

PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DO GENE *vacA* (ALELO M) DE *Helicobacter pylori* EM BIÓPSIAS GÁSTRICAS

STANDARDIZATION OF GENOTYPING OF *vacA* (ALLELE M) OF *Helicobacter pylori* IN GASTRIC BIOPSIES

¹BALDECERRA, V. F.; ²GATTI, L.L.

^{1e2}Departamento de Ciências Biológicas –Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

Desde sua descoberta, na década de 80, a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) foi descrita como uma bactéria Gram negativa e de forma espiralada, associada à etiopatogenia de diversas doenças do aparelho digestivo. O *vacA* é o gene que codifica a produção da citotoxina vacuolizante, considerada importante fator na etiopatogênese da úlcera péptica e está presente em todas amostras de *H. pylori*. Estudos comprovaram a existência de duas famílias de seqüências sinalizadoras (s1 e s2) e duas medias (m1 e m2) do *vacA*. O alelo s1 se relaciona com a produção de citotoxina, e o alelo m1, a produção de maior quantidade de proteína. Os genótipos s1-m1 e s1-m2 são mais freqüentemente associados com úlcera péptica e carcinoma gástrico. Visto a importância dos polimorfismos da região m do gene *vacA* para o nível de toxicidade da bactéria, a padronização do alelo foi realizada para genotipagem através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com as seguintes condições de 94°C 5',40 ciclos 94°C 1'/51°C 1'/72°C 1' e 72°C 7', sendo possível identificar alterações nos alelos.

Palavras - chave: Gastrite crônica, *Helicobacter pylori*, gene *vacA*.

ABSTRACT

Since its Discovery in the 80's the *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has been described as a Gram negative bacterium in a spiral shape associated with pathogenesis of several diseases of the digestive tract. The *vacA* is a gene that encodes the production of cytotoxin vacuolizing, an important factor in the etiopathogenesis of peptic ulcer disease and is present in all samples of *H.pylori*. Studies proved the existence of two families of sinal sequence (s1 and s2) and two measures (m1 and m2) of *vacA*. The s1 allele is related to the production of higher amounts of proteins. The genotypes s1-m1 and s1-m2 are most often associated with peptic ulcer and gastric carcinoma. Seen the importance of polymorphism in the region m of the gene *vacA* to level of toxicity of the bacteria the standardized of the allele was performed for genotyping by PCR (Polymerase Chain Reaction) with the following conditions of 94°C 5',40 ciclos 94°C 1'/51°C 1'/72°C 1' e 72°C 7' is possible to identify changes in the alleles.

Keywords: Chronic gastritis, *Helicobacter pylori*, *vacA* gene.

INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta, na década de 80, a bactéria *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) foi descrita morfológicamente como Gram negativa e de forma espiralada, associada à etiopatogenia de diversas doenças do aparelho

digestório. (MARSHALL; WARREN, 1984). Sabe – se que a forma helicoidal favorece a movimentação impulsionada por flagelos permitindo o cruzamento da camada de muco que recobre o estômago. (MONTECUCCO; RAPPUOLI, 2001).

Vários estudos indicam que pacientes infectados pelo *H. pylori* apresentam dano progressivo à mucosa gástrica, sendo que os sintomas clínicos são na maioria das vezes diagnosticados na fase adulta do indivíduo, porém a aquisição do *H. pylori* ocorre geralmente na infância. (BONAMICO et al., 1997; ERNEST; GOLD, 1999).

A infecção pelo *H. pylori* é considerada a principal causa de gastrite crônica ativa. (ASHOM, 1995; KAWAGUCHI et al., 1996). Adicionalmente, estudos sugerem que essa bactéria desempenha um importante papel na gênese da úlcera péptica (RAUWS; TYTGAT, 1990). Estudos feitos por Eslick et al. (1999), mostra que em metanálise envolvendo 42 estudos, determinaram que a infecção pelo *H. pylori* está associada a um risco duas vezes maior para o desenvolvimento de um adenocarcinoma gástrico. A distribuição da bactéria é universal, estima – se que cerca de 60% da população mundial estejam acometidos a esse microorganismo. (CAVE, 1996, 1997).

Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de definir os modos de transmissão do *H. pylori*, algumas mais aceitas atualmente, incluem as vias de transmissão fecal-oral e oral-oral. (MARSCHALL, 2000).

