
Artigo Original / Original Article

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGENICO DOS GENES *sabA* E *hopZ* DE ESTIRPES DE *HELICOBACTER PYLORI* ISOLADAS NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA

A. CARVALHO¹, M. OLEASTRO¹, B. NUNES², L. MONTEIRO³

Resumo

Estudo do potencial dos genes *sabA* e *hopZ* como marcadores de virulência para a doença ulcerosa péptica (DUP) em estirpes de *H. pylori* de doentes portugueses, 106 isoladas de adultos (50 com DUP, 56 com dispepsia não ulcerosa - DNU) e 74 isoladas de crianças (21 com DUP, 53 com DNU), por PCR e sequenciação.

O genótipo *sabA on* relacionou-se significativamente com a DNU em estirpes isoladas de crianças, enquanto que o genótipo *hopZ on* foi o mais prevalente em estirpes isoladas de doentes com DUP. Também se verificou a associação significativa entre o genótipo *sabA on* e os genótipos *cagA*-, *vacAs2* e *oipA off*, nas estirpes isoladas de crianças, não tendo havido qualquer associação entre a funcionalidade de *sabA* e *hopZ* com outros genes, na população adulta. A análise de combinações de genótipos mostrou que, nas estirpes de crianças, o risco para a DUP aumentou quando se associou o genótipo *sabA off* aos genótipos *cagA*+, *vacAs1* e *cagA*+/*vacAs1*.

Concluiu-se que os genes *sabA* e *HopZ* não constituem marcadores de virulência para DUP numa população Portuguesa. No entanto, *sabA off* pode contribuir para a distinção entre a DUP e a DNU, quando associado a outros marcadores de virulência.

Summary

To study the potential of *sabA* and *hopZ* genes as virulence markers for peptic ulcer disease (PUD) in *H. pylori* strains isolated from Portuguese patients, 106 isolated from adults (50 with PUD, 56 with non-ulcer dyspepsia) and 74 from children (21 with PUD, 53 with non-ulcer dyspepsia). Genotyping was performed by PCR and sequencing of the 5' region of the genes was done.

We observed that *sabA on* was significantly more often associated with gastritis only in strains isolated from children. *hopZ on* was more prevalent in strains from PUD, although this difference was not significant. We also found that *sabA on* was significantly associated with *cagA*, *vacAs2* and *oipA off* genotypes in the strains isolated from children and that there was no association between any functional status of *sabA* and *hopZ* with other genes in the adult population. Finally, we compared some genotype combinations. In strains isolated from children, the risk for PUD increased when *sabA off* was associated with: *cagA*+, *vacAs1* and *cagA*+/*vacAs1*.

We concluded that neither *sabA* nor *hopZ* are pathogenicity markers for PUD in this Portuguese population. However, the *sabA off* genotype can contribute to the distinction between PUD and gastritis when associated with other virulence genes.

GE - J Port Gastroenterol 2006, 13: 258-266

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria Gram negativa que coloniza o estômago humano, através da aderência às células epiteliais gástricas (1,2). Neste mecanismo, intervêm moléculas receptoras, que se encontram nas células do hospedeiro, e adesinas presentes na superfície das bactérias. Existem proteínas que foram já identificadas como estando implicadas na aderência às células epiteliais gástricas, nomeadamente, BabA, SabA, SabB e HopZ, sendo todas proteínas da membrana exte-

na. A expressão dos genes respectivos *sabA*, *sabB* e *hopZ* é regulada por uma zona de repetição de dinucleótidos CT na região 5' do gene que codifica para o péptido sinal. O número de repetições CT vai influenciar as grelhas de leitura inserindo ou removendo um codão *stop*, o que se traduz em dois estados de funcionalidade do gene, *on* ou *off* e consequentemente na formação ou não de uma proteína madura. Este mecanismo de regulação genética é denominado de “*slipped strand mechanism mispai-*

¹ Unidade de Helicobacter/Campylobacter/ Centro de Bacteriologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

