita por Hussein e colaboradores (2010) | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.3 Pesquisa de polimorfismos no dupA | 42 |
| 5.3.4 Associação entre a presença de dupA-intacto e risco das doenças associadas à infecção pelo H. pylori | 49 |
| 5.3.5 Sequências nucleotídicas do gene dupA de amostras isoladas da população estudada | 50 |
| | |
| 6.0 DISCUSSÃO | 51 |
| | |
| 7.0 CONCLUSÃO | 56 |
| | |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |
| | |
| ANEXOS | 68 |
| ANEXO A | 68 |
| ANEXO B | 79 |

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O *Helicobacter pylori* é, atualmente, aceito como o principal agente etiológico de gastrite em seres humanos e um fator essencial na patogênese da úlcera péptica, desempenhando, também, papel fundamental na cadeia de eventos que culmina com o desenvolvimento de carcinoma gástrico. Apesar de úlcera péptica e carcinoma gástrico serem doenças graves e comuns, ocorrem em apenas uma minoria das pessoas com a infecção gástrica pelo *H. pylori*.

Como a presença da bactéria no estômago simplesmente não é suficiente para explicar porque apenas uma pequena porcentagem dos indivíduos infectados irá desenvolver doenças mais graves ou porque a infecção pode levar ao aparecimento de duas doenças consideradas mutuamente exclusivas, a úlcera péptica duodenal e o carcinoma gástrico, a influência de fatores de virulência bacterianos e de fatores ligados ao hospedeiro e ao ambiente tem sido investigada. Identificar quais fatores determinam ou influenciam os eventos que irão culminar na gênese dessas doenças seria de crucial importância para a prevenção das mesmas.

Vários marcadores de virulência do *H. pylori* já foram relatados, mas nenhum que estivesse associado exclusivamente à úlcera duodenal ou ao carcinoma gástrico. O *dupA* (“*duodenal ulcer promoting gene A*”), gene presente na região de plasticidade genética do *H. pylori*, foi o primeiro marcador de virulência associado a um risco maior de desenvolvimento de úlcera duodenal e a um certo grau de proteção contra o carcinoma gástrico em pacientes asiáticos. O *dupA* é constituído pelos genes *jhp0917* e *jhp0918* que formam um único gene pela inserção de uma

base T ou C depois da posição 1385 do gene *jhp0917*. A pesquisa desse marcador - que normalmente é feita pela detecção por PCR dos genes *jhp0917* e *jhp0918*, além da pesquisa da inserção de T ou C que caracteriza o gene - em linhagens isoladas de diferentes populações tem mostrado grande variação na prevalência do gene e associação com doenças.

No Brasil, nosso grupo de pesquisa não encontrou associação entre a presença de *dupA* e úlcera péptica ou carcinoma gástrico, tendo sido observada uma frequência muito alta de linhagens *dupA*-positivas (GOMES *et al.*, 2008). Entretanto, quando um fragmento de 214 pares de bases do gene *dupA* foi sequenciado para a detecção da inserção de uma base T ou C depois da posição 1385, dois polimorfismos que criam *stop codons* prematuros, possivelmente resultando na interrupção ou alteração da expressão do gene, foram encontrados com mais frequência em linhagens isoladas de pacientes com carcinoma gástrico. Cálculos considerando essas linhagens como *dupA*-negativas, demonstraram que a presença do gene associou-se a um risco reduzido de carcinoma gástrico (QUEIROZ *et al.*, 2010).

Hussein e colaboradores (2010) também observaram polimorfismos no *dupA*, tendo classificado o gene em *dupA1* e *dupA2* de acordo com o tamanho do produto gerado. Nas amostras *dupA1* há uma inserção de adenina depois da posição 1733 que resulta na formação de um produto com 1884 pares de bases. De acordo com os autores, quando a inserção de adenina não está presente, há possivelmente versões truncadas dos produtos do *dupA*, linhagens que foram denominadas *dupA2*.

Com base na variabilidade das sequências do gene até então demonstrada, pode-se supor que haja outros polimorfismos ainda não descritos que poderiam ser

responsáveis por versões truncadas da proteína. Portanto, um mapa completo dos polimorfismos potencialmente funcionais do *dupA* permitirá uma avaliação mais acurada da associação do gene com as doenças decorrentes da infecção pelo *H. pylori*, fornecendo subsídios para justificarem os resultados contraditórios da literatura no que diz respeito à virulência do gene.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa espiralada, isolada da mucosa gástrica de seres humanos em 1982 (WARREN & MARSHALL, 1983). Inicialmente, o micro-organismo foi denominado *Campylobacter pylori* devido à sua semelhança quanto aos aspectos morfológicos e fisiológicos característicos desse gênero bacteriano (MARSHALL & GOODWIN, 1987). Entretanto, estudos relativos à ultraestrutura, composição de ácidos graxos e à análise da sequência do gene que codifica o RNA ribossômico 16S demonstraram que a bactéria não pertencia ao gênero *Campylobacter*, tendo sido proposta a criação de um novo gênero, *Helicobacter*, no qual o micro-organismo foi incluído, passando a ser denominado *Helicobacter pylori* (ROMANIUK *et al.*, 1987; GOODWIN *et al.*, 1989).

O *H. pylori* é uma bactéria não esporulada, de superfície lisa, que mede aproximadamente 0,5 µm de largura e 2,0 a 3,0 µm de comprimento, é móvel, com quatro a seis flagelos uni ou bipolares embainhados e com bulbos terminais nas extremidades distais (GOODWIN *et al.*, 1985b; GEIS *et al.*, 1989; TAYLOR, 1992; O'TOOLE *et al.*, 2000). Tem um genoma circular com 1.667.867 pares de bases (com cerca de 1.590 sequências codificadoras), contendo um repertório metabólico e capacidade biossintética limitados (TOMB *et al.*, 1997).

O micro-organismo é microaerófilo, cresce a 37°C depois de 3 a 7 dias de incubação. É uma bactéria fastidiosa, sendo necessários meios de cultura enriquecidos para o seu crescimento, acrescidos de antimicrobianos para a inibição

de micro-organismos contaminantes (WARREN & MARSHALL, 1983; GOODWIN *et al.*, 1985a; QUEIROZ *et al.*, 1987).

O *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica, preferencialmente a região antral, mas também coloniza o corpo e fundo gástricos (TAYLOR *et al.*, 1987; QUEIROZ *et al.*, 1988; BLASER & BERG, 2001).

2.2 Aspectos epidemiológicos da infecção por *H. pylori*

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria de distribuição cosmopolita. A infecção pelo micro-organismo acomete cerca de 60% da população mundial. Nos países em desenvolvimento 80 a 90% da população encontram-se infectados (BLASER, 1993; BLASER & PARSONNET, 1994; HAMILTON-MILLER, 2003), enquanto que em países desenvolvidos a prevalência da infecção permanece entre 25% e 50% (HAMILTON-MILLER, 2003).

A infecção pelo *H. pylori* é adquirida predominantemente na infância, em idade pré-escolar, por via oral-oral ou fecal-oral (LEE, 1994; ROCHA *et al.*, 2003). A transmissão do micro-organismo ocorre principalmente no ambiente familiar especialmente entre mães e filhos e entre irmãos (ROCHA *et al.*, 2003) e está associada a diversos fatores como o baixo nível socioeconômico, uma maior aglomeração familiar, condições de higiene precárias e ausência ou deficiência de saneamento básico (MALATY & GRAHAM, 1994; GOODMAN *et al.*, 1996; SARKER *et al.*, 1997).

2.3 Doenças associadas à infecção por *H. pylori*

Atualmente, o *H. pylori* é reconhecido como o principal agente etiológico de gastrite crônica em seres humanos e um fator essencial na patogênese da úlcera péptica. A bactéria desempenha, também, papel fundamental na cadeia de eventos que culmina com o desenvolvimento do carcinoma gástrico e do linfoma gástrico do tipo MALT (tecido linfóide associado à mucosa) (FORMAN *et al.*, 1991; PARSONNET *et al.*, 1991; WOTHERSPOON *et al.*, 1991; MÉGRAUD & LAMOULIATTE, 1992; MARSHALL, 1994; COVER & BLASER, 1995; WOTHERSPOON & PATH, 1998). Em 1994, a Organização Mundial de Saúde considerou a infecção pelo *H. pylori* como carcinogênica (IARC, 1994).

Apesar de a infecção pelo *H. pylori* estar nitidamente associada à presença de gastrite crônica à histologia (BLASER, 1990), na grande maioria das pessoas, a gastrite permanece assintomática e complicações como úlcera péptica e carcinoma gástrico ocorrem apenas em 10 a 15% dos indivíduos *H. pylori* positivos (FORMAN *et al.*, 1991; MÉGRAUD & LAMOULIATTE, 1992; PARSONNET *et al.*, 1991; WOTHERSPOON *et al.*, 1991; WOTHERSPOON & PATH, 1998).

O *H. pylori* adere nas células epiteliais gástricas (HESSEY *et al.*, 1990; THOMSEN *et al.*, 1990), interfere na integridade da mucosa gástrica pela produção de uma variedade de enzimas e toxinas e desencadeia um processo inflamatório caracterizado por um infiltrado de células mono e polimorfonucleares (SCHEIMAN & CUTLER, 1999).

A infecção pelo *H. pylori* inicialmente se estabelece no antro gástrico. A produção elevada de ácido pelas células parietais protege a mucosa do corpo gástrico da colonização inicial, ficando a reação inflamatória restrita ao antro

gástrico. Entretanto em alguns indivíduos, o micro-organismo é capaz de colonizar também o corpo gástrico, levando a uma reação inflamatória generalizada, denominada pangastrite, condição que predispõe à gastrite atrófica, lesão que antecede ao carcinoma gástrico (COVER & BLASER, 1996; HOWDEN, 1996; DUNN *et al.*, 1997; EL-OMAR, 2001). Estima-se que 10% dos pacientes com gastrite atrófica irão desenvolver carcinoma gástrico em um período máximo de 15 anos (SCHEIMAN & CUTLER, 1999). Por outro lado, quando restrita ao antro gástrico, a infecção pelo *H. pylori* pode culminar com o aparecimento da úlcera péptica duodenal (SIPPONEN, 1992).

2.4 Marcadores de virulência do *H. pylori*

O sucesso das bactérias patogênicas advém, em muito, à sua capacidade de colonizar, multiplicar e infectar novos hospedeiros. O *H. pylori* coloniza o ambiente hostil do estômago, onde, deve sobreviver em condições ácidas, penetrar no muco e se aderir à mucosa gástrica, apesar do peristaltismo e rápida renovação do epitélio do estômago (LU *et al.*, 2005b).

A resistência à acidez é de vital importância visto que, sem esse atributo biológico, o *H. pylori* não teria condições de colonizar a mucosa gástrica. O micro-organismo produz de forma constitutiva a enzima urease, uma potente proteína de peso molecular ao redor de 550 kDa que se localiza no espaço periplasmático e na membrana externa da bactéria. Promove a hidrólise da uréia, presente na mucosa gástrica, levando à produção de amônia. A amônia atua como receptor de íons H^+ , tamponando a ação deletéria do ácido (BODE *et al.*, 1989; MARSHALL *et al.*, 1990; WEEKS & SACH, 2001). Além da urease, o *H. pylori* também produz uma extensa

variedade de enzimas, muitas das quais estão provavelmente envolvidas na patogênese, como superóxido dismutase, catalase e arginase, que conferem proteção ao micro-organismo contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, impedindo uma resposta inflamatória eficaz do hospedeiro (HAZELL *et al.*, 1991).

Alguns fatores de virulência estão presentes em apenas determinadas linhagens de *H. pylori* e parecem estar relacionados ao surgimento das doenças graves associadas à infecção, apesar de a presença desses fatores não ser argumento suficiente para prever se um determinado paciente irá desenvolver uma doença grave ou não. Dentre os marcadores de virulência, se destaca a ilha de patogenicidade *cag* (PAI) composta por vários genes de virulência como o *cagA*. Outros fatores de virulência importantes do *H. pylori* são a citotoxina vacuolizante (VacA) e os genes *babA*, *sabA* e *dupA*.

O gene *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*), primeiro marcador genético detectado em amostras de *H. pylori*, é um marcador da presença da ilha de patogenicidade *cag* (PAI), composta por um fragmento de DNA de 40 Kb com cerca de 31 genes, incluindo o gene *cagA* na extremidade 3' da ilha (CENSINI *et al.*, 1996). O conteúdo de G + C (35%) da ilha *cag* PAI difere do conteúdo G + C do genoma do *H. pylori* (39%), sugerindo que esse fragmento tenha sido adquirido horizontalmente e integrado ao cromossomo da bactéria (TOMB *et al.*, 1997; ALM *et al.*, 1999; COVACCI *et al.*, 1999). A ilha *cag* PAI contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV, responsável pela translocação de proteínas da bactéria para o interior da célula hospedeira, que pode interferir em vias do metabolismo celular, incluindo a

expressão de proto-oncogenes (COVACCI *et al.*, 1999; COVACCI & RAPPUOLI, 2000).

O gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin gene A*) é responsável pela codificação da proteína VacA (citotoxina vacuolizante A) (ATHERTON *et al.*, 1995). Apesar de o gene estar presente em todas as amostras de *H. pylori*, apenas cerca da metade das linhagens é capaz de produzir vacuolização celular *in vitro* (COVER *et al.*, 1992; ATHERTON *et al.*, 1995). O VacA é uma exotoxina que, na forma madura, tem 88 kDa, sendo constituída por dois pequenos peptídeos associados de maneira não-covalente (COVER *et al.*, 1994). Essa exotoxina é capaz de induzir diretamente a formação de vacúolos intracitoplasmáticos, a destruição de mitocôndrias, a liberação de citocromo C e morte de células epiteliais por apoptose, eventos que lesam a mucosa gástrica. Além disso, a toxina aumenta a permeabilidade epitelial, o que pode facilitar tanto a passagem de substâncias tóxicas para dentro do epitélio, como também a difusão de nutrientes para a camada mucosa favorecendo a sobrevivência da bactéria (COVACCI *et al.*, 1999; KUCK *et al.*, 2001; GEBERT *et al.*, 2003; BASSO & PLEBANI, 2004; NAKAYAMA *et al.*, 2004).

O gene *vacA* é polimórfico (ATHERTON *et al.*, 1995). O genótipo *vacAs1* é considerado mais virulento e é mais frequentemente encontrado nas amostras de pacientes com úlcera péptica (ATHERTON *et al.*, 1995; VAN DOORN *et al.*, 1999; GUSMÃO *et al.*, 2000) e carcinoma gástrico (EVANS *et al.*, 1998; KIDD *et al.*, 1999; VAN DOORN *et al.*, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2001) que naquelas isoladas de pacientes com gastrite.

O gene *babA* codifica uma adesina de peso molecular de 78 kDa, situada na membrana externa do *H. pylori*, permitindo uma ligação específica da bactéria a

antígenos de Lewis b e H-1, expressos na superfície das células da mucosa gástrica (ILVER *et al.*, 1998). Essa adesina é denominada BabA (“blood group antigen-binding adhesin”) e é considerada um importante fator de virulência ao permitir a adesão e o contato da bactéria com o epitélio gástrico (PRINZ *et al.*, 2001).

O gene *sabA* codifica a proteína SabA (“sialic acid-binding adhesin”), que também é considerada um fator importante na aderência do *H. pylori* à mucosa gástrica. Essa proteína se liga a resíduos glicoconjugados de ácido siálico expressos na superfície das células epiteliais na vigência do processo inflamatório ou neoplásico. A expressão de ácido siálico é considerada rara na mucosa gástrica normal, sendo induzida pela bactéria, o que pode contribuir para a cronicidade da infecção (MAHDAVI *et al.*, 2002). Unemo e colaboradores (2005) relataram que a adesina SabA participa da ativação de neutrófilos por outros mecanismos que não envolvem a opsonização do *H. pylori*.

2.5 *dupA*

O sequenciamento completo do genoma de duas linhagens distintas de *H. pylori* (26695 e J99) permitiu uma análise detalhada da diversidade genética da bactéria (ALM & TRUST, 1999). A comparação das sequências do genoma revelou a presença de outras regiões que, à semelhança da *cag PAI*, apresentam conteúdo G + C diferente, representando ilhas de patogenicidade em potencial. Entre elas, foi encontrada uma região “hiper-variável”, denominada de região de plasticidade (ALM *et al.*, 1999).

Recentemente, Lu e colaboradores (2005a) descreveram um provável novo marcador de virulência, o *dupA* (“*duodenal ulcer promoting gene A*”), localizado na região de plasticidade do genoma de *H. pylori* que, diferentemente dos outros marcadores de virulência como o *cagA* e *vacA*, estaria associado exclusivamente à úlcera péptica duodenal. A infecção por linhagens *dupA*-positivas não só foi associada a um risco aumentado de desenvolvimento de úlcera duodenal em pacientes do leste Asiático (Coréia e Japão) como também à proteção contra câncer gástrico em pacientes asiáticos e colombianos. Esse achado é muito interessante, pois espelha a observação clínica de que a úlcera duodenal “protege” contra o carcinoma gástrico (LU *et al.*, 2005a).

Como indivíduos com gastrite crônica atrófica são mais propensos a desenvolver carcinoma gástrico, enquanto que a úlcera duodenal está comumente associada à gastrite não-atrótica predominantemente antral, os autores sugerem que os produtos do *dupA* devem estar direta ou indiretamente relacionados ao desenvolvimento de gastrite não-atrótica (LU *et al.*, 2005a). Além disso, Lu e colaboradores (2005a) associaram a presença do *dupA* com um aumento do grau de inflamação da mucosa antral e aumento dos níveis gástricos de IL-8, fatores associados à úlcera duodenal.

O *dupA* é constituído por dois genes homólogos ao *virB4*, *jhp0917* e *jhp0918*, que pela inserção de uma base T ou C depois da posição 1385 da região 3' do *jhp0917*, forma um gene único de 1839 pares de bases (**Figura 1**). A função do gene é desconhecida, mas de acordo com Lu e colaboradores (2005a), produtos do *dupA* são homólogos à ATPase VirB4, cuja função é produzir energia para a formação de um sistema secretor com função de transferir DNA e outras moléculas bacterianas para o interior da célula do hospedeiro. Além disso, uma região do gene é homóloga

a membros da família TraG/TraD que são potenciais NTP hidrolases, essenciais para a transferência de DNA na conjugação bacteriana e ao domínio FtsK/SpoIIIE, que está envolvido com divisão celular e transferência de DNA cromossômico (LU *et al.*, 2005a).

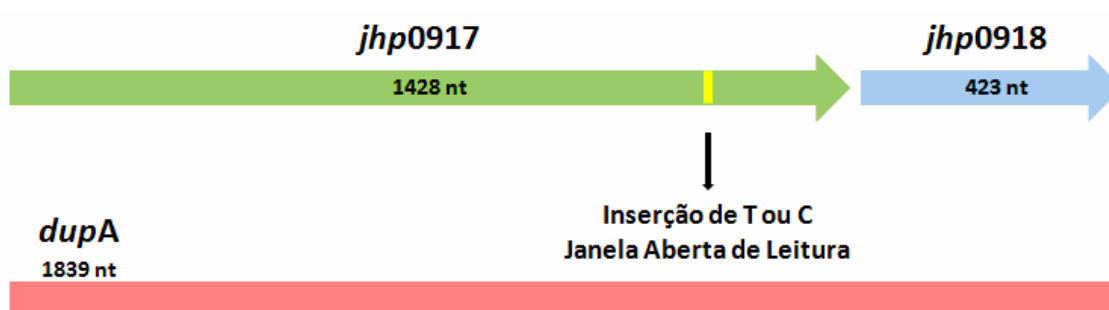


Figura 1: Representação esquemática do gene *dupA* de *Helicobacter pylori*. nt = nucleotídeos

Desde a descrição do *dupA*, nove trabalhos avaliaram a prevalência do gene e sua associação com as doenças decorrentes da infecção pelo *H. pylori*.

Em um trabalho realizado no norte da Índia, Arachchi e colaboradores (2007) relataram uma prevalência significativamente maior de linhagens *dupA*-positivas em pacientes com úlcera duodenal que em pacientes apenas com gastrite, confirmando a associação da presença do gene com úlcera duodenal como descrito por Lu e colaboradores (2005a). De forma semelhante, Zhang e colaboradores (2008) demonstraram uma prevalência maior do *dupA* em linhagens de *H. pylori* isoladas de pacientes com úlcera duodenal quando comparados com pacientes sem a doença, mas não observaram efeito protetor do *dupA* contra lesões pré-neoplásicas e carcinoma gástrico. Hussein e colaboradores (2008) também encontraram associação entre o *dupA* e úlcera duodenal em pacientes iraquianos. Por outro lado,

ainda no Iraque, Douraghi e colaboradores (2008) não encontraram associação entre a presença do *dupA* e úlcera duodenal. Entretanto, os autores demonstraram associação entre infecção por amostras *dupA*-negativas e lesões gástricas pré-malignas, como displasia, resultado que sugere que o *dupA* tenha um possível efeito protetor contra o câncer gástrico.

Argent e colaboradores (2007) determinaram a prevalência do *dupA* em amostras de *H. pylori* de quatro populações independentes: Bélgica, África do Sul, China e Estados Unidos. Nesse estudo não houve uma associação significativa entre a presença do *dupA* e úlcera duodenal, bem como câncer gástrico em nenhuma das populações quando analisadas separadamente. Curiosamente, entretanto, quando as populações da Bélgica e África do Sul foram estudadas conjuntamente, os autores observaram associação significativa entre a presença do *dupA* e carcinoma gástrico, mas não úlcera duodenal (ARGENT *et al.*, 2007); resultado oposto ao observado em todos os estudos anteriormente citados (LU *et al.*, 2005a ; ARACHCHI *et al.*, 2007; HUSSEIN *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008).

Schmidt e colaboradores (2009), estudando populações da Suécia, Austrália e de três etnias distintas residentes na Malásia e Singapura, apesar de terem observado uma grande variação na prevalência do *dupA* de *H. pylori* entre os grupos de pacientes estudados, não demonstraram associação entre a presença do gene e úlcera duodenal ou câncer gástrico. Resultados semelhantes foram relatados por Nguyen e colaboradores (2010) que não encontraram associação entre a presença do *dupA* e úlcera duodenal ou câncer gástrico na população japonesa.

No Brasil, há apenas três estudos sobre o assunto. Em Minas Gerais, nosso grupo de pesquisa (GOMES *et al.*, 2008) observou uma prevalência alta do *dupA* em

amostras de *H. pylori* isoladas de crianças e adultos (100% e 92%, respectivamente), não tendo sido observada associação entre a presença do gene e úlcera duodenal ou carcinoma gástrico. Em São Paulo, Pacheco e colaboradores (2008) também não demonstraram associação entre a presença do gene e doença. Entretanto, os autores observaram uma prevalência bem menor (62%) de linhagens *dupA*-positivas, o que pode se dever a diferenças na metodologia, número de amostras estudadas e nos critérios de definição da presença do *dupA*. Por exemplo, no trabalho de Pacheco e colaboradores (2008) e em alguns outros trabalhos (ARGENT *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008), o critério adotado para se considerar uma linhagem *dupA*-positiva baseou-se apenas na presença dos dois genes *jhp0917* e *jhp0918*, detectada por PCR; não tendo sido avaliada a inserção de T ou C depois da posição 1385 do *jhp0917*, que caracteriza o gene.

Mais recentemente, um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (QUEIROZ *et al.*, 2010), demonstrou a presença de dois polimorfismos num fragmento de 214 pares de bases do *dupA*: uma deleção de adenina na posição 1311 e uma inserção de adenina na posição 1426 que criam um *stop codon*, possivelmente resultando na interrupção ou alteração da expressão do gene. Considerando como *dupA*-negativas as amostras com pelo menos um desses polimorfismos, a presença do *dupA* mostrou-se negativamente associada com o carcinoma gástrico, resultado semelhante ao de Lu e colaboradores (2005a). Vale ressaltar que, embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo, os pacientes com úlcera duodenal foram mais frequentemente colonizados por amostras com *dupA* não polimórfico (QUEIROZ *et al.*, 2010). Além disso, nesse estudo também foi observado que a presença do *dupA* não polimórfico associou-se

com aumento dos níveis gástricos de IL-8, resultado semelhante ao encontrado por Lu e colaboradores (2005a).

Recentemente, também, Hussein e colaboradores (2010) observaram polimorfismos no *dupA* e propuseram a classificação do gene em *dupA1* e *dupA2* (**Figura 2**). Nas amostras *dupA1* há uma inserção de adenina depois da posição 1733, resultando em um gene com 1884 pares de bases, 5 pares de bases depois do códon inicial do gene *jhp0919*. Nas amostras *dupA2* não há essa inserção e, de acordo com os autores, os produtos são truncados e não funcionais, entre elas, os autores relatam a presença da deleção de adenina na posição 1311, descrita anteriormente pelo nosso grupo (2010).

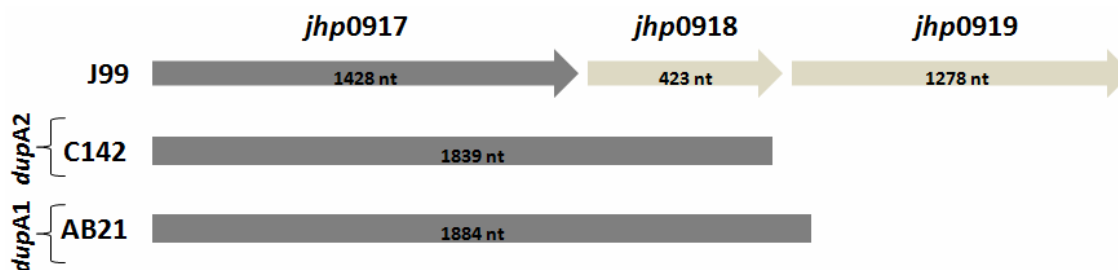


Figura 2: Diagrama esquemático de duas variantes do gene *dupA*. Em cinza, representação das janelas de leitura nas amostras J99 (ALM *et al.*, 1999), *dupA* C142 (LU *et al.*, 2005a) e AB21 (HUSSEIN *et al.*, 2010) correspondentes às sequências do gene. nt = nucleotídeos

Embora o número de trabalhos referentes ao *dupA* seja ainda pequeno, eles demonstram muitas variações na sequência do gene e não são consistentes quanto à associação da presença do gene e doenças decorrentes da infecção pelo *H. pylori*. A região gênica localizada à montante da posição 1311 não foi ainda avaliada. A presença de polimorfismos ainda não descritos poderia anular o efeito daqueles já

identificados ou, ainda, criar novos *stop codons*. Assim, para que se possa considerar uma amostra *dupA*-positiva, é necessário avaliar o gene em toda sua extensão.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de polimorfismos em toda a extensão do gene *dupA* de amostras de *H. pylori* isoladas de pacientes com gastrite, úlcera duodenal e carcinoma gástrico.

3.2 Objetivos Específicos

- Detectar a presença de polimorfismos que geram *stop codons* no gene *dupA* de amostras de *H. pylori* por sequenciamento gênico, pela técnica de *Primer Walking*.
- Avaliar associações entre a presença dos polimorfismos e doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*: úlcera duodenal e carcinoma gástrico.

4.0 PACIENTES E MÉTODOS

Esse estudo faz parte do projeto “Estudo da resposta imunológica à infecção pelo *Helicobacter pylori*” aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 005/99) e foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da Faculdade de Medicina/UFMG.

O termo de consentimento informado foi obtido de todos os pacientes incluídos. Os pacientes foram submetidos à esofagogastroduodenoscopia para esclarecimento de sintomas relacionados ao trato digestivo superior no Serviço de Endoscopia Digestiva Alta do Hospital das Clínicas (HC/UFMG) ou nos Hospitais Luxemburgo e Hospital Mário Penna para a remoção de carcinoma gástrico. Todos os pacientes foram informados quanto aos objetivos da pesquisa como também os possíveis riscos associados aos procedimentos diagnósticos.

Dados sóciodemográficos e clínicos foram obtidos de cada paciente pela aplicação de um questionário.

4.1 Origem das amostras de *H. pylori*

Foram estudadas 75 amostras de *H. pylori* isoladas de pacientes adultos (26 com gastrite, 29 com úlcera duodenal e 20 com carcinoma gástrico), mantidas em caldo Brucella acrescido de glicerol a 30% em freezer à - 80°C, no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia.

4.2 Extração de DNA das amostras de *H. pylori*

Para a extração de DNA, as amostras foram descongeladas e semeadas em placas de Petri contendo Meio Belo Horizonte (QUEIROZ *et al.*, 1987), composto por ágar-infusão de cérebro-coração (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com sangue de carneiro a 10%, 6 mg/L de vancomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), 50 mg/L de cicloheximida (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), 20 mg/mL de ácido nalidíxico (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e 40 mg/mL de cloreto de trifeniltetrazólio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C, em microaerofilia (Anaerocult C[®]; Merck, Darmstadt, Alemanha), por três dias (QUEIROZ *et al.*, 1987).

O crescimento correspondente a uma placa de Petri de 60 mm foi removido com Swab estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 500 µL de água quimicamente pura estéril. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por oito minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento mantido à - 80°C até o momento do uso.

O DNA das amostras foi extraído com o kit QIAamp[®] (QIAGEN[®], Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, os sedimentos foram colocados em tubos de microcentrífuga contendo 180 µL do tampão ATL e 20 µL de proteinase K, homogeneizados em vórtex, e incubados a 56°C por 18 horas. A cada amostra foram acrescentados 200 µL do tampão AL e os tubos foram incubados a 70°C por dez minutos. A seguir, 200 µL de etanol (96-100%) foram adicionados a cada tubo e essa mistura foi transferida para uma coluna “spin” do kit que foi centrifugada a 6.000 g por um minuto. Cada coluna foi colocada dentro de um tubo coletor de dois mL. O material da coluna foi lavado duas vezes

(250 µL cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas vezes com o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) fornecidos pelo kit. Depois da última lavagem, cada coluna foi inserida no interior de um tubo de microcentrífuga e o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado. O DNA foi eluído em 100 µL de água deionizada estéril (2 x 50 µL). Como controle da extração, utilizou-se água destilada.

A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria. O DNA extraído foi estocado à - 20°C até o momento do uso.

4.3 Detecção dos genes *jhp0917* e *jhp0918*

A detecção dos genes *jhp0917* e *jhp0918* das amostras de *H. pylori* foi feita por PCR usando os iniciadores descritos por LU e colaboradores (2005a) e as condições de reação descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores e condições das reações de PCR para detecção dos genes *jhp0917* e *jhp0918*

| Gene | Sequência iniciadores (5' - 3') | Temperatura, tempo e ciclos da PCR | Produto PCR (pb) | Referência |
|----------------|---|--|------------------|----------------------------|
| <i>jhp0917</i> | F: TGGTTTCTACTGACAGAGCGC R: AACACGCTGACAGGACAATCTCCC | 94°C 2 min., 35 ciclos (94°C 30 s., 59°C 30 s., e 72°C 1 min.) e 72°C 7 min. | 307 | LU <i>et al.</i> , (2005a) |
| <i>jhp0918</i> | F: CCTATATCGCTAACGCGCGCTC R: AAGCTGAAGCGTTTGTAACG | 94°C 2 min., 35 ciclos (94°C 30 s., 58°C 30 s., e 72°C 1 min.) e 72°C 7 min. | 276 | LU <i>et al.</i> , (2005a) |

A PCR foi feita em um volume final de 20 µL contendo 20 a 100 ng da amostra de DNA, dois µL de tampão 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], uma U de *Taq* DNA Polimerase Platinum[®] (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil), 0.5 µM de cada iniciador, 1.5 mM MgCl₂, e 200 µM de dNTP's (Invitrogen Life Technologies). A amostra LPB 390-96 da coleção do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia (genotipada como *jhp0917/jhp0918* positiva) foi usada como controle positivo e a amostra LPB 229-99 (genotipada como *jhp0917/jhp0918* negativa) como controle negativo da reação. Para o controle negativo interno da reação foi usada água destilada.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de luz ultravioleta.

As amostras foram previamente selecionadas com base na presença simultânea dos dois genes (*jhp0917* e *jhp0918*). As amostras que não apresentaram os dois genes ou apenas um dos dois foram previamente excluídas do estudo, tendo sido sequenciadas somente as amostras que continham os dois genes.

4.4 Determinação da sequência completa do *dupA*

4.4.1 Amplificação por “Primer Walking Technology”

Para o sequenciamento do gene *dupA*, foi usada a técnica de *Primer Walking*. Inicialmente, cinco pares de iniciadores foram desenhados com base em regiões gênicas conservadas, identificadas nas sequências de *H. pylori* depositadas no

GenBank: *dupA* (AB196363.1), J99 (AE001439.1), Shi470 (CP001072.2) e G27 (CP001173.1).

Os pares de iniciadores sintetizados foram combinados em cinco diferentes reações de PCR com a finalidade de se amplificarem cinco fragmentos (A, B, C, D e E), sobrepostos em alguns pares de bases nas posições 5' e 3' de modo a obter-se a sequência completa do gene. A sequência dos iniciadores e as condições das reações estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Sequência dos iniciadores e condições das reações de PCR para detecção da sequência completa do gene *dupA*

| Fragmentos | Sequência iniciadores (5' - 3') | Temperatura, tempo e ciclos da PCR | Produto PCR (pb) |
|------------|--|--|------------------|
| A | F: ATAAAGAATTGCAAGATAAAGC R: TTCTAAAACGCGTGAAAAGC | 95°C 5 min., 30 ciclos (95°C 30 s., 55°C 30 s. e 72°C 30 s.) e 72°C 5 min. | 589 |
| B | F: CAAATGGTTTCTACTGACAG R: ATTCTGTCAAGAGCTACCAC | 95°C 5 min., 30 ciclos (95°C 30 s., 55°C 30 s. e 72°C 30 s.) e 72°C 5 min. | 500 |
| C | F: ATGATAATTGGTAGCACAG R: CCCATAAGTTTTTATCATT | 95°C 5 min., 30 ciclos (95°C 30 s., 50°C 30 s. e 72°C 30 s.) e 72°C 5 min. | 528 |
| D | F: GCTTCTCAGTCTATAGATAAG R: CATCAGTATCTTTTGTGGGG | 95°C 5 min., 30 ciclos (95°C 30 s., 55°C 30 s. e 72°C 30 s.) e 72°C 5 min. | 523 |
| E | F: ATTGATGAAACTAAAGACTAC R: CTTTCTATGATAAATACGCAG | 95°C 5 min., 30 ciclos (95°C 30 s., 50°C 30 s. e 72°C 30 s.) e 72°C 5 min. | 517 |

As reações foram padronizadas para um volume final de 20 µL contendo 20 a 100 ng da amostra de DNA, dois µL de tampão 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 10 µM de cada iniciador, 1.5 mM MgCl₂, 2,5 mM de dNTP's (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) e uma U de *Taq* DNA Polimerase Platinum®

(Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) acrescida com 10% de *Pfu* DNA Polimerase (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canadá) para permitir revisão dos nucleotídeos inseridos nas novas fitas de DNA sintetizadas pela *Taq* DNA polimerase.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de luz ultravioleta.

4.4.2 Purificação e sequenciamento dos fragmentos

Os fragmentos obtidos eram purificados separadamente com o kit de purificação Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O produto amplificado foi adicionado em igual volume à solução de ligação de membrana. A mistura foi transferida para mini colunas SV, fornecidas pelo kit, que foram inseridas em tubos coletores de dois mL, incubadas e centrifugadas a 10.000 g por um minuto cada. A seguir, a mini coluna foi lavada com 700 µL da solução de lavagem e centrifugada a 10.000 g por um minuto. O procedimento foi repetido com 500 µL da solução de lavagem e em seguida a mini coluna foi centrifugada por cinco minutos. O tubo coletor foi desprezado e a mini coluna transferida para um tubo de 1,5 mL. Cinquenta microlitros de água livre de nucleases foram adicionados diretamente no centro da coluna que foi incubada por cinco minutos e, a seguir, centrifugada a 10.000 g por um minuto.

Os produtos purificados foram diretamente sequenciados (ambas as fitas: *forward* e *reverse*) com o kit de reação ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante e com os iniciadores descritos na **Tabela 2**, em um sequenciador automático de DNA Applied Biosystems (ABI PRISM 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequências dos fragmentos foram editadas usando o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) para a formação de um “contig” único correspondente à sequência completa do gene *dupA*. Todas as sequências obtidas foram conferidas manualmente no eletroferograma.

Posteriormente, a homologia das sequências foi analisada com o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) e em seguida alinhadas com as sequências do genoma da amostra J99 e do gene *dupA* com o programa Multalin Interface Page (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). As sequências foram transformadas em aminoácidos com a ajuda do programa ExPASy Translate Tool (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) com a finalidade de se determinarem possíveis *stop codons* prematuros. Amostras representativas do gene *dupA* da nossa população foram depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html).

4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados com o programa estatístico SPSS, versão 17.0 (SPSS IN., Chicago, Illinois, EUA).

Associações entre a presença de *dupA* completo (sem polimorfismo potencialmente funcional) e doenças foram avaliadas em modelos logísticos ajustando para sexo e idade.

Na análise univariada, as variáveis com $p \leq 0.20$ foram selecionadas e avaliadas na análise multivariada. Razão de chance (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram usados para estimar o risco. Para avaliar se o modelo estava ajustado foi usado o teste de Hosmer-Lemeshow.

5.0 RESULTADOS

5.1 População

As características dos pacientes, dos quais as amostras de *H. pylori* foram isoladas encontram-se na **Tabela 3**.

Tabela 3: Características dos pacientes

| Pacientes | N | Sexo F/M | Idade (anos) | |
|--------------------|----|-------------|--------------|--------------|
| | | | Média ± DP | Faixa etária |
| Gastrite | 26 | 17/9 | 54,9 ± 17,5 | 19 - 86 |
| Úlcera duodenal | 29 | 17/12 | 41,6 ± 16,1 | 18 - 85 |
| Carcinoma gástrico | 20 | 7/13 | 62,6 ± 13,2 | 33 - 86 |
| Total | 75 | 41/34 | 51,7 ± 17,9 | 18 - 86 |

N, número; F, feminino; M, masculino; DP, desvio padrão

5.2 Detecção dos genes *jhp0917* e *jhp0918* por PCR

Os genes *jhp0917* e *jhp0918* foram amplificados em todas as 75 amostras testadas (**Figuras 3 e 4**).

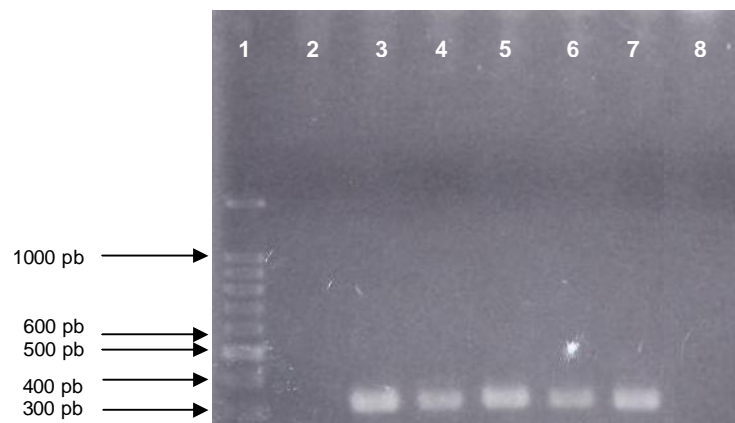


Figura 3: Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes ao gene *jhp0917*. 1 – Padrão de peso molecular 100 pb (Promega, Madison, WI, EUA); 2 – Controle negativo interno da reação; 3 ao 6 – Amostras positivas (banda de 307 pb); 7 – Controle positivo (amostra LPB 390-96) e 8 – Controle negativo (amostra LPB 229-99).

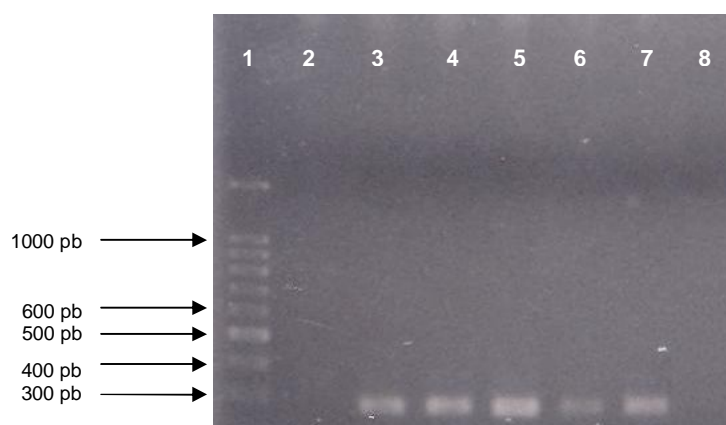


Figura 4: Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes ao gene *jhp0918*. 1 – Padrão de peso molecular 100 pb (Promega, Madison, WI, EUA); 2 – Controle negativo interno da reação; 3 ao 6 – Amostras positivas (banda de 276 pb); 7 – Controle positivo (amostra LPB 390-96) e 8 – Controle negativo (amostra LPB 229-99).

5.3 Detecção dos fragmentos necessários à obtenção da sequência completa do *dupA*

Os *amplicons* correspondentes aos cinco fragmentos (A, B, C, D e E) foram obtidos em todas as 75 linhagens, tendo sido possível o sequenciamento completo do gene *dupA* em todos os casos (**Figura 5**).

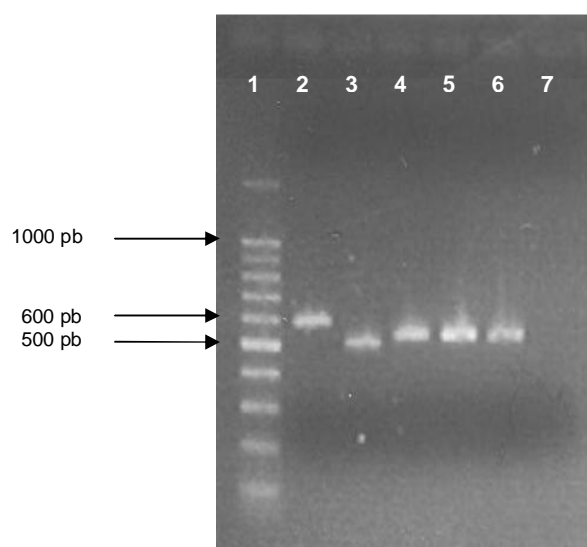


Figura 5: Gel de agarose dos produtos amplificados correspondentes aos cinco fragmentos do gene *dupA* completo. 1 – Padrão de peso molecular 100 pb (Promega, Madison, WI, EUA); 2 – Fragmento A; 3 – Fragmento B; 4 – Fragmento C; 5 – Fragmento D; 6 – Fragmento E e 7 – Controle negativo interno da reação (água destilada).

A título de ilustração, no **ANEXO A** encontram-se as sequências dos cinco fragmentos (A, B, C, D e E) correspondentes à sequência completa do gene *dupA* de uma amostra de *H. pylori*.

5.3.1 Pesquisa da inserção de base T ou C depois da posição 1385 que caracteriza o *dupA* descrito por Lu e colaboradores (2005a)

A inserção de uma base T ou C depois da posição 1385 foi encontrada em todas as amostras analisadas (**Tabela 4**). As amostras apresentaram mais frequentemente a inserção T nessa posição ($p = 0,04$; OR = 1,88; IC 95% = 1,02 - 3,48). Não foram vistas associações entre o tipo de base e as doenças; gastrite versus úlcera duodenal ($p = 0,44$); gastrite versus carcinoma gástrico ($p = 0,27$) e úlcera duodenal versus carcinoma gástrico ($p = 0,13$).

Tabela 4: Inserção de uma base T ou C depois da posição 1385 nas doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*

| Inserção | Gastrite | | Úlcera duodenal | | Carcinoma gástrico | | Total | |
|--------------|----------|------|-----------------|------|--------------------|-----|-------|------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| T | 17 | 65,4 | 16 | 55,2 | 16 | 80 | 49 | 65,3 |
| C | 9 | 34,6 | 13 | 44,8 | 4 | 20 | 26 | 34,7 |
| Total | 26 | 100 | 29 | 100 | 20 | 100 | 75 | 100 |

N, número

5.3.2 Pesquisa da inserção de adenina depois da posição 1733, descrita por Hussein e colaboradores (2010)

A presença de uma inserção de adenina depois da posição 1733 (**Figura 6**), característica das amostras *dupA1*, como descrito por Hussein e colaboradores (2010), foi observada em todas as amostras de *H. pylori* (**ANEXO B**).

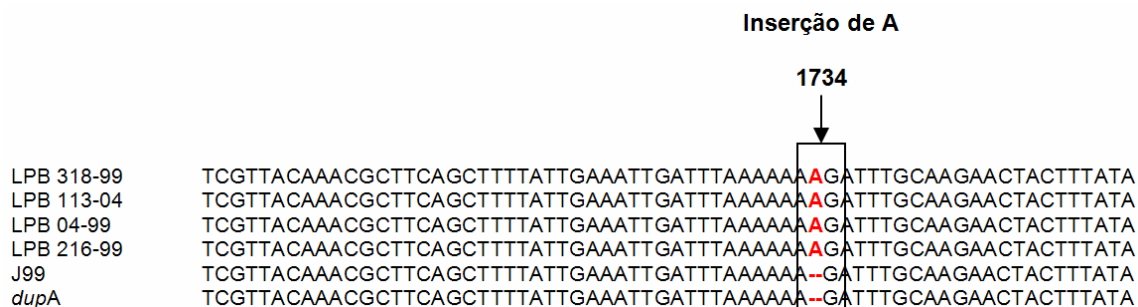


Figura 6: Inserção de adenina depois da posição 1733. Presença da inserção nas amostras LPB 318-99, LPB 113-04, LPB 04-99 e LPB 216-99. Ausência nas amostras J99 (ALM *et al.*, 1999) e *dupA* (LU *et al.*, 2005a).

5.3.3 Pesquisa de polimorfismos no *dupA*

Das 75 amostras, 41 (54,7%) não apresentaram polimorfismos que geram *stop codons* à montante da posição 1839. Por outro lado, 34 (45,3%) amostras apresentaram um ou mais polimorfismos que criam *stop codons*, rompendo o gene em produtos menores que o descrito como sendo *dupA*. Dos polimorfismos no *dupA* que geram *stop codons*, quatro eram do tipo pontual *non sense* e 12 inserções ou deleções de bases nucleotídicas (**Tabela 5**). Foram identificadas amostras com mais de um polimorfismo.

As **Figuras 7A, 7B e 7C** referem-se aos resultados individuais de cada amostra de acordo com as doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*. Pode-se observar a diversidade e quantidade de polimorfismos detectados. Nenhuma sequência gênica gerou produto de 1839 pb como descrito por Lu e colaboradores (2005a).

Tabela 5: Polimorfismos que levam a *stop codons* prematuros no gene *dupA* de acordo com as doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*

| Polimorfismo | Posição | Gastrite | Úlcera duodenal | Carcinoma gástrico | Total |
|-------------------------|---------|----------|-----------------|--------------------|-------|
| Substituição de CT → TA | 52 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Inserção T | 182 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Inserção T | 184 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Inserção A | 237 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| Substituição de C → T | 397 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| Deleção C | 578 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Deleção T | 794 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| Deleção A | 899 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| Substituição de C → T | 1240 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Inserção T | 1285 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Deleção A | 1311 | 4 | 4 | 4 | 12 |
| Inserção AA | 1378 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Inserção A | 1426 | 6 | 4 | 4 | 14 |
| Inserção AT | 1426 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| Substituição de G → T | 1633 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Deleção G | 1809 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| Total | | 19 | 14 | 15 | 48 |

dupA

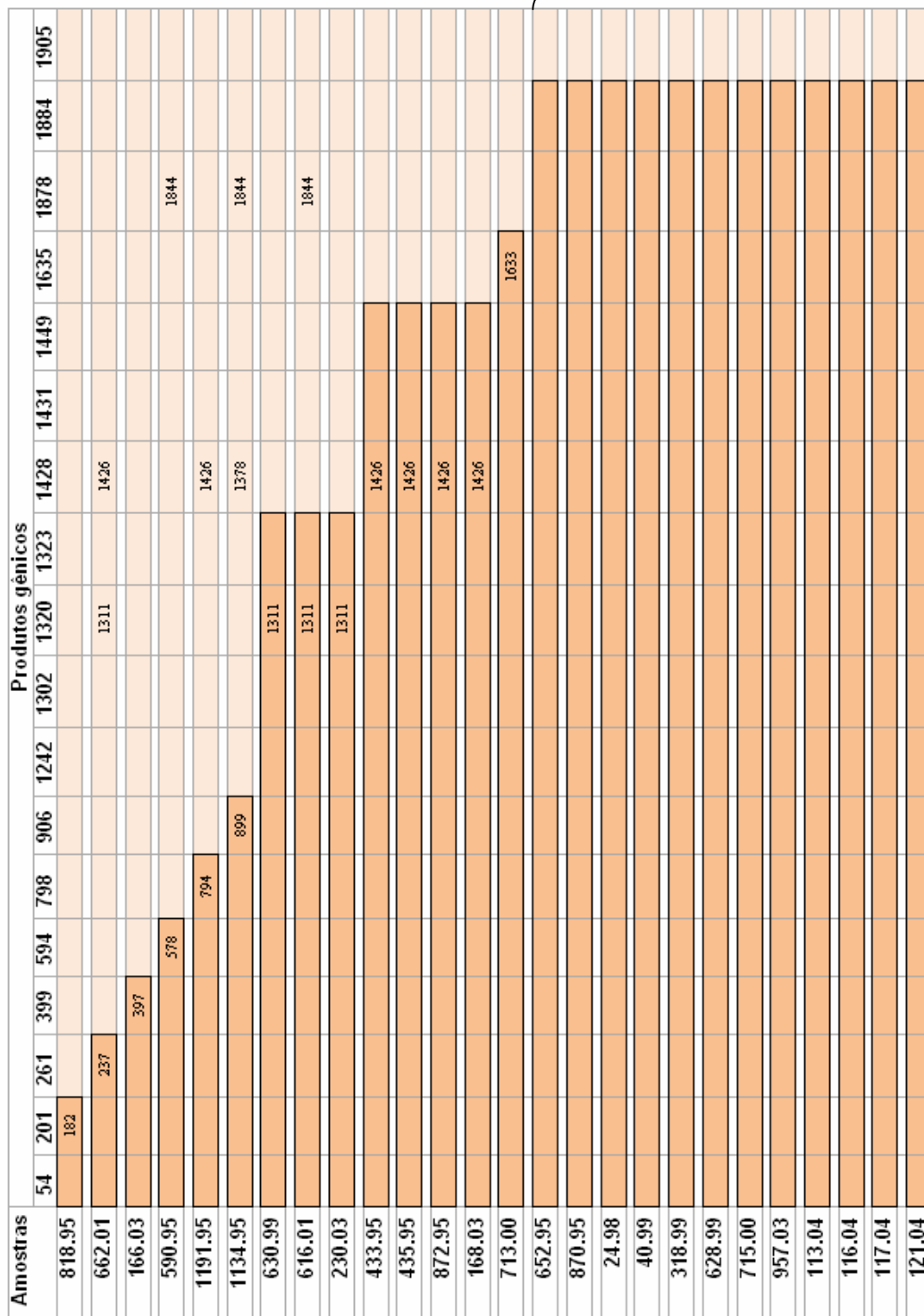


Figura 7A: Polimorfismos no *dupA* em linhagens isoladas de pacientes com gastrite. A inserção de adenina depois da posição 1733 não foi destacada na figura uma vez que ela foi encontrada em todas as amostras. Os números dentro das barras correspondem aos polimorfismos observados em cada amostra.

—→ Produtos gênicos

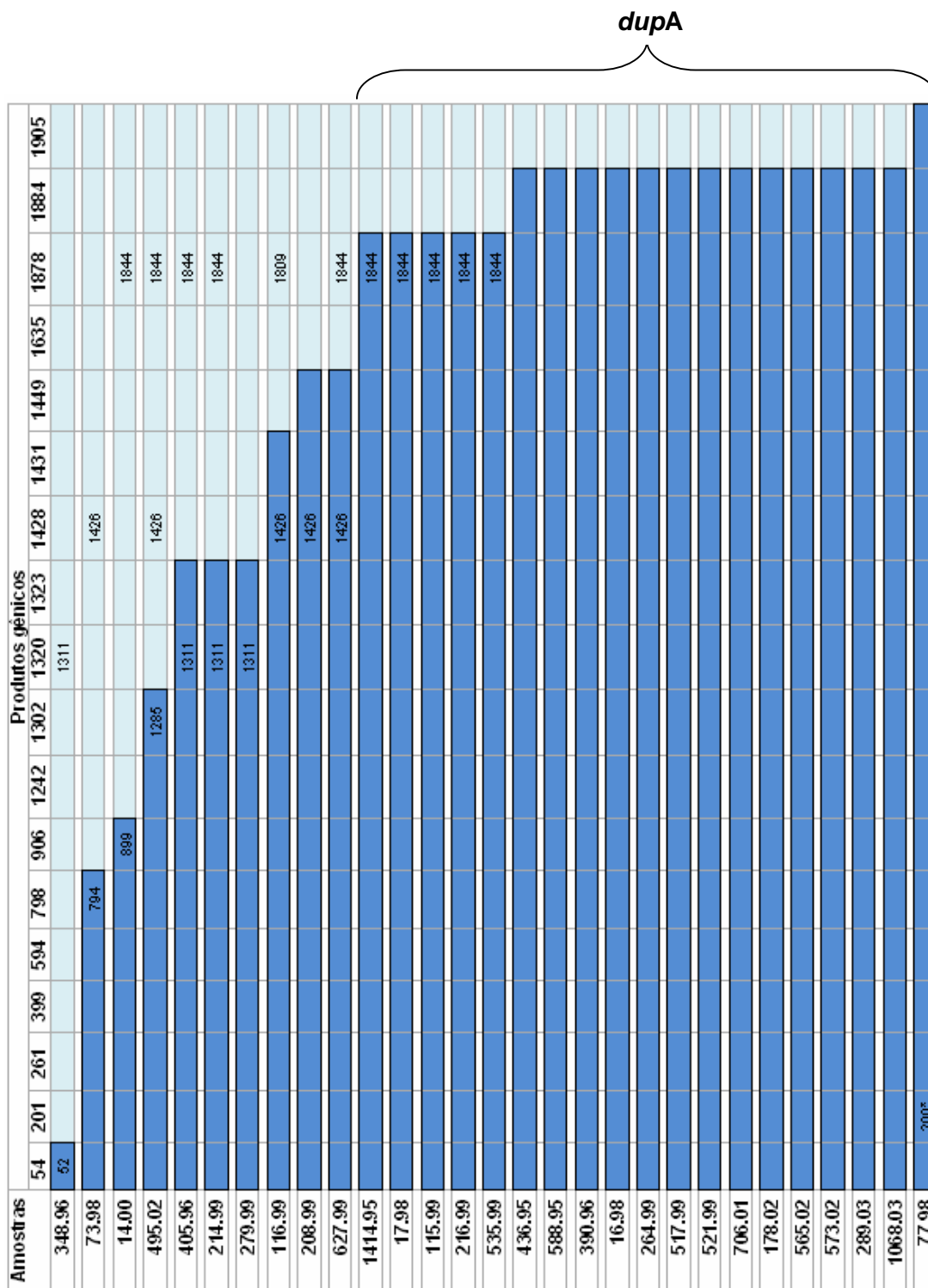


Figura 7B: Polimorfismos no *dupA* em linhagens isoladas de pacientes com úlcera duodenal. A inserção de adenina depois da posição 1733 não foi destacada na figura uma vez que ela foi encontrada em todas as amostras. Os números dentro das barras correspondem aos polimorfismos observados em cada amostra.

* Polimorfismos que não geram *stop codons*

■ → Produtos gênicos

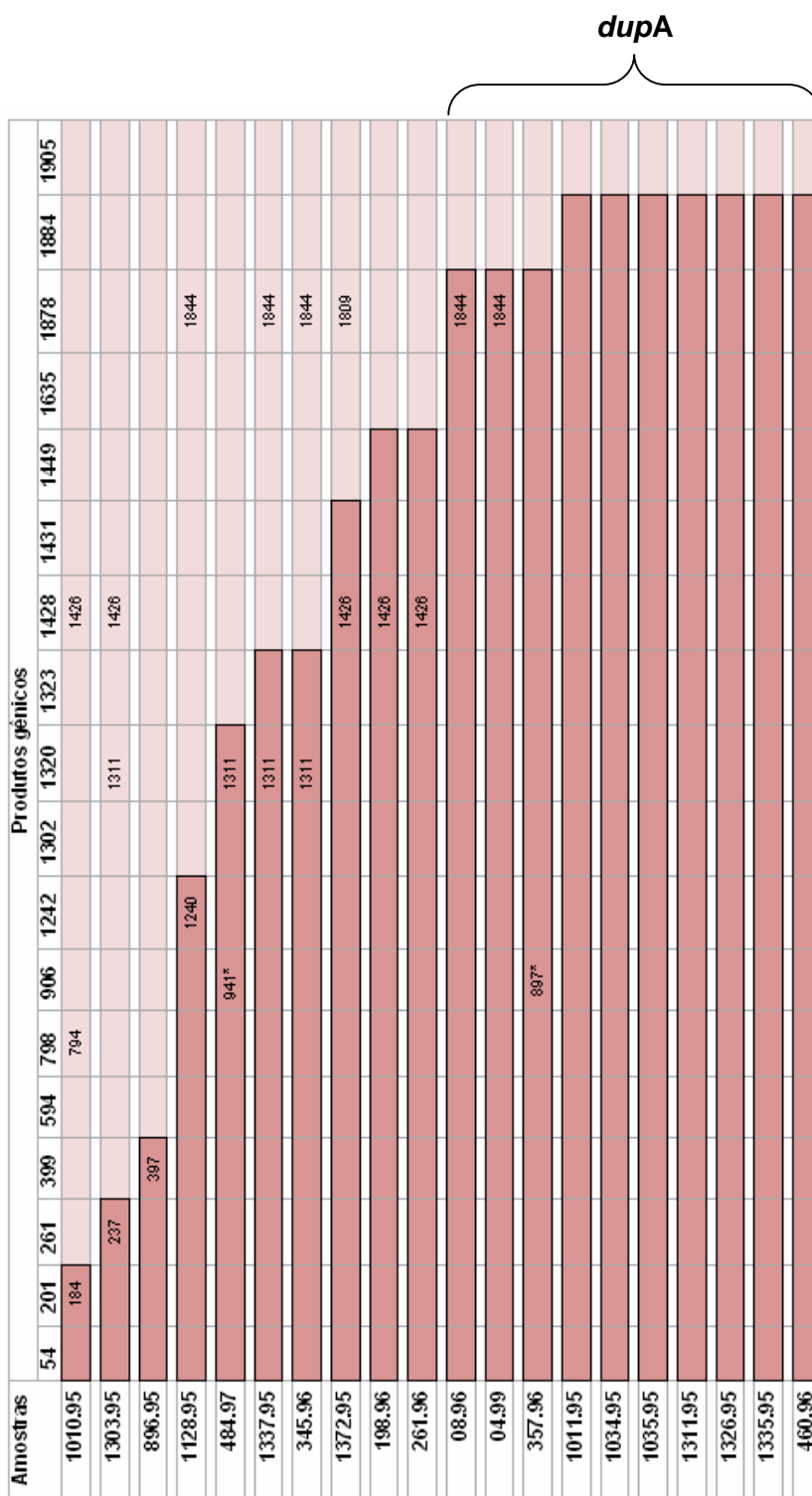


Figura 7C: Polimorfismos no *dupA* em linhagens isoladas de pacientes com carcinoma gástrico. A inserção de adenina depois da posição 1733 não foi destacada na figura uma vez que ela foi encontrada em todas as amostras. Os números dentro das barras correspondem aos polimorfismos observados em cada amostra.

* Polimorfismos que não geram *stop codons*

Vinte e seis das 75 amostras (34,67%) apresentaram os polimorfismos já descritos na nossa população: deleção de uma adenina na posição 1311 em 12 (16,0%) e a inserção de uma adenina na posição 1426 em 14 (18,67%). Presença simultânea dos dois polimorfismos foi vista em duas amostras (2,7%). Além disso, uma inserção de adenina na posição 237 também foi observada, criando um *stop codon* prematuro nessas duas amostras (**Figuras 7A e 7C**). Outros polimorfismos que levam à *stop codon* localizados à montante da deleção em 1311 estão compartilhados em 5 (19,2%) das 26 amostras: deleção de timina na posição 794, substituição de CT por TA na posição 52, inserção de timina na posição 1285 e inserção de timina na posição 184.

Entre os outros polimorfismos que criam *stop codons* prematuros no gene *dupA* destacam-se: inserção de AT na posição 1426, substituição de C por T na posição 397, deleção de adenina na posição 899 e deleção de guanina na posição 1809. Vale ressaltar que a deleção de guanina na posição 1809 foi observada em duas amostras que também apresentavam inserção de adenina na posição 1426 (**Figuras 7B e 7C**).

Foram ainda identificados três polimorfismos que não geram *stop codons*: uma deleção de AATGGT na posição 897 e deleção de ATA na posição 941 em duas amostras isoladas de pacientes com carcinoma gástrico (**Figura 7C**) e uma inserção de 21 pares de bases na posição 200 em uma amostra isolada de um paciente com úlcera duodenal. No último caso, o produto foi visto ser maior que o descrito como *dupA1*, contendo 1905 pares de bases (**Figura 7B**).

Ainda, foi observada uma deleção de CTAAA depois da posição 1844 em 18 (24%) das 75 amostras de *H. pylori* (**Figuras 7 e 8**), levando à formação de um

produto de 1878 pares de bases. Embora tenha sido mais frequente nas amostras isoladas de pacientes com úlcera duodenal ($n = 10$) que naquelas isoladas de pacientes com gastrite ($n = 3$) ou carcinoma gástrico ($n = 5$), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,10$).

**Deleção
CTAAAA**

| | |
|-------------|--|
| LPB 1337-95 | TTATAAGGAAGAGTATTTAAAAA.....TTAAAAAAGAAAGCGAGAATATTCAATATGTATAA |
| LPB 04-99 | TTATAAGGAAGAGTATTTAAAAA.....TTAAAAAAGAAAGCGAGAATATTCAATATGTATAA |
| LPB 216-99 | TTACAAGGAAGAGTATTTAAAAA.....TTAAAAAAGAAAGCGAGAAGTTCAATATGTATAA |
| J99 | TTATAAGGAAGAGTATTTAAAAA CTAAAA TTAAAAAAGAAAGCGAGAAGTTCAATATGTATAA |

Figura 8: Deleção de CTAAAA depois da posição 1844. Deleção observada nas amostras LPB 1337-95, LPB 04-99 e LPB 216-99. Ausência da deleção na amostra J99 (ALM *et al.*, 1999).

A frequência de amostras com mais de um polimorfismo no *dupA* de acordo com a doença também foi avaliada, comparando, entre as amostras polimórficas isoladas de cada grupo de pacientes, quantas apresentavam apenas um polimorfismo e quantas apresentavam mais de um polimorfismo no *dupA* (**Tabela 6**). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada ($p > 0,39$). Nenhum polimorfismo isoladamente foi associado à doença na nossa população.

Tabela 6: Número de polimorfismos no *dupA* de acordo com as doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*, independentemente de criarem ou não *stop codon*

| Número de polimorfismos | Gastrite | | Úlcera duodenal | | Carcinoma gástrico | | Total | |
|-------------------------|----------|------|-----------------|------|--------------------|-----|-------|------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| 0 | 12 | 46,2 | 18 | 62,1 | 9 | 45 | 39 | 52 |
| 1 | 11 | 42,3 | 7 | 24,1 | 7 | 35 | 25 | 33,3 |
| 2 | 2 | 7,6 | 4 | 13,8 | 2 | 10 | 8 | 10,7 |
| 3 | 1 | 3,9 | 0 | 0 | 2 | 10 | 3 | 4,0 |
| Total | 26 | 100 | 29 | 100 | 20 | 100 | 75 | 100 |

5.3.4 Associação entre a presença de *dupA*-intacto e risco das doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*

Quarenta e uma (54,7%) das 75 amostras geraram produtos maiores que 1839 pb e foram consideradas *dupA*-intactas (**Tabela 7**).

Tabela 7: Presença de *dupA*-intacto de acordo com as doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*

| <i>dupA</i> -intacto | Gastrite | | Úlcera duodenal | | Carcinoma gástrico | | Total | |
|----------------------|----------|------|-----------------|------|--------------------|-----|-------|------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| Presente | 12 | 46,2 | 19 | 65,5 | 10 | 50 | 41 | 54,7 |
| Ausente | 14 | 53,8 | 10 | 34,5 | 10 | 50 | 34 | 45,3 |
| Total | 26 | 100 | 29 | 100 | 20 | 100 | 75 | 100 |

A presença de *dupA*-intacto foi mais frequentemente observada nas amostras isoladas de pacientes com úlcera duodenal [n = 19 (65,5%)] que naquelas de

pacientes com gastrite [n = 12 (46,2%)] ou carcinoma gástrico [n = 10 (50%)]. Na análise logística, a presença do *dupA*-intacto associou-se independentemente com úlcera duodenal, mas não com a idade e o sexo do paciente (**Tabela 8**). Não houve associação entre a presença do *dupA*-intacto e câncer gástrico ($p = 0,8$).

Tabela 8: Variáveis associadas à infecção por linhagens de *H. pylori* com o gene *dupA*-intacto

| Variáveis | Análise univariada | Análise multivariada | | |
|-----------------|--------------------|----------------------|--------------|------|
| | p | OR | IC 95% | p |
| Sexo | 0,63 | 3,17 | 2,01 - 0,51 | 0,32 |
| Idade | 0,02 | 1,05 | 0,99 - 1,10 | 0,06 |
| Úlcera duodenal | 0,09 | 5,06 | 1,22 - 20,96 | 0,02 |

Teste Hosmer-Lemeshow: $p = 0,7$ (9 passos).

5.3.5 Sequências nucleotídicas do gene *dupA* de amostras isoladas da população estudada

As sequências completas do gene *dupA* de amostras isoladas de pacientes com gastrite (HM770857.1, HM770858.1, HQ228199.1 e HQ228200.1), com úlcera duodenal (HM770859.1, HM770860.1, HQ228197.1 e HQ228198.1) e com carcinoma gástrico (HM770861.1, HM770862.1, HQ228195.1 e HQ228196.1) foram depositadas no banco de dados GenBank.

6.0 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que o gene *dupA*-intacto do *H. pylori*, isto é, um produto com 1839 pb ou mais, é um fator de risco independente para o desenvolvimento de úlcera péptica duodenal mas não de câncer gástrico na nossa população. Identificamos também polimorfismos ainda não descritos, o que foi possível pelo sequenciamento completo do gene, adotando a metodologia *Primer Walking*.

Os motivos pelos quais apenas uma minoria das pessoas com gastrite crônica pelo *H. pylori* desenvolve doenças mais graves e como a infecção pode levar ao aparecimento de duas doenças mutuamente exclusivas - úlcera péptica duodenal e carcinoma gástrico - não estão totalmente esclarecidos.

O gene *dupA*, presente na zona de plasticidade de *H. pylori*, foi descrito como o primeiro marcador de virulência da bactéria que estaria associado a uma única doença, a úlcera duodenal (LU *et al.*, 2005a). Entretanto, resultados de trabalhos subsequentes investigando associação entre a presença do *dupA* e as doenças decorrentes da infecção pelo *H. pylori* são contraditórios. Essas discrepâncias podem-se dever a diferenças da prevalência do *dupA* nas diferentes populações estudadas, como tem sido observado com outros marcadores de virulência do *H. pylori* como o *cagA* (BLASER *et al.*, 1995; MIEHLKE *et al.*, 1996; PAN *et al.*, 1997; MAEDA *et al.*, 1999; RUDI *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2000). De fato, a prevalência do *dupA* variou, dependendo da população estudada, de 19,5% a 100% (DOURAGHI, *et al.*, 2008; ARGENT *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2009; PACHECO *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2010).

Entretanto, outras explicações incluem diferenças na metodologia adotada para a detecção do *dupA* ou, ainda, definição do que seria considerado como amostra *dupA*-positiva (YAMAOKA, 2008). Além disso, à medida que o marcador vai sendo estudado mais detalhadamente, novos polimorfismos do *dupA* vêm sendo descobertos e podem variar de acordo com as populações (QUEIROZ *et al.*, 2010; HUSSEIN *et al.*, 2010).

Como já dito, o *dupA* é formado pela união de dois genes; *jhp0917* e *jhp0918*. Considerando que o *jhp0917* é homólogo à região 5' do *virB4* enquanto o *jhp0918* é homólogo à região 3' do mesmo gene, acredita-se que a sequência completa homóloga ao *virB4* é formada apenas quando há a inserção da base T ou C depois da posição 1385 no *jhp0917*, criando uma janela de leitura contínua, o que resulta no *dupA* (LU *et al.*, 2005a). Entretanto, mutações nas sequências gênicas do *jhp0917* ou *jhp0918* que levam à formação de *stop codons* podem impedir a leitura completa do *dupA*, resultando na ausência de produtos ou na formação de produtos não funcionais. Assim, a identificação mais adequada desse marcador dependeria não só da observação da presença dos genes *jhp0917* e *jhp0918* por PCR e da inserção da base T ou C depois da posição 1385, como também da investigação de polimorfismos que criam *stop codons*. De fato, um estudo do nosso grupo (QUEIROZ *et al.*, 2010) demonstrou que, apesar de o gene *dupA* estar presente em quase 100% das amostras da nossa população, o sequenciamento de um fragmento de 214 pb do *dupA* revelou dois polimorfismos frequentes que criam *stop codons*, indicando que o gene poderia não ser funcional em algumas das linhagens consideradas *dupA*-positivas por métodos convencionais. Os resultados desse trabalho nos mostraram a necessidade de se proceder ao sequenciamento em toda

a extensão do gene à procura de novos polimorfismos que poderiam também estar impedindo a expressão ou formação da proteína.

Enquanto o presente trabalho estava em andamento, Hussein e colaboradores (2010) publicaram um estudo também relatando polimorfismos no gene *dupA*. Os autores observaram que amostras de *H. pylori* apresentavam frequentemente uma inserção de adenina em uma cadeia poliA na porção 3' do *dupA* que levava à extensão da janela de leitura do gene até 1884 pares de bases, 45 pb a mais que do produto gênico descrito por Lu e colaboradores (2005a). Além disso, os autores relataram a deleção de adenina na posição 1311 originalmente descrita pelo nosso grupo (QUEIROZ *et al.*, 2010) em algumas sequências de *dupA*, indicando que o polimorfismo descrito em linhagens de *H. pylori* na nossa população pode ser comum também em linhagens isoladas de outras populações.

No presente trabalho, adotando a técnica de sequenciamento gênico *Primer Walking* obtivemos o sequenciamento completo do *dupA* de todas as amostras testadas, sem a necessidade de clonagem do gene. As sequências nucleotídicas, conferidas manualmente nos eletroferogramas, apresentaram-se limpas, permitindo uma leitura precisa de toda a extensão do gene. Em concordância com os resultados publicados anteriormente pelo nosso grupo (QUEIROZ *et al.*, 2010), a deleção de adenina na posição 1311 e a inserção de adenina na posição 1426 do *dupA* foram detectadas com frequência. Somados a elas, 14 polimorfismos ainda não descritos foram identificados; e, embora distintos uns dos outros, também levam à *stop codons*, criando sequências gênicas de tamanhos diferentes e possivelmente não funcionais. Além disso, em algumas linhagens havia a presença simultânea de vários polimorfismos.

A análise das sequências ainda revelou, curiosamente, a presença, no *dupA* de todas as nossas amostras, da inserção de A depois da posição 1733, descrita por Hussein e colaboradores (2010). Entretanto, em mais da metade dos casos, o produto gênico esperado, de 1884 pares de base, não é formado, uma vez que outros polimorfismos localizados à montante da posição 1733 foram detectados. Esse resultado ilustra como a pesquisa de apenas uma região do gene não é suficiente para determinar o status *dupA* da linhagem.

Tendo como parâmetro o produto gênico de 1839 pb, originalmente descrito por Lu e colaboradores (2005a) como *dupA*, consideramos *dupA*-negativas as linhagens com produtos gênicos menores que 1839 pb e *dupA*-intactas aquelas com produtos iguais ou maiores que 1839 pb. Determinamos em modelos logísticos que infecções por amostras com *dupA*-intacto estão associadas com úlcera duodenal, mas não com câncer gástrico, identificando pela primeira vez um possível marcador de úlcera duodenal na nossa população.

Apesar de até o momento a proteína DupA não ter sido caracterizada, bem como sua função, há evidências que o *dupA* seja um gene funcional. A presença do gene está associada a aumento na concentração gástrica de IL-8 (LU et al., 2005a, QUEIROZ et al., 2010), bem como aumento da produção “*in vitro*” de IL-8 e IL-12p70 por células mononucleares do sangue periférico (HUSSEIN et al., 2010). Além disso, amostras *dupA*-positivas de *H. pylori* mostraram, *in vitro*, capacidade maior de sobrevivência em pH ácido (LU et al. 2005a), característica que pode ser benéfica para a sobrevivência da bactéria no ambiente de hiperacidez gástrica característico de pacientes com úlcera duodenal, contribuindo para aumento da carga bacteriana e conseqüentemente maior agressão ao hospedeiro. Mais recentemente, Nguyen e colaboradores (2010) demonstraram, por RT-PCR, que o *dupA* é transcrito,

fornecendo evidências mais concretas de que, diferentemente do que foi demonstrado para alguns genes da região de plasticidade do genoma de *H. pylori* (OCCHIALINI *et al.*, 2000), o *dupA* não é um pseudogene.

Nesse estudo, em resumo, identificamos novos polimorfismos no *dupA*, possivelmente funcionais. Considerando como *dupA*-positivas apenas as linhagens com *dupA* sem polimorfismos que geram *stop codons*, o gene foi visto ser um fator de risco para o desenvolvimento de úlcera duodenal na nossa população. Esses achados reforçam a importância de se proceder ao sequenciamento completo do gene para caracterizar uma amostra como *dupA*-positiva e a necessidade de se investigar futuramente como esses polimorfismos interferem na expressão e/ou função do gene.

7.0 CONCLUSÕES

- Pela técnica de *Primer Walking*, foi possível sequenciar toda a extensão dos genes *jhp0917* e *jhp0918* que formam o *dupA* de *H. pylori*.
- Um número grande de polimorfismos, além dos já descritos no *dupA*, foram identificados.
- Considerando amostras *dupA*-negativas quando haviam polimorfismos que levam a *stop codons* prematuros, a presença do *dupA*-intacto associou-se com úlcera duodenal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, R. A., LING, L. S., MOIR, D. T., KING, B. L., BROWN, E. D., DOIG, P. C., SMITH, D. R., NOONAN, B., GUILD, B. C., DE JONGE, B. L., CARMEL, G., TUMMINO, P. J., CARUSO, A., URIA-NICKELSEN, M., MILLS, D. M., IVES, C., GIBSON, R., MERBERG, D., MILLS, S. D., JIANG, Q., TAYLOR, D. E., VOVIS, G. F., TRUST, T. J. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, 397 (6721), 176-180, 1999.

ALM, R. A., TRUST, T. J. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. **J. Mol. Med.**, 77 (12), 834-846, 1999.

ARACHCHI, H. S., KALRA, V., LAL, B., BHATIA, V., BABA, C. S., CHAKRAVARTHY, S., ROHATGI, S., SARMA, P. M., MISHRA, V., DAS, B., AHUJA, V. Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (*dupA*) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population. **Helicobacter**, 12 (6), 591-597, 2007.

ARGENT, R. H., BURETTE, A., DEYI, V. Y. M., ATHERTON, J. C. The presence of *dupA* in *Helicobacter pylori* is not significantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China, or North America. **Clin. Infect. Dis.**, 45 (9), 1204-1206, 2007.

ATHERTON, J. C., CAO, P., PEEK JR., R. M., TUMMURU, M. K. R., BLASER, M. J., COVER, T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J. Biol. Chem.**, 270 (30), 17771-17777, 1995.

BASSO, D., PLEBANI, M. *H. pylori* infection: bacterial virulence factors and cytokine gene polymorphisms as determinants of infection outcome. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, 43 (3), 313-337, 2004.

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **J. Infect. Dis.**, 161 (4), 626-633, 1990.

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a 'slow' bacterial infection. **Trends. Microbiol.**, 1(7), 255-260, 1993.

BLASER, M. J., BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J. Clin. Invest.**, 107 (7), 767-773, 2001.

BLASER, M. J., PARSONNET, J. Parasitism by the 'slow' bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. **J. Clin. Invest.**, 94 (1), 4-8, 1994.

BLASER, M. J., PEREZ-PEREZ, G. I., KLEANTHOS H., COVER, T. L., PEEK, R. M., CHYOU, P. H., STEMMERMANN, G. N., NOMURA, A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res.**, 55 (10), 2111-2115, 1995.

BODE, G., MALFERTHEINER, P., NILIUS, M., LEHNHARDT, G., DITSCHUNEIT, H. Ultrastructural localisation of urease in outer membrane and periplasm of *Campylobacter pylori*. **J. Clin. Pathol.**, 42 (7), 778-779, 1989.

CENSINI, S., LANGE, C., XIANG, Z., CRABTREE, J. E., GHIARA, P., BORODOVSKY, M., RAPPUOLI, R., COVACCI, A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes types I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 93 (25), 14648-14653, 1996.

COVACCI, A., RAPPUOLI, R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. **J. Exp. Med.**, 191 (4), 587-592, 2000.

COVACCI, A., TELFORD, J. L., DEL GIUDICE, G., PARSONNET, J., RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**, 284 (5418), 1328-1333, 1999.

COVER, T. L., BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. **ASM. News**, 109, 136-141, 1995.

COVER, T. L., BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. **Adv. Intern. Med.**, 41, 85-117, 1996.

COVER, T. L., HALTER, S. A., BLASER, M. J. Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. **Hum. Pathol.**, 23 (9), 1004-1010, 1992.

COVER, T. L., TUMMURU, M. K., CAO, P., THOMPSON, S. A., BLASER, M. J. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. **J. Biol. Chem.**, 269 (14), 10566-10573, 1994.

DOURAGHI, M., MOHAMMADI, M., OGHALAIE, A., ABDIRAD, A., MOHAGHEGHI, M. A., HOSSEIN, I. M. E., ZERAATI, H., GHASEMI, A., ESMAIELI, M., MOHAJERANI, N. *dupA* as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. **J. Med. Microbiol.**, 57, 554-562, 2008.

DUNN, B. E., COHEN, H., BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 10 (4), 720-741, 1997.

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

EVANS, D. G., QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N., EVANS JR., D. J. *Helicobacter pylori* *cagA* status and s and m alleles of *vacA* in isolates from individuals with a variety of *H. pylori*-associated gastric diseases. **J. Clin. Microbiol.**, 36 (11) 3435-3437, 1998.

FORMAN, D., NEWELL, D. J., FULLERTON, F., YARNELL, J. W. G., STACEY, A. R., WALD, N., SITAS, F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. **Br. Med. J.**, 302 (6788), 1302-1305, 1991.

GEBERT, B., FISCHER, W., WEISS, E., HOFFMANN, R., HAAS, R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science**, 301 (5636), 1099-1102, 2003.

GEIS, G., LEYING, H., SUERBAUM, S., MAI, U., OPFERKUCH, W. Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. **J. Clin. Microbiol.**, 27 (3), 436-411, 1989.

GOMES, L. I., ROCHA, G. A., ROCHA, A. M. C., SOARES, T. F., OLIVEIRA, C. A., BITTENCOURT, P. F. S., QUEIROZ, D. M. M. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with dupA-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. **Int. J. Med. Microbiol.**, 298 (3-4), 223-230, 2008.

GOODMAN, K. J., CORREA, P., AUX, H. J. T., RAMÍREZ, H., DELANY, J. P., PEPINOSA, O. G., QUINONES, M. L., PARRA, T. C. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population based study of transmission pathways. **Am. J. Epidemiol.**, 144 (3), 290-299, 1996.

GOODWIN, C. S., ARMSTRONG, J. A., CHILVERS, T., PETERS, M., COLLINS, M. D., SLY, L., MCCONNELL, W., HARPER, W. E. S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 39 (4), 397-405, 1989.

GOODWIN, C. S., BLINCOW, E. D., WARREN, J. R., WATERS, T. E., SANDERSON, C. R., EASTON, L. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. **J. Clin. Pathol.**, 38 (10), 1127-1131, 1985a.

GOODWIN, C. S., MCCULLOCH, R. K., ARMSTRONG, J. A., WEE, S. H. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. **J. Med. Microbiol.**, 19 (2), 257-267, 1985b.

GUSMÃO, V. R., MENDES, E. N., QUEIROZ, D. M. M., ROCHA, G. A., ROCHA, A. M. C., ASHOUR, A. A. R., CARVALHO, A. S. T. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, 38 (8), 2853-2857, 2000.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. **Inter. J. Antimicrobiol. Agents**, 22 (4), 360-366, 2003.

HAZELL, S. L., EVANS, D. J., GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori*. **J. Gen. Microbiol.**, 137, 57-61, 1991.

HESSEY, S. J., SPENCER, J., WYATT, J. I., SOBALA, G., RATHBONE, B. J., AXON, A. T. R., DIXON, M. F. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. **Gut**, 31 (2), 134-138, 1990.

HOWDEN, C. W. Clinical expressions of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Med.**, 100, 27-32, 1996.

HUSSEIN, N. R., MOHAMMADI, M., TALEBKHAN, Y., DORAGHI, M., LETLEY, D. P., MUHAMMAD, M. K., ARGENT, R. H., ATHERTON, J. C. Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori*-associated disease. **J. Clin. Microbiol.**, 46 (5), 1774-1779, 2008.

HUSSEIN, N. R., ARGENT, R. H., MARX, C. K., PATEL, S. R., ROBINSON, K., ATHERTON, J. C. *Helicobacter pylori dupA* is polymorphic, and its active form induces proinflammatory cytokine secretion by mononuclear cells. **J. Infect. Dis.**, 202 (2), 261-269, 2010.

ILVER, D., ARNQVIST, A., OGREN, J., FRICK, I. M., KERSULYTE, D., INCECIK, E. T., BERG, D. E., COVACCI, A., ENGSTRAND, L., BORÉN, T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science**, 279 (5349), 373-377, 1998.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Views and expert opinions of an IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. **Lyon, IARC/WHO**, 61, 177-241, 1994.

KIDD, M., LASTOVICA, A. J., ATHERTON, J. C., LOUW, J. A. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? **Gut**, 45 (4), 499-502, 1999.

KUCK, D., KOLMERER, B., IKING-KONERT, C., KRAMMER, P. H., STREMMEL, W., RUDI, J. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. **Infect. Immun.**, 69 (8), 5080-5087, 2001.

LEE, A. The microbiology and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Scand. J. Gastroenterol.**, 29 (1), 2-6, 1994.

LU, H., HSU, O. I., GRAHAM, D. Y., YAMAOKA, Y. Duodenal Ulcer Promoting Gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 128 (4), 833-848, 2005a.

LU, H., YAMAOKA, Y., GRAHAM, D. Y. *Helicobacter pylori* virulence factors: facts and fantasies. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 21 (6), 653-659, 2005b.

MAEDA, S., YOSHIDA, H., IKENOUE, T., OGURA, K., KANAI, F., KATO, N., SHIRATORI, Y., OMATA, M. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. **Gut**, 44 (3), 336-341, 1999.

MAHDAVI, J., SONDÉN, B., HURTIG, M., OLFAT, F. O., FORSBERG, L., ROCHE, N., ANGSTROM, J., LARSSON, T., TENEBERG, S., KARLSSON, K. A., ALTRAJA, S., WADSTRÖM, T., KERSULYTE, D., BERG, D. E., DUBOIS, A., PETERSSON, C., MAGNUSS, K. E., NORBERG, T., LINDH, F., LUNDSKOG, B. B., ARNQVIST, A., HAMMARSTRÖM, L., BORÉN, T. *Helicobacter pylori* SabA Adhesin in Persistent Infection and Chronic Inflammation. **Science**, 297 (5581), 573-578, 2002.

MALATY, H. M., GRAHAM, D. Y. Importance of childhood socioeconomic status in the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, 35 (6), 742-745, 1994.

MARSHALL, B. J. *Helicobacter pylori*. **Am. J. Gastroenterol.**, 89, 116-128, 1994.

MARSHALL, B. J., BARRETT, L. J., PRAKASH, C., MCCALLUM, R. W., GUERRANT, R. L. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. **Gastroenterology**, 99 (3), 697-702, 1990.

MARSHALL, B. J., GOODWIN, C. S. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 37 (1), 68, 1987.

MÉGRAUD, F., LAMOULIATTE, H. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Evidence suggesting causation. **Dig. Dis. Sci.**, 37 (5), 769-772, 1992.

MIEHLKE, S., KIBLER, K., KIM, J. G., FIGURA, N., SMALL, S. M., GRAHAM, D. Y., GO, M. F. Allelic variation in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States. **Am. J. Gastroenterol.**, 91 (7), 1322-1325, 1996.

NAKAYAMA, M., KIMURA, M., WADA, A., YAHIRO, K., OGUSHI, K., NIIDOME, T., FUJIKAWA, A., SHIRASAKA, D., AOYAMA, N., KURAZONO, H., NODA, M., MOSS, J., HIRAYAMA, T. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. **J. Biol. Chem.**, 279 (8), 7024-7028, 2004.

NGUYEN, L. T., UCHIDA, T., TSUKAMOTO, Y., KURODA, A., OKIMOTO, T., KODAMA, M., MURAKAMI, K., FUJIOKA, T., MORIYAMA, M. *Helicobacter pylori* *dupA* gene is not associated with clinical outcomes in the Japanese population. **Clin. Microbiol. Infect.**, 16 (8), 1264-1269, 2010.

NOGUEIRA, C., FIGUEIREDO, C., CARNEIRO, F., GOMES, A. T., BARREIRA, R., FIGUEIRA, P., SALGADO, C., BELO, L., PEIXOTO, A., BRAVO, J. C., BRAVO, L. E., REALPE, J. L., PLAISIER, A. P., QUINT, W. G., RUIZ, B., CORREA, P., VAN DOORN, L. J. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. **Am. J. Pathol.**, 158 (2), 647-654, 2001.

OCCHIALINI, A., MARAIS, A., ALM, R., GARCIA, F., SIERRA, R., MEGRAUD, F. Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. **Infect. Immun.**, 68(11), 6240-6249, 2000.

O'TOOLE, P. W., LANE, M. C., PORWOLLIK, S. *Helicobacter pylori* motility. **Microbes and infection**, 2 (10), 1207-1214, 2000.

PACHECO, A. R., PROENÇA-MÓDENA, J. L., SALES, A. I. L., FUKUHARA, Y., DA SILVEIRA, W. D., PIMENTA-MÓDENA, J. L., DE OLIVEIRA, R. B., BROCCHI, M. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal disease. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 27(11), 1053-1059, 2008.

PAN, Z. J., VAN DER HULST, R. W., FELLER, M., XIAO, S. D., TYTGAT, G. N., DANKERT, J., VAN DER ENDE, A. Equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. **J. Clin. Microbiol.**, 35 (6), 1344-1347, 1997.

PARSONNET, J., FRIEDMAN, G. D., VANDERSTEEN, D. P., CHANG, Y., VOGELMAN, J. H., ORENTREICH, N., SIBLEY, R. K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, 325 (16), 1127-1131, 1991.

PRINZ, C., SCHÖNIGER, M., RAD, R., BECKER, I., KEIDITSCH, E., WAGENPFEIL, S., CLASSEN, M., RÖSCH, T., SCHEPP, W., GERHARD, M. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. **Cancer Res.**, 61 (5), 1903-1909, 2001.

QUEIROZ, D. M. M., BARBOSA, A. J. A., MENDES, E. N., ROCHA, G. A., CISALPINO, E. O., LIMA Jr., G. F., OLIVEIRA, C. A. Distribution of *Campylobacter pylori* and gastritis in the stomach of patients with and without duodenal ulcer. **Am. J. Gastroenterol.**, 83 (12), 1368-1370, 1988.

QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N., CARVALHO, A. S. T., ROCHA, G. A., OLIVEIRA, A. M. R., SOARES, T. F., SANTOS, A., CABRAL, M. M. D. A., NOGUEIRA, A. M. M. F. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a *cagA*-positive strain in children. **J. Infect. Dis.**, 181 (2), 626-630, 2000.

QUEIROZ, D. M. M., MENDES, E. N., ROCHA, G. A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J. Clin. Microbiol.**, 25 (12), 2378-2379, 1987.

QUEIROZ, D. M. M., ROCHA, G. A., ROCHA, A. M. C., MOURA, S. B., SARAIVA, I. E. B., GOMES, L. I., SOARES, T. F., MELO, F. F., CABRAL, M. M. D. A., OLIVEIRA, C. A. *dupA* polymorphisms and risk of *Helicobacter pylori*-associated diseases. **Int. J. Med. Microbiol.**, 300, *in press*, 2010.

ROCHA, G. A., ROCHA, A. M. C., SILVA, L. D., SANTOS, A., BOCEWICZ, A. C. D., QUEIROZ, R. M., BETHONY, J., GAZZINELLI, A., CORRÊA-OLIVEIRA, R., QUEIROZ, D. M. M. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, 8 (11), 987-991, 2003.

ROMANIUK, P. J., ZOLTOWSKA, B., TRUST, T. J., LANE, D. J., OLSEN, G. J., PACE, N. R., STAHL, D. A. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter sp.* **J. Bacteriol.**, 169 (5), 2137-2141, 1987.

RUDI, J., RUDY, A., MAIWALD, M., KUCK, D., SIEG, A., STREMMEL, W. Direct determination of *Helicobacter pylori vacA* genotypes and *cagA* gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. **Am. J. Gastroenterol.**, 94 (6), 1525-1531, 1999.

SARKER, A. S., MAHALANABIS, D., HILDEBRAND, P., RAHAMAN, M. M., BARDHAN, P. K., FUCHS, G., BEGLINGER, C., GYR, K. *Helicobacter pylori* prevalence, transmission and serum pepsinogen II concentrations in children of poor periurban community in Bangladesh. **Clin. Infect. Dis.**, 25 (5), 990-995, 1997.

SCHEIMAN, J. M., CUTLER, A. F. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. **Am. J. Med.**, 106 (2), 222-226, 1999.

SCHMIDT, H. M., ANDRES, S., KAAKOUSH, N. O., ENGSTRAND, L., ERIKSSON, L., GOH, K. L., FOCK, K. M., HILMI, I., DHAMODARAN, S., FORMAN, D., MITCHELL, H. The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (*dupA*) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study. **Gut Pathogens**, 1 (1), 5, 2009.

SIPPONEN, P. Long-term consequences of gastroduodenal inflammation. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 4 (suppl 2), 25-29. 1992.

TAYLOR, D. E. Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. **Annu. Rev. Microbiol**, 46, 35-64, 1992.

TAYLOR, D. E., HARGREAVES, J. A., NG, L. K., SHERBANIUK, R. W., JEWELL, L. D. Isolation and characterization of *Campylobacter pyloridis* from gastric biopsies. **Am. J. Clin. Pathol.**, 87 (1), 49-54, 1987.

THOMSEN, L. L., GAVIN, B. J., TASMAN-JONES, C. Relation of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa in chronic gastritis of the antrum. **Gut**, 32 (1), 230-236, 1990.

TOMB, J. F., WHITE, O., KERLAVAGE, A. R., CLAYTON, R. A., SUTTON, G. G., FLEISCHMANN, R. D., KETCHUM, K. A., KLENK, H. P., GILL, S., DOUGHERTY, B. A., NELSON, K., QUACKENBUSH, J., ZHOU, L., KIRKNESS E. F., PETERSON, S., LOFTUS, B., RICHARDSON, D., DODSON, R., KHALAK, H. G., GLODEK, A., MCKENNEY, K., FITZGERALD, L. M., LEE, N., ADAMS, M. D., HICKEY, E. K., BERG, D. E., GOCAYNE, J. D., UTTERBACK, T. R., PETERSON, J. D., KELLEY, J. M., COTTON, M. D., WEIDMAN, J. M., FUJII, C., BOWMAN C., WATTHEY, L., WALLIN, E., HAYES, W. S., BORODOVSKY, M., KARP, P. D., SMITH, H. O., FRASER, C. M., VENTER, J. C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, 388 (6642), 539-547, 1997.

UNEMO, M., ASPHOLM-HURTIG, M., ILVER, D., BERGSTRÖM, J., BORÉN. T., DANIELSSON, D., TENEBERG, S. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, 280 (15), 15390-15397, 2005.

VAN DOORN, L. J., FIGUEIREDO, C., MÉGRAUD, F., PENA, S., MIDOLO, P., QUEIROZ, D. M. M., CARNEIRO, F., VANDERBORGHT, B., PEGADO, M. D., SANNA, R., DE BOER, W., SCHNEEBERGER, P. M., CORREA, P., NG, E. K., ATHERTON, J., BLASER, M. J., QUINT, W. G. Geografic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 116 (4), 823-830, 1999.

WARREN, J. R., MARSHALL, B. J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet**, 1 (8336), 1273-1275, 1983.

WEEKS, D. L., SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. **Mol. Microbiol.**, 40 (6), 1249-1289, 2001.

WOTHERSPOON, A. C., ORTIZ-HIDALGO, C., FALZON, M. R., ISSASON, P. G. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. **Lancet**, 338 (8776), 1175-1176, 1991.

WOTHERSPOON, A. C., PATH, M. R. C. Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. **Annu. Rev. Med.**, 49, 289-299, 1998.

YAMAOKA, Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. **J. Med. Microbiol.**, 57, 545-553, 2008.

ZHANG, Z., ZHENG, Q., CHEN, X., XIAO, S., LIU, W., LU, H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. **BMC Gastroenterol.**, 8, 49, 2008.

ANEXOS

ANEXO A

Sequências dos cinco fragmentos (A, B, C, D e E) correspondentes a sequência completa do gene *dupA* de uma amostra de *H. pylori*.

ANEXO B