Alguns fatores de patogenicidade da bactéria podem ser atribuídos à produção de proteases e lipases que interferem na estrutura, integridade, síntese e secreção do muco gástrico e lesam a membrana lipoprotéica das células epiteliais do revestimento. A urease produzida pelo *H. pylori* tem a capacidade de converter a uréia endógena em amônia e gás carbônico, ocorrendo assim a neutralização do pH e criando uma camada protetora em torno da superfície da bactéria. (MARSHALL; LANGTON, 1986).

Com o conhecimento das modalidades genéticas do *H. pylori*, foi possível definir o grau de virulência das cepas, já que algumas induzem a processos inflamatórios mais intensos e estão associadas a patologias mais graves. (BEALES; CALAM, 1998; BLASER, 1997).

Relacionadas com a variabilidade genética, as cepas de *H. pylori* foram divididas de duas formas: **Tipo I** e **Tipo II**. (XIANG et al., 1995).

Tipo I corresponde os *H. pylori* que expressam os genes *vacA* (citotoxina vacuolizante) e *cagA* (citotoxina vacuolizante associada).

Tipo II corresponde os *H. pylori* que não expressam em seu genoma o gene *cagA* e não exporta a proteína *vacA*.

O *vacA* é o gene que codifica a produção da citotoxina vacuolizante, considerada importante fator na etiopatogênese da úlcera péptica e está presente em todas amostras de *H. pylori*, apesar que metade delas produz vacuolização celular *in vitro*. (ATHERTON et al., 1995; COVER et al., 1992; TEE et al., 1995).

Estudos de Atherton et al, (1995), comprovou a existência de duas famílias de seqüências sinalizadoras (s1 e s2) e duas medianas (m1 e m2) do *vacA*. O alelo s1 se relaciona com a produção de citotoxina e o alelo m1 a produção de maior quantidade de proteína. Portanto as cepas portadoras do genótipo s1/m1 produzem grande quantidade de toxina, enquanto as cepas s1/m2 produzem quantidade moderada, e as cepas s2/m2, pouca ou nenhuma toxina. Os genótipos s1-m1 e s1-m2 são mais frequentemente associados com úlcera péptica e carcinoma gástrico. (KIDD et al., 1999; MIEHLKE et al., 2000).

O gene *vacA* tem ainda como característica o polimorfismo das regiões s e m entre as cepas de *H. pylori*, sendo s1 subdividido em s1a, s1b, s1c ou s2 (DOORN et al., 1999) e m1 que subdivide em m1a, m1*, m1-m2*, m2a e m2b (CHEN-WEN at al., 2000).

Este trabalho teve como objetivo padronizar a genotipagem do alelo m do gene *vacA* da bactéria *Helicobacter pylori* com a técnica de PCR oferecendo condições ideais para diagnóstico molecular. Assim será possível identificar alterações alélicas no gene em questão, contribuindo para futuras prevenções de doenças gástricas.

MATERIAL E MÉTODOS

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação de um seguimento gênico o qual é delimitado com a utilização de “primers” (iniciadores) que 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 à 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.

As condições padronizadas para a detecção Molecular do *H. pylori* foram descritas na tabela 01 abaixo:

Tabela 01: Condições para detecção molecular de *H. pylori*

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'

Para amplificação do alelo m do gene *vacA* foram utilizados os seguintes primers da tabela 02 abaixo:

Tabela 02: Primers utilizados para detecção da região m do gene *vacA*

Primer	Sequência (5' - 3')	Gene	Bibliografia
Ma	CACAGCCACTTTYAATAACGA	<i>Sequência Mediana</i>	Doorn et al., 1998
Mb	CGTCAAATAATTCCAAGGG	<i>Sequência Mediana</i>	Doorn et al., 1998

*Y corresponde a C ou T.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção dos genes para diagnóstico molecular do fragmento de DNA do *H. pylori* foi realizado de acordo com condições padronizadas por Luscenti; Gatti. (2008), no Laboratório de Biologia Molecular das FIO-Faculdades Integradas de Ourinhos, e a partir das amostras positivas para infecção pela

bactéria, as amostras foram utilizadas para padronização da genotipagem do alelo m do gene *vacA*.