² Observatório Nacional de Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

Recebido para publicação: 11/11/2005

Aceite para publicação: 23/06/2006

rig” (3,4). A adesina SabA (*sialic acid-binding adhesin*), que consiste numa proteína de 651 aminoácidos, e que pertence à família das proteínas de membrana externa de *H. pylori*, liga-se às glicoproteínas *sialil-Lewis^x* e *sialil-Lewis^y*, que constituem receptores das células da mucosa do hospedeiro (5). Outro gene pertencente a esta família é o gene *hopZ*, que se pensa estar igualmente implicado na adesão da bactéria à mucosa gástrica. Estudos de imunofluorescência permitiram localizar a proteína *hopZ* na superfície da bactéria, e ensaios de adesão mostraram uma perda considerável na capacidade da bactéria em aderir às células da mucosa gástrica quando se compararam estirpes com o gene intacto e estirpes mutadas. No entanto, o facto de a bactéria poder abandonar a expressão do gene *hopZ*, através do mecanismo de “slipped strand mispairing mechanism”, revela que a proteína não é essencial à sobrevivência da bactéria (6).

Para além das adesinas, *H. pylori* possui outros factores de virulência nomeadamente factores com acção tóxica nas células da mucosa. A citotoxina vacuolizante VacA, codificada pelo gene *vacA*, é uma proteína excretada por *H. pylori* e que se pensa estar associada à lesão do epitélio, o que resulta da sua acção tóxica em vários organitos (7,8,9).

Outro factor de toxicidade de *H. pylori* não ubi-quitário consiste no conjunto de 31 genes inseridos no gene glutamato racemase denominado ilhéu de patogenicidade *cag* (*cag* PAI). Esta região codifica para proteínas responsáveis pelo aumento do estado inflamatório da mucosa gástrica já que favorecem a infiltração de leucócitos polimorfonucleados e aumentam o nível de produção de interleucina 8 (9, 10). Um dos genes constituintes deste grupo é o *cagA*, que se situa no final do ilhéu de patogenicidade *cag* PAI e que codifica para a proteína CagA (*cytotoxin-associated gene*). Esta é translocada para o interior das células epiteliais gástricas provocando alterações no citoesqueleto e na morfologia destas (11).

Este trabalho foi realizado no âmbito da pesquisa de novos marcadores de virulência de *H. pylori*, na sequência de vários estudos que apontam para uma correlação entre determinados genes de *H. pylori* e a frequência de patologias gástricas severas. Para tal, procedeu-se à caracterização genotípica de dois genes implicados na adesão de *H. pylori* à mucosa gástrica, *sabA* e *hopZ*, e ao estudo da sua preva-

lência, numa amostra de estirpes de *H. pylori* isoladas de doentes apresentando úlcera péptica (PUD) e dispepsia não ulcerosa (DNU). O seu estudo reveste-se de grande importância na medida em que, como estes genes codificam para adesinas bacterianas, poderão contribuir para a virulência da estirpe infectante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estirpes Bacterianas

Foram estudadas estirpes de *H. pylori*, isoladas de biopsias do antro gástrico, que integram a colecção de estirpes do Centro de Bacteriologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de Lisboa. No total, utilizaram-se 180 estirpes bacterianas, das quais 106 isoladas de doentes adultos com DUP (n=50, 13 com úlcera gástrica e 37 com úlcera duodenal, idade média 49.5 ± 16.2 , 52% do sexo masculino) ou DNU (n=56, idade média 51.3 ± 14.6 % do sexo masculino) e 74 isoladas de crianças com DUP (n=21, 3 com úlcera gástrica e 18 com úlcera duodenal, idade média 11.72 ± 3.76 , 64% do sexo masculino) ou DNU (n=53, idade média 9.11 ± 3.26 , 56.6% do sexo masculino). Foram ainda utilizadas 2 estirpes de referência de *H. pylori*, a estirpe 26695 (ATCC 700392) e a estirpe J99 (ATCC 700824) para as quais o genoma se encontra sequenciado (12,13).

Isolamento de DNA

O DNA a partir do qual se trabalhou foi previamente isolado e extraído, tendo-se utilizado, para esse efeito, o Qiamp DNA mini kit 250 (Qiagen SA, Courtaboeuf, France). As estirpes incluídas neste estudo encontravam-se previamente caracterizadas no que respeita aos genótipos *cagA*, *vacA*, *iceA*, *babA2*, *oipA* e *hopQ* (14).

Análise de sequências dos Genes *sabA* e *hopZ*

Para cada gene, a região 5' codificante do péptido sinal foi amplificada por PCR. Para o gene *sabA*, utilizaram-se os iniciadores F1-663-HP726 e R1-663-HP725. Em 7.7% das estirpes não foi obtido produto de amplificação, pelo que foi desenhado

Quadro 1 - Iniciadores utilizados nas reacções de amplificação realizadas.

Gene	Iniciador	Sequência (5'-3') (Tamanho em pb)	Tamanho do Fragmento pb	Referência
<i>sabA</i>	F1- 663-HP726 R1- 663-P725	TTT TTG TCA GCT ACG CGT TC (20) ACC GAA GTG ATA ACG GCT TG (20)	585	Lehours et al, 2004 (15)
<i>sabA</i>	F2- 663-HP726 R1- 663-HP725	GCA ATG TGT GGC AGC AAC AAA C (21) ACC GAA GTG ATA ACG GCT TG (20)	692	-
<i>sabB</i>	HopZF1 HopZR2	GCC TGA TAT GGG TGG CAT GGG (21) GCG TGT TTG CTT TTA AAT TAT CG (23)	666	Peck et al, 1999 (6)

outro iniciador, F2-663-HP726. Para o gene *hopZ* utilizaram-se os iniciadores HopZF1 e HopZR2 (Quadro 1). A reacção de PCR consistiu em 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 56° C e 30 segundos a 72° C. Procedeu-se a um ciclo inicial de 30 segundos a 94°C e finalizou-se com um ciclo de 7 minutos a 72° C, num termociclador (Gene Amp, PCR System 9700 Applied BioSystems). Para comprovar que houve amplificação dos fragmentos pretendidos, recorreu-se a uma electroforese em gel de agarose a 1,5% e coloração com brometo de etídio. Esses produtos de amplificação, previamente purificados com o kit Jetquick (Genomed, Löhne, Alemanha), foram sujeitos a sequenciação enzimática, utilizando-se os iniciadores R1-663-P725 e HopZR2 para os genes *sabA* e *hopZ*, respectivamente. Para tal, efectuou-se o método de Sanger, cujo programa de sequenciação consistiu num ciclo inicial de 30 segundos a 96° C seguido de 25 ciclos, de 10 segundos a 96° C, 5 segundos a 50° C e 4 minutos a 60° C. Para a sequenciação utilizou-se o reagente Big Dye Terminator (Applied Biosystems Chemistry, Foster City, E.U.A.) e utilizou-se o sequenciador automático 3100 (Genetic Analyser, Abi-Prism).

Análise Estatística

A associação entre génotipos e as patologias gástricas foi avaliada por intermédio do teste exacto de Fisher. Em todos os testes o nível de significância estabelecido foi 5%, rejeitando assim a hipótese de não associação (hipótese nula) sempre que o valor *p* foi menor que 0.05. De modo a definir grupos de génotipos, incluindo os genes *sabA* e *hopZ*, e outros já caracterizados para a amostra de estirpes estudada, recorreu-se à análise de clusters utilizando a distância Euclideana Quadrática para definir as distâncias (grau de associação) entre os genes

estudados e o método *Average Linked* (Média dos Grupos) para estabelecer os grupos. Por fim, utilizou-se um dendrograma para representar graficamente os grupos de genes encontrados. Toda a análise estatística foi realizada recorrendo ao pacote de programas estatísticos SPSS 13.0.

RESULTADOS

Mecanismos de Regulação da Expressão dos Genes *sabA* e *hopZ*

A funcionalidade dos genes *sabA* e *hopZ* foi obtida pela análise da sequência 5' da região que codifica para o péptido sinal, utilizando-se as técnicas de PCR e sequenciação enzimática. Foi então determinado o número de repetições de dinucleótidos CT, que permitiu distinguir dois estados de funcionalidade, *on* ou *off*. Relativamente ao gene *sabA*, obtiveram-se 12 perfis diferentes, e para o gene *hopZ*, 10 perfis. Ao analisar estes perfis, verificou-se que a expressão dos genes *sabA* e *hopZ* é regulada pelo mecanismo de “*slipped strand mechanism mispairing*”. Este mecanismo consiste na alteração do *status* do gene tendo em conta o número de repetições CT, na medida em que este influencia as grelhas de leitura inserindo ou removendo um codão *stop*. Verificou-se também a existência dos dois estados funcionais dentro do mesmo perfil de repetições, sugerindo um outro mecanismo de regulação. Assim, para 6 perfis do gene *sabA* e 5 perfis do gene *hopZ*, observou-se que a diferença no *status* correspondia a inserções e/ou deleções de grupos de nucleótidos (entre 3 e 9 bases para o gene *sabA* e entre 4 e 5 bases para o gene *hopZ*) adjacentes à zona das repetições CT (Quadro 2).

Quadro 2 - Região codificante da sequência sinal dos genes *sabA* e *hopZ* e respectivos perfis e *status* dos genes, de algumas estirpes de *H. pylori* estudadas.

Estirpe	Sequência de bases do DNA- <i>sabA</i>	Nº de repetições CT	Status do gene
670/99	ATGAAAAACGATTTTA CT TT CTCT ATCCCTTGACGCGTCATTACTTTATGCTGAAGACAACGGCTTT	3 (1+2)	ON
24/00	ATGAAAAACGATTTTA CTCTCTCTCT CGCTTGCGGTATCATCGCTCCAGC TGA AGACAACGGCTTTT	4	OFF
E18A	ATGAAAAACGATTTTA CTCTCTCTCT CGCTT----CATCGCTTTTGCGTG	5	ON
553/02	ATGAAAAA-CGATTTTTA CTCTCTCTCT CGCTT----CATCGCTTTTGACAG (...) CAATAG C	5	OFF
713/99	ATGAAAAACGATTTTAA-- CTCTCTCTCTCT CGCTT-----CATCGCTCTTGCGCG TGA AGACAACGGCT	6	OFF
500/02	ATGAAAAACGATTTTAA-- CTCTCTCTCTCT CGTTTGCGGTATCATCGCTC---CACG TGA AGACAACGGCT	6	OFF
574/02	ATGAAAAAGACAATT CT TT CTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTCTTAAACGCTGAAGACAACGGCTTTTTT	6 (1+5)	ON
296/01	ATGAAAAACGATTTTAA CTCTCTCTCTCTCT CGCTT-----CATCGCTCTTAAACGCTGAAGACA	7	ON
124/99	ATGAAAAACGATTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTGCGGTATCATCGCTC---CACG TGA AGACAACGGCT	7	OFF
207/97	ATGAAAAACGATTTTAA CT TT CTCTCTCTCTCT CGCTTGCGGTATCATCGCTCCAGCTGAAGACAAC	7 (1+6)	ON
M7A	ATGAAAAACGATTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCT CGTTTGCGGTATCATCGCTC---CACGCTGAAGACAACGGCT	8	ON
289/99	ATGAAAAACGATTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTT-----CATCGCTCTTAAACG TGA AGACAACGGCT	8	OFF
801/99	ATGAAAAAGACAATTTTA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTT-----CATCGCTCTTAAACG TGA AG	9	OFF
767/99	ATGAAAAAGACAATTCTA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT C-----GCTTCATCGCTCTTGCGCGCTGAAGACAACGGCT	10	ON
194/99	ATGAAAAACGATTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT C-----GGTAGCATCGCTC---CACG TGA AGACAACGGCT	10	OFF
648/02	ATGAAAAACGATTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGTTTGCGGTATCATCGCTCCAGCTGAAGACAACGGCT	11	ON
586/99	ATGAAAAAGACAATTCTA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTCTTGACG TGA AGACAACGGCT	12	OFF

Estirpe	Sequência de bases do DNA- <i>hopZ</i>	Nº de repetições CT	Status do gene
86/98	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCT CGCTTACATCGCTTTTAAACG TGA AGACAACGGCT	4	OFF
292/99	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCT ATCTCGCTTTCATCGCTTTTAAACGCTGAAGACAACGGCT	5	ON
767/99	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTTTGAACG TGA AGACAACGGCT	6	OFF
499/02	ATGAAAAAACCTTATTA CTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTCTAAACGCTGAAGACAACGGCT	7	ON
379/01	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTT TAA ACGCTGAAGACAACGGCT	8	OFF
887/03	ATGAAAAAACCTTATTTA CTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTTTAAACGCTGAAGACAACGGCT	8	ON
107/98	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCT ----TCATCGCTTTTAAACGCTGAAGACAACGGCT	9	ON
364/01	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTTTAAACG TGA AGACAACGGCT	9	OFF
771/99	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTTTAAACGCTGAAGACAACGGCT	10	ON
601/99	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGTTT--TTGCTT---CACGCTGAAGACAACGGCT	11	ON
822/99	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTT TAA ACGCTGAAGACAACGGCT	11	OFF
430/02	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTTTAAACG TGA AGACAACGGCT	12	OFF
600/99	ATGAAAAAACCTTTTAA CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT CGCTTCATCGCTTTTAAACGCTGAAGACAACGGCT	13	ON

Quadro 3 - Frequência dos genótipos *sabA* e *hopZ* em estirpes de *H. pylori* isoladas de adultos e crianças com gastrite e úlcera.

Genótipo	Nº de estirpes (%)		Valor de p	O. R. (IC 95%)
	Gastrites Adultos (n = 56)	Úlceras Adultos (n = 50)		
<i>sabA on</i>	39 (69.6)	28 (56.0)	0.163	0.555 [0.250-1.232]
<i>sabA off</i>	17 (30.4)	22 (44.0)		
<i>hopZ on</i>	27 (49.1)	30 (60.0)		
<i>hopZ off</i>	28 (50.9)	20 (40.0)		
	Gastrites crianças (n=53)	Úlceras crianças (n= 21)		
<i>sabA on</i>	30 (56.6)	5 (25.0)	0.019	0.256 [0.081-0.806]
<i>sabA off</i>	23 (43.4)	15 (75.0)		
<i>hopZ on</i>	34 (64.2)	14 (66.7)		
<i>hopZ off</i>	19 (35.8)	7 (33.3)		

OR- odds ratio; IC- intervalo de confiança

Prevalência dos Genótipos *sabA* e *hopZ* na População em Estudo

A análise da distribuição dos dois genótipos, *on* e *off*, para cada gene mostrou que o gene *sabA* se encontra funcional (estado *on*) em 63.2% das estirpes isoladas de adultos e em 48.6% das estirpes isoladas de crianças. Relativamente ao gene *hopZ*, o genótipo mais prevalente foi o *hopZ on*, em ambas as populações (53.8 % de estirpes isoladas de adultos e 66.7 % de estirpes isoladas de crianças).

Distribuição dos Genótipos *sabA* e *hopZ* por Tipo de Patologia Gástrica (DNU e Úlcera Péptica)

Tendo em conta apenas a população adulta, verificou-se que o genótipo *sabA on* foi o mais prevalente em ambas as patologias, pois representa 69.7% das estirpes isoladas de indivíduos com DNU e 56.0% das estirpes isoladas de doentes com DUP (p=0.163). Relativamente ao gene *hopZ*, o genótipo *hopZ on* foi o mais frequente nas úlceras (60.0%), enquanto que o genótipo *hopZ off* foi o mais prevalente na DNU (51.0%) (p=0.328). Na

população pediátrica, e tendo em conta o grupo da DNU, verificou-se que a maior prevalência correspondeu ao genótipo *sabA on*, com um valor de 56.6%, enquanto nas úlceras, houve predominância do genótipo *sabA off*, com uma percentagem de 75.0 % (p=0.019). Quanto ao gene *hopZ*, não houve diferença entre DNU e DUP, tendo sido o *hopZ on* o genótipo mais prevalente, em ambas as patologias (p=1.000) (Quadro 3).

Relação entre Genótipos *sabA* e *hopZ* com os Restantes Genes Estudados.

A associação de genótipos *sabA* e *hopZ* com outros genótipos já estudados, nomeadamente, *cagA*, *vacA*, *babA2*, *iceA*, *hopQ* e *oipA*, foi também avaliada. Verificou-se que, e apenas para as estirpes isoladas de crianças, os genótipos *hopZ on* e *sabA on* tendem a associar-se aos genótipos *cagA*, *vacAs2*, *babA2* e *oipA off* (cluster A), enquanto que os genótipos *hopZ off* e *sabA off* estão mais relacionados com os genótipos opostos - cluster B (Figura 1).

Avaliação de Genótipos de *H. pylori* como Potenciais Marcadores de Virulência

Tendo em conta os resultados da genotipagem previamente obtidos, verificou-se que os genótipos *cagA+* e *vacAs1* constituem marcadores de virulência em estirpes isoladas de crianças, e que a presença do gene *cagA* constitui também um marcador de virulência na população de estirpes isoladas de adultos. Também nestas estirpes se verificou que existem outros genótipos associados à DUP, nomea-

Quadro 4 - Genótipos associados à DUP em estirpes isoladas de crianças.

Genótipo	Valor de p	O. R. (IC 95%)
<i>cagA+</i>	<0.001	9.17 [2.99-28.04]
<i>vacAs1</i>	<0.001	13.76 [4.07-46.48]
<i>cagA+/vacAs1</i>	<0.001	8.13 [2.612-25.274]
<i>cagA+/SabA off</i>	<0.001	11.73 [3.280-41.970]
<i>vacAs1/SabA off</i>	<0.001	15.60 [4.362-55.792]
<i>cagA+/vacAs1/SabA off</i>	<0.001	13.50 [3.560-51.011]

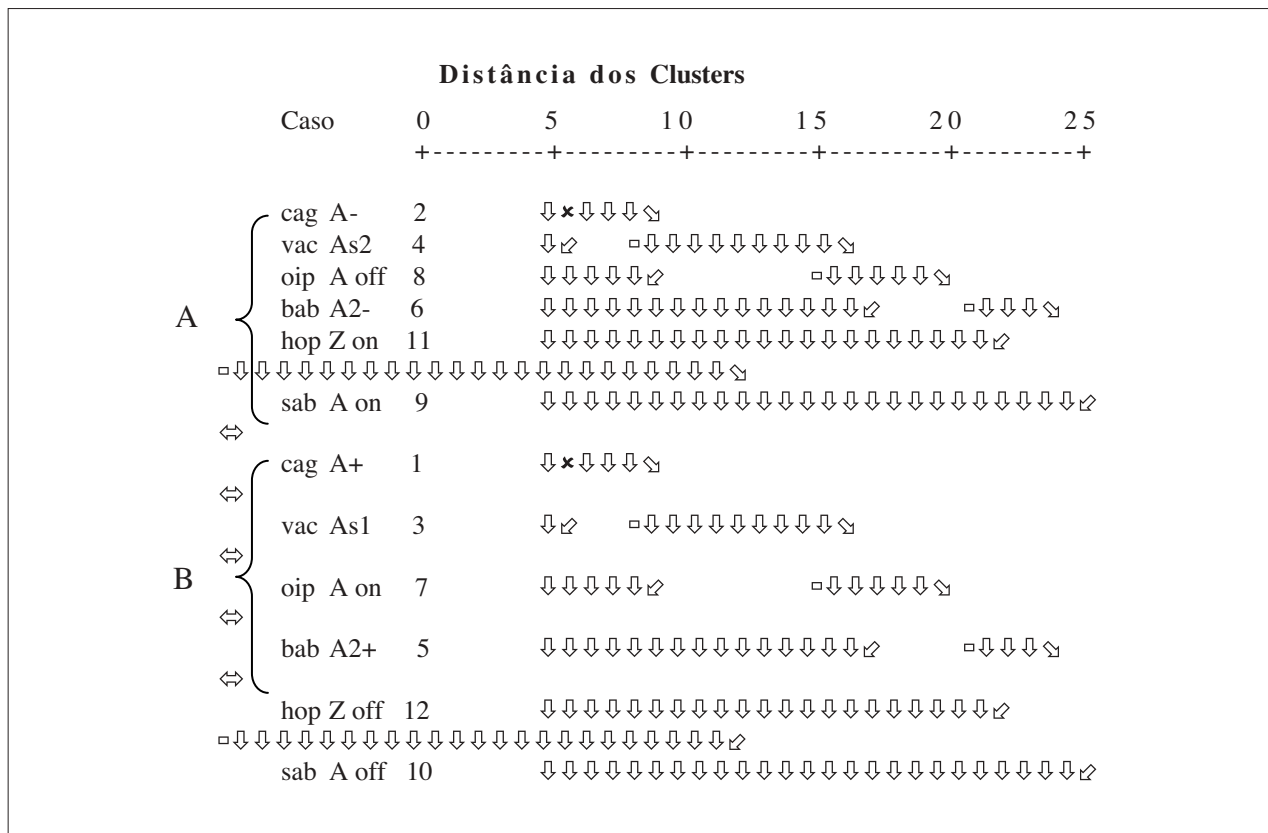


Figura 1 - Associação entre genótipos em estirpes de *H. pylori*, isoladas de doentes com DNU e DUP.

damente, *babA2+*, *oipA on*, *cagA+* / *vacAs1* e *cagA+* / *vacAs1* / *babA2+*. Relativamente aos genótipos *sabA* e *hopZ*, verificámos que por si só não constituem marcadores de virulência da DUP em nenhuma das populações estudadas. No entanto, a associação do genótipo *sabA off* quer aos genótipos *cagA+* e *vacAs1* quer ao grupo *cagA/vacAs1* apresenta uma forte associação com DUP nas estirpes isoladas de crianças (p <0.05) (Quadro 4), contribuindo mesmo para um aumento do risco para esta doença (Figura 2). De facto, observando o gráfico da figura 2 verificou-se que o valor do O.R. aumentou sempre que se associou o genótipo *sabA off* aos restantes genótipos, sendo que a associação *vacAs1/sabA off* (OR = 15.60) foi a que revelou um maior poder discriminatório entre a DNU e a úlcera. No entanto, estas diferenças não foram significativas, tendo que ser validadas com um número maior de casos. Nas estirpes isoladas de adultos, os genótipos *sabA* não contribuíram para uma melhor distinção entre DNU e DUP. A mesma situação se verificou para os genótipos *hopZ*, em ambas as populações estudadas.

DISCUSSÃO

A genotipagem da região 5' dos genes *sabA* e *hopZ* permitiu identificar diferentes mecanismos de regulação da tradução génica. Um dos mecanismos de regulação do status dos genes *sabA* e *hopZ* encontrado, e o mais importante, consiste na variação do número de repetições CT, sendo este mecanismo conhecido por *slipped strand-mechanism mispairing*, já descrito por outros autores para vários genes codificantes de OMPs, nomeadamente, *sabA* e *hopZ* (3,5,6,16). O outro mecanismo de regulação encontrado consiste na deleção ou inserção de grupos de bases nas regiões adjacentes à zona das repetições. As inserções/deleções e o número de repetições CT alteram a fase de leitura, inserindo ou removendo um codão stop. Deste modo, há a tradução de uma proteína completa ou incompleta (não activa), isto é, há produção ou não das proteínas *sabA* e *hopZ*. Esta regulação dá-se ao nível da tradução génica, e pode representar uma forma de adaptação de *H. pylori* às condições do seu nicho ecológico.

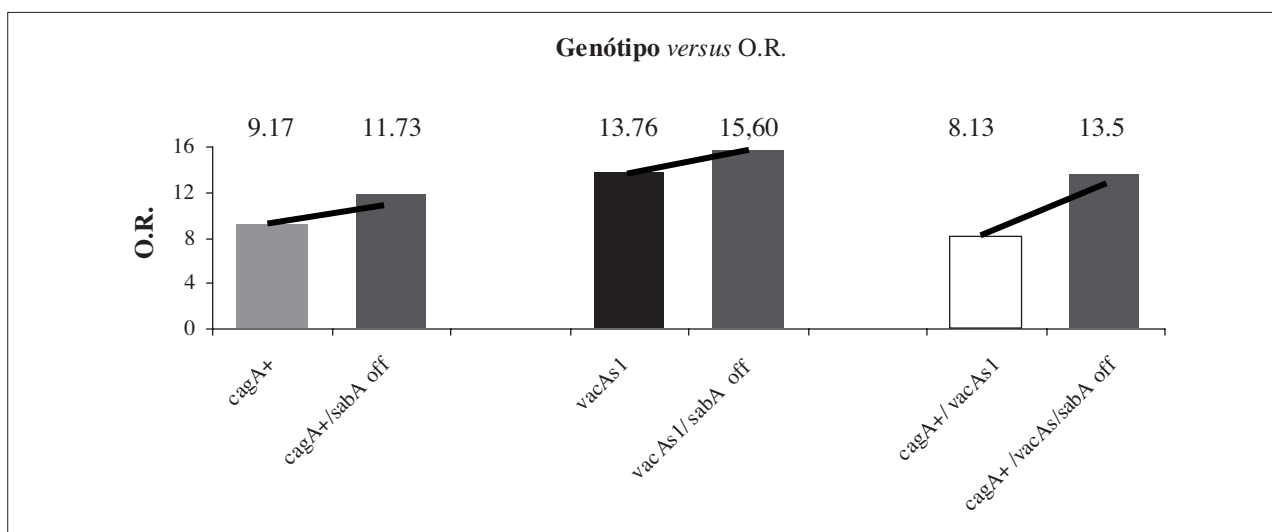


Figura 2 - Aumento do risco para a DUP, quando se associa o genótipo *sabA off* aos genótipos *cagA+*, *vacAs1* e *cagA+/vacAs1*, em estirpes de *H. pylori* isoladas de crianças.

Neste trabalho também se procedeu ao estudo da distribuição dos genótipos *sabA* e *hopZ* por tipo de população e por patologia. Relativamente ao primeiro caso, verificou-se que o *sabA on* foi o genótipo mais prevalente nas estirpes isoladas de adultos, enquanto que, nas estirpes isoladas de crianças, o genótipo *SabA off* foi o mais prevalente. Estes dados podem traduzir a diferença existente entre a mucosa gástrica de uma criança e de um adulto, salientando a importância das características do hospedeiro na infecção por *H. pylori*. De facto, sabe-se que a colonização por *H. pylori* pode ocorrer através do contacto com as microvilosidades do estômago ou por adesão às células epiteliais gástricas, verificando-se que nas crianças a colonização ocorre predominantemente através do contacto da bactéria com a mucosa, enquanto que nos adultos é utilizada preferencialmente a via da adesão, através de proteínas específicas (17,18). O facto de o genótipo *sabA off* ser o mais prevalente nas crianças sugere que de facto a colonização por *H. pylori* ocorre preferencialmente por contacto e não por adesão. Outra hipótese prende-se com o facto de existirem, para além das adesinas *sabA* e *hopZ*, outras proteínas com a mesma função, nomeadamente, a proteína BabA, através da qual a bactéria se liga a receptores diferentes. No entanto, um estudo efectuado anteriormente, utilizando a mesma população de estirpes, mostrou que a prevalência do gene *babA* em estirpes isoladas de crianças foi bastante baixa (11.3% no caso da DNU e 28.6% no

caso das úlceras), o que vem também apoiar a hipótese de colonização preferencial por contacto [14]. Por outro lado, a disponibilidade de determinados receptores na mucosa gástrica pode variar com o grau de infecção e também com a idade do hospedeiro. Sabe-se que a infecção por *H. pylori* induz a sialização da mucosa gástrica, como parte da resposta crónica inflamatória, e que níