

**PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA PRESENÇA DO
GENE *cagA* EM BIÓPSIAS GÁSTRICAS POSITIVAS PARA PRESENÇA DO
*Helicobacter pylori***

**STANDARDIZATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION THE PRESENCE
OF *cagA* GENE IN GASTRIC BIOPSIES POSITIVE FOR THE PRESENCE OF
*Helicobacter pylori***

¹ HEREMAN, M.J.; ² GATTI, L.L.

¹ Departamento de Ciências Biológicas/FIO/FEMM

² Departamento de Ciências Biológicas e Farmacêuticas/FIO/FEMM

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria caracterizada como Gram negativa microaerófila responsável por colonizar seres humanos de forma cosmopolita causando distúrbios gástricos como gastrite crônica e câncer gástrico. São várias as combinações gênicas que podem interferir na infecção, toxidade e processo inflamatório da bactéria em seus hospedeiros. O presente estudo tem como finalidade analisar material gástrico, detectar e caracterizar a presença do gene *cagA*, gene esse que, se for positivo potencializa o processo inflamatório da mucosa gástrica através da estimulação da Interleucina 8 e, desencadeia uma inflamação aguda podendo até evoluir a um câncer gástrico. Pelo fato desse gene não estar presente em toda cepa de *H. pylori* e sabendo-se que sua presença pode variar entre 40 e 60% dessas cepas, variando desta forma a virulência da bactéria de acordo com a presença ou ausência do gene. Para a padronização e caracterização do gene *cagA* foi utilizada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação de tal gene, onde através da técnica obteve-se resultados de uma maneira precisa e eficaz.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, gastrite crônica, gene *cagA*.

ABSTRACT

The *Helicobacter pylori* is a bacteria known as Gram negative microaerophilic bacillus responsible for colonizing human as cosmopolit, causing gastric disease and chronic gastritis and gastric cancer. There are several gene combinations that can interfere with the infection, toxicity and inflammatory process of the bacteria in their hosts. This study aims to examine gastric material, detect and characterize the presence of the *cagA* gene, the gene that, if positive potentiates the inflammatory process at the gastric mucosa by Interleukin 8 and triggers the acute inflammation and may even change a gastric cancer. For this gene is not present in all strain of *H. pylori* and knowing that their presence can vary between 40 and 60% of strains, this study will be detect this factor. For the standardization and characterization of the *cagA* gene it was used the PCR tecnic (Polymerase Chain Reaction) for the amplification of gene, this way the results were shown accurate.

Keywords: *Helicobacter pylori*, chronic gastritis, *cagA* gene.

INTRODUÇÃO

As doenças gástricas nada mais são do que uma reação inflamatória na parede do estômago que por meio de biopsias endoscópicas, podem ser classificadas como gastrites agudas ou crônicas. Considerada a forma mais comum de gastrite, a gastrite crônica caracteriza-se por desencadear uma reação inflamatória na mucosa com infiltrado de leucócitos em proporção e intensidade bastante variáveis. Tratando-se de gastrite crônica, podem-se considerar três causas importantes; a bacteriana, provocada pela bactéria *H. pylori*, foco de tal estudo; auto-imune e químicos como por uso em excesso de anti-inflamatórios. (BOGLIOLO, 2006).

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) tem sido descrito na literatura como o responsável pela gênese de gastrite, úlcera péptica e neoplasias gástricas (ANDERSEN et al., 1998). Descrito primeiramente por Marshall e Warren em 1983, refere-se a uma bactéria gram negativa, com forma curva, contendo de 6 a 8 flagelos arranjados em forma unipolar ou bipolar. Outra característica típica desta espécie é a produção abundante de uma enzima denominada urease, a qual é responsável pela degradação da uréia em amônia alcalinizando o pH gástrico. Estas características são adaptativas a sobrevivência da bactéria no estômago. (JERRIS, 1995).

A forma exata de transmissão do *H. pylori* ainda é desconhecida por tratar-se de um microorganismo não invasivo. Assim, é universalmente aceito que essa bactéria alcança a mucosa gástrica pela boca. (KODAIRA et al., 2002).

Há indícios de que a aglomeração humana seja um mecanismo importante quanto à transmissão pessoa a pessoa do agente segundo Rothenbacher et al., (1998), caracterizando-se então duas grandes vias transmissoras: a oral-oral e a fecal-oral.

O gene *cagA*, presente em 60-70% das cepas de *H. pylori* codifica uma proteína imunodominante de alto peso molecular, 120-140 KDa, de função ainda desconhecida (COVACCI et al., 1993).

Este gene situa-se em um *locus* genômico que contém genes que potencialmente codificam o sistema de secreção tipo IV (Hacker et al., 1990). Portanto, a presença desta região pode ser uma indicação de maior virulência dessa bactéria. (CENSINI et al., 1996).

Outros trabalhos associam a presença do gene *cagA* a uma maior capacidade de colonização das bactérias, desenvolvimento de um processo inflamatório, com estímulo da liberação de interleucina- 8 (IL-8). A IL-8 é responsável pelo aumento da migração de neutrófilos na região da infecção. Este aumento não é suficiente para reprimir a infecção, ocorrendo desintegração de neutrófilos, liberação de óxido nítrico e radical hidroxil. Estes são potencialmente mutagênicos induzindo danos na mucosa, proliferação de células com elevado risco de erro na síntese de DNA, perda de estruturas epiteliais, subsequente atrofia e eventual metaplasia. (CORREA, 1995; AKOPYANTS, 1998; KEATES et al., 1999).

No Brasil, Queiroz et al., (1998) demonstraram que existe uma correlação entre a presença do gene *cagA* e a ocorrência de câncer gástrico distal.

Em vista da importância da presença da bactéria *H. pylori* e a detecção da presença do gene *cagA* no desenvolvimento de úlcera péptica, gastrite e câncer gástrico, na colonização da bactéria na mucosa gástrica e o aumento do processo inflamatório através da estimulação da secreção de Interleucina-8, o objetivo geral do projeto consiste na padronização e caracterização molecular do gene *cagA* em biópsias gástricas positivas para a presença de tal bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: foram utilizadas biópsias gástricas de pacientes adultos de ambos os sexos os quais submeterem-se a esofagogastroduodenoscopia por indicação médica, onde foram coletadas amostras para o teste de Uréase para o diagnóstico bioquímico da bactéria e uma biópsia do antro gástrico para realização da extração do DNA genômico e detecção do DNA da bactéria, utilizando de Iniciadores (*primers*) específicos para a amplificação dos genes do *H. pylori*.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene *cagA*: a reação em cadeia da polimerase consiste na amplificação de um segmento gênico o qual é delimitado com a utilização de “primers” (iniciadores) o qual irão delimitar o fragmento gênico a ser amplificado.

A técnica consiste em três etapas principais sendo:

Primeira etapa: as fitas do DNA são separadas por um aumento da temperatura através do termociclador (desnaturação do DNA).

Segunda etapa: os primers (sense e antisense) se associam em regiões complementares servindo de “molde” para amplificação gênica.

Terceira etapa: refere-se a etapa de extensão onde a enzima *Taq DNA Polimerase*, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* a qual fixa os nucleotídeos livres formando novas fitas de DNA.

Para a amplificação do gene da fração 16s do *rRNA* de *H. pylori* utilizado como diagnóstico molecular foram utilizados primers na sequência 5´- 3´.(Tabela 1). Os primers utilizados para amplificação do gene *cagA* na mesma sequência anterior encontram-se na tabela 2.

Tabela 1. Primers para amplificação do gene da fração 16s do rRNA de *H. pylori*

Oligo	Sequência (5'- 3')	Gene	Bibliografia
HPX	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	<i>rRNA</i> 16s	Scholte et al., 1997
HPX1	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA	<i>rRNA</i> 16s	Scholte et al., 1997
H3	TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC	<i>rRNA</i> 16s	Hammar et al., 1992
H4	CCTGCTGGGCATACTTCACCATG	<i>rRNA</i> 16s	Hammar et al., 1992
H5	GCCAATGGTAAATTAGTT	<i>rRNA</i> 16s	Clayton et al., 1992
H6	CTCCTTAATTGTTTTTAC	<i>rRNA</i> 16s	Clayton et al., 1992

*Y corresponde a C ou T e R corresponde a A ou G.

Tabela 2. Pimers para amplificação do gene *cagA*.

Oligo	Sequência (5'- 3')	Gene	Bibliografia
Cag1	ATGACTAACGAACTATTGATC	<i>Cag A</i>	Gatti et al., 2003
Cag2	CAGGATTTTTGATCGCTTTATT	<i>Cag A</i>	Gatti et al., 2003

Condições da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): as condições para a realização da Técnica da PCR para o diagnóstico molecular da infecção do *H. pylori* com a utilização de primers específicos encontram-se especificados na tabela 3.

Tabela 3. Condições da Reação em Cadeia da Polimerase.

Primer	Condição da PCR
H3/H4	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/60°C 1'/72°C 1' e 72°C 7'
H5/H6	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/45°C 1'/72°C 1' e 72°C 7'
HPX/HPX1	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/59°C 1'/72°C 1' e 72°C 7'
Cag1	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/94°C 1'/53°C e 72°C 1'
Cag2	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/94°C 1'/53°C e 72°C 1'

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amplificações foram padronizadas de acordo com as condições utilizadas nas tabelas 1, 2 e 3, utilizando em cada reação 3µl de DNA genômico (50ng), 2µl de cada primer (10mM), 0,2µl de *Taq DNA polimerase* (1 unidade), 5µl de PCR Buffer (10x), 2µl MgCl₂ (50mM) e 5µl de Dntps, completando o volume para 25µl com água destilada pura.

Em todas as reações foram incluídos controles positivos (amostras sabidamente positivas para presença de *H. pylori*) e controle negativo (água ultra pura estéril). Os resultados das amplificações encontram-se nas figuras 1 e 2.

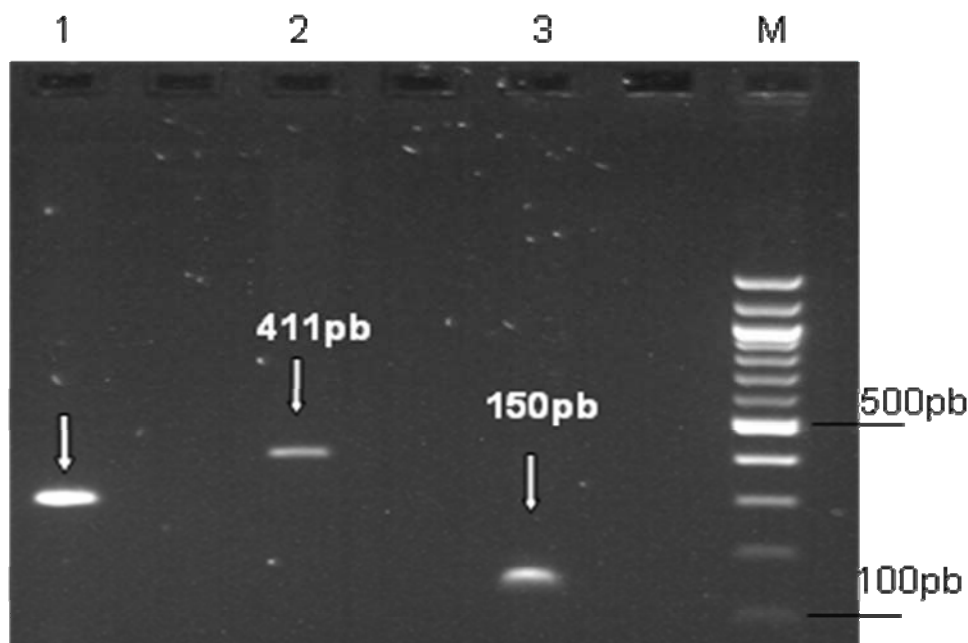


Figura 1. Gel de agarose a 2%, corado com SYB – Safe DNA Gel Stain, onde 1 refere-se a amplificação do primer H3/H4, 2 refere-se a amplificação do primer H5/H6, 3 refere-se a amplificação do primer HPX/HPX1 e M refere-se ao marcador de peso molecular (100pb).

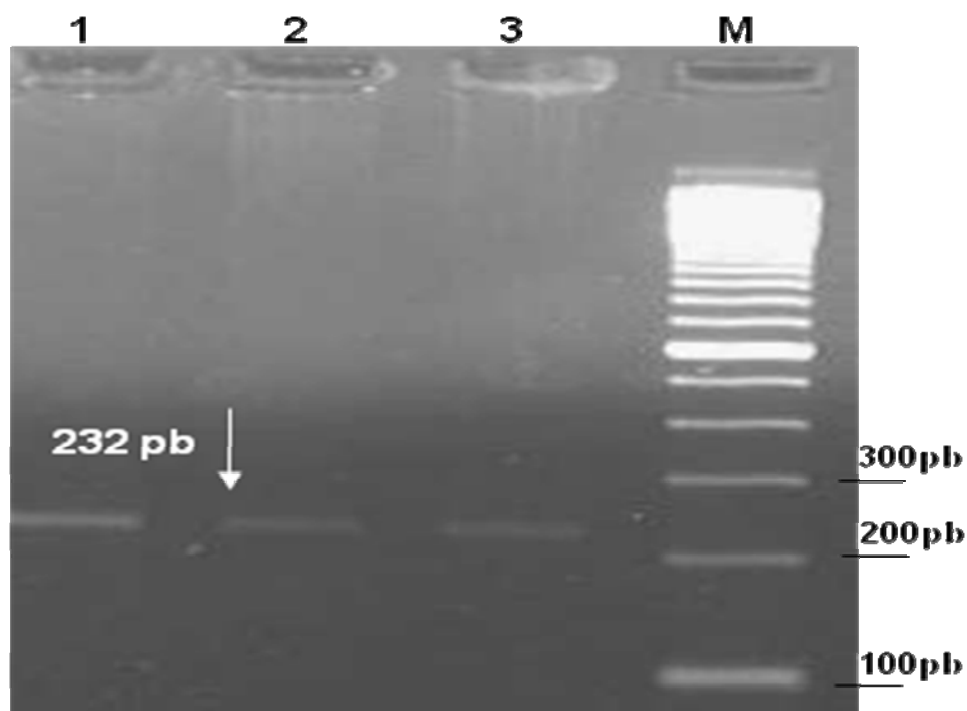


Figura 2. Gel de agarose a 2%, corado com SYB- Safe DNA Gel Stain, referente ao fragmento de 232pb do gene *cagA*, utilizando os *primers* *cagA* e *cagA2* padronizados para genotipagem do gene. 1-3 Amostras positivas; M marcador de peso Molecular.

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste em um método muito sensível para o diagnóstico de *H. pylori* e para alguns autores, a técnica é o mais sensível método para tal diagnóstico. Segundo estudo realizado por Junior FA e colaboradores em 2004, os mesmos constataram uma sensibilidade semelhante dos testes da uréase, histológico e PCR na detecção do *H.pylori* no estômago de crianças infectadas. Já estudos realizados por Dzierzanowska et al.(1996), utilizando os *primers* com as mesmas sequências do H3/H4 e H5/H6 constataram que o método de PCR identificou um maior número de casos de indivíduos infectados com *H. pylori* em relação à cultura de tecido. Segundo ainda estudos realizados por Junior FA et al., em 2004. Não existe diferenças entre a coleta de biópsia do antro e corpo do estômago para detecção molecular da bactéria, resultado este já obtido em estudos anteriores realizados por Carvalho et al. (1991).

CONCLUSÃO

O estudo proposto alcançou seus objetivos que foi a padronização e caracterização molecular do gene *CagA* em biópsias gástricas positivas para presença da bactéria *H. pylori* em mucosa gástrica de indivíduos infectados, fornecendo assim, uma técnica sensível para detecção da infecção por tal bactéria de uma maneira precisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOPYANTS, N.S. ; CLIFTON, S.W. ; KERSULYTE, D. ; CRABTREE, J.E. ; YOUNG, B.E. ; REECE, C.A. ; BUKANOV, N.O. ; DRAZEK, E.S. ; ROE, B.A. ; BERG, D.E. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. **Mol.Microbiol.** ; v.28, p. 37-53, 1998.
- ANDERSEN, L.P. ; KIILLERICK, S. ; PEDERSEN, G. ; THORESON, A. C. ; JORGENSEN, F. ; RATH, J. ; LARSEN, N-E. ; BORUP, O ; KROGFELT, K. ; SCHEIBEL, J ; RONE, S. An analysis of seven different methods to diagnose *Helicobacter pylori* infections. **Scand. J Gastroenterol.** ; v.33, p. 24-30, 1998.
- CARVALHO, A.S. ; QUEIROZ, D.M. ; MENDES, E.N. ; ROCHA, G.A. ; PENNA, F.J. Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of symptomatic children. **Braz. J. Med. Biol. Res.** ; v. 24, p. 163-166; 1991.
- CENSINI, S. ; LANGE, C. ; XIANG, Z. ; CRABTREE, J.E. ; GHIARA, P. ; BORODOVSKY, M. ; RAPPUOLI, R. ; COVACCI, A. *CagA* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease – associated virulence factors. **Proc. Natl. Acad.Sci.USA** ; v.93, p.14648-14653, 1996.
- CLAYTON, C. ; KLANTHOUS, K. ; TABAGCHALI, S. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Pathol.** ; v. 44, p. 515-516; 1992.
- CORREA, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Amer. J. surg. Pathol.**; v.19, n.1, p.37-43, 1995.
- COVACCI, A. ; CENSINI, S. ; BUGNOLI, M. ; PETRACCA, R. ; BURRONI, D. ; MACCHIA, G. ; MASSONE, A. ; PAPINI, E. ; XIANG, Z. ; FIGURA, N. ; RAPPUOLI, R.I. Molecular characterization of the 128-KDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc.Natl.Acad. Sci.USA** ; v.90, p. 5791-5795, 1993.
- DZIERZANOWSKA, D.; ROZYNEK, E. PCR for identification and typing of *Helicobacter pylori* isolated from children. **J Physiol. Pharmacol.** ; v. 47, p. 101-114; 1996.
- FILHO, G.B.; Bogliolo Patologia, 7ª edição- Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro -RJ; p. 1472, 2006.
- GATTI, L.L. ; JUNIOR, F.A. ; LABIO, R.W. ; PIASON, F.B. ; SILVA, L.C. ; QUEIROZ, V.F. ; BARBIERE, D.P. ; SMITH, M.A.C. ; PAYÃO, S.L.M. *Helicobacter pylori* and *cagA* and *vacA* gene status in children from Brazil with chronic gastritis.**Clin. Exp. Med.** ; v.3, p.166-172, 2003.

HAMMAR, M. ; TYSZKIEWICZ, T. ; WADSTROM, T. ; O'TOOLE, PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** ; v. 30, p 54-58, 1992.

JERRIS, R.C. *Helicobacter* In: Manual of Clinical Microbiology, Sixth Edition, AMS Press Washington, D.C., 1995.

JUNIOR, F.A. ; PAYÃO, S.L.M. ; QUEIROZ, V.F. ; ELLINGER, F. ; SILVA, L.C. ; THEREZO, A.L.S. ; GATTI, L.L. ; BARBIERE, D. ; PIRES, C.A. Detecção gástrica de *Helicobacter pylori* em pacientes pediátricos sintomáticos através da reação em cadeia da polimerase (PCR), teste de uréase e exame histológico. **Pediatria (São Paulo)**; v. 26, p. 34-42; 2004.

KEATES, S. ; KEATES, A.C. ; WARNY, M. ; PEEK, R.M. JR. ; MURRAY, P.G. ; KELLY, C.P. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- *Helicobacter pylori*. **J. Immunol.** ; v.163, p.5552-9, 1999.

KODAIRA, M.S. ; ESCOBAR, A.M.U. ; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Saúde Pública** ; v.36, n.3, p. 356-69, 2002.

QUEIROZ, D.M.M. ; MENDES, E.N. ; ROCHA, G.A. ; OLIVEIRA, A.N. ; OLIVEIRA, C.A. ; MAGALHÃES, P.P. ; MOURA, S.B. ; CABRAL, M.M.D.A. ; NOGUEIRA, A. M.M.F. CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int. J. Cancer** ; v. 78, p.135-139, 1998.

ROTHENBACHER, D. ; BODE, G. ; BERG, G. ; GOMMEL, R. ; GONSER, T. ; ADLER, G. ; BRENNER, H. Prevalence and determinants of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: a population-based study from Germany. **Int. J. Epidemiol.** ; v.27, p.135-41, 1998.

SCHOLTE, G.H. ; VAN DOORN, L.J. ; QUINT, W.G. ; LINDEMAN, J. Polymerase Chain Reaction for detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsias. **Diag. Mol. Pathol.** ; v.6, p. 238-243, 1997.