Todas as amplificações para genotipagem do alelo m do gene *vacA* foram padronizadas de acordo com as seguintes condições : 2µl de DNA genômico (50ng), 2µl de cada primer (10mM), 0,2µl de *Taq DNA polimerase* (1u), 5µl de PCR Buffer (10X), 2µl de MgCl₂(50mM) e 5µl de Dntps, completando o volume para 50µl de reação com água destilada pura.

As temperaturas e tempos para cada ciclo da amplificação da PCR em Termociclador foram: 94°C durante 5 minutos (1 ciclo), 94°C durante 1 minuto para desnaturação da fita de DNA, 51° C por 1 minuto para associação do primers utilizado (ma-mb), 72°C por 1 minuto para ligação e extensão da enzima *Taq DNA polimerase* para que seja realizada a amplificação das bases complementares (40 ciclos) e para finalizar a reação da PCR foi utilizado a temperatura de 72°C por 7 minutos (Figura 1).

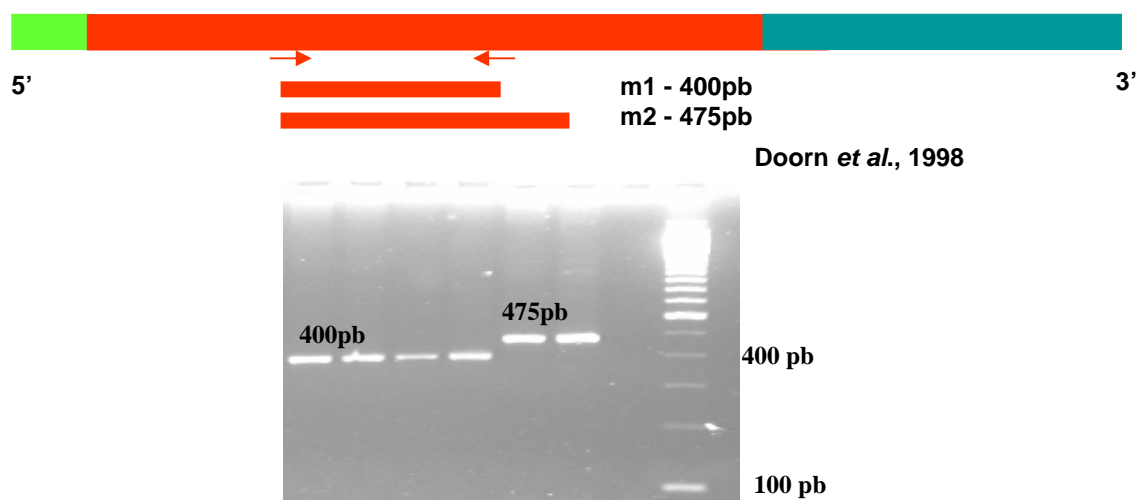


Figura 1 - Gel de agarose a 2%, corado com SYB-Safe DNA gel Stain, onde 400pb, refere-se à amplificação do alelo m1 do gene *vacA* e 475 pb refere-se a amplificação do alelo m2 do gene *vacA* .

Utilizando a Técnica de PCR foi observada uma grande sensibilidade no diagnóstico e genotipagem de genes o que se torna uma ferramenta extremamente útil na prática clínica e em pesquisas de interesse molecular. Desta forma, padronizado a genotipagem da detecção do alelo m de *H. pylori*, torna possível verificarmos diferentes cepas infectantes que possam trazer ao hospedeiro, níveis diferentes de virulência uma vez que as cepas que possuem

o alelo m1 transportam a proteína Vac com maior eficiência para a célula gástrica possibilitando um maior risco para ulceração da mesma.

CONCLUSÃO

O trabalho consistiu em padronizar a genotipagem do alelo m do gene *vacA* em amostras positivas para *Helicobacter pylori*. Nas análises que foram realizadas, obtivemos as seguintes condições para amplificação do gene: 94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/51°C 1'/72°C 1' e 72°C 7'. Esses resultados são de grande interesse para identificar polimorfismos na região de expressão da proteína Vac, assim facilitando o diagnóstico de doenças gástricas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHORN, M. What are the specific features of *Helicobacter pylori* gastritis in Children? **Annals of Medicine**, v. 27, p. 617-20, 1995.
- ATHERTON, J.C. ; CAO, P. ; PEEK, R.M. jr. ; TUMMURU, M.K. ; 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 17771-7, 1995.
- BEALES, L.L. ; CALAM J. Pathogenic mechanisms in *Helicobacter pylori* infection. **Hospital Medicine**, v. 59, p. 186-190, 1998.
- BLASER, M.J. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? **The Lancet**, v. 349, p. 1020-1022, 1997
- BONAMICO, M. ; MARIANI, P. ; MAGLIOCCA, F.M. ; PETROZZA, V. ; MONTUORI, M. ; PEZZELA, C. ; LUZZI, I. ; CARPINO, F. *Helicobacter pylori* duodenal colonization in children. **Acta Pediatrica**; v. 86, p. 356-360, 1997.
- CAVE, D.R. How is *Helicobacter pylori* transmitted? **The American Journal Gastroenterology**, v. 133, n. 6, p. 9-14, 1997.
- CAVE, D.R. Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*. **American Journal of Medicine**, v. 100, p. 12-8, 1996.
- CHENG – WEN, L. ; SUH – CHIN, W. ; SHIANG – CHI, L. ; KEN – SHENG, C. Genetic analysis and clinical evaluation of vacuolating cytotoxin gene A and cytotoxin-associated gene A in Taiwanese *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer patients. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, v, 32, p. 51-57, 2000.
- COVER, T.L. ; HALTER, S. ; BLASER, M.J. Characterization of HeLe cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. **Human Pathology**, v. 23, p. 1004-10, 1992.
- DOORN, L.J. ; FIGUEIREDO, C. ; SANNA, R. ; BLASER, M.I. ; QUINT, W.G. Distinct variants of *Helicobacter pylori cagA* are associated with *vacA* subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2306-2311, 1999.
- ERNEST, P.B. ; GOLD, B.D. *Helicobacter pylori* in childhood: new insights for managing infection in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 28, p. 462-473, 1999.

- ESLICK, D. ; LIM, L.L.Y. ; BYLES, J.E. ; XIA, H.H.X. ; TALLEY, N.J. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta – analysis. **The American Journal Gastroenterology**, v. 94, p. 2373-4, 1999.
- KAWAGUCHI, H. ; HARUMA, K. ; KOMOTO, K. ; YOSHIHARA, M. ; SUMII, K. ; KAJIYAMA, G. *Helicobacter pylori* infection is the major risk factor for atrophic gastritis. **The American Journal Gastroenterology**, v. 51, p. 959-62, 1996.
- KIDD, M. ; STOVICA, A.J. ; ATHERTON, J.C. ; LOUW, J.A. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? **An International journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 45, p. 499-502, 1999.
- LUSCENTI, R.S. ; GATTI, L.L. Molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the gastric mucosal. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 21-26, 2008.
- MARSCHALL, B.J. *Helicobacter pylori* in the year 2000. **Helicobacter pylori Foundation**, v. 50, p. 1-9, 2000.
- MARSHALL, B.J. ; LANGTON, S.R. Urea hydrolysis in patients with *Campylobacter pyloridis* infection. **Lancet**, v. 1, p. 965-966, 1986.
- MARSHALL B.J.; WERREN J.R. Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, v. 1, n. 8390, p. 1311-5, 1984.
- MIEHLKE, S. ; KIRSCH, C. ; AGHA – AMIRI, K. ; GUNTHER, T. ; LEHN, N. ; MALFERTHEINER, P. ; STOLTE, M. ; EHNINGER, G. ; BAYERDORFFER, E. The *Helicobacter pylori vacA s1,m1* genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. **International Journal of Cancer**, v. 87, p. 322-327, 2000.
- MONTECUCCO, C. ; RAPPUOLI, R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. **Nature Reviews**, v. 2, p. 457-66, 2001.
- RAUWS, E.A.J. ; TYTGAT, G.N.J. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. **The Lancet**, v. 335, p. 1233-5, 1990.
- TEE, W. ; LAMBERT, J.R. ; DWYER, B. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1203-5, 1995.
- XIANG, Z. ; CENSINI, S. ; BAYELI, P.F. ; TELFOR, J.L. ; FIGURAN, RAPPUOLI, R. ; COVACCI, A. Analysis of expression of *CagA* and *VacA* virulence factor in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *CagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 94-98, 1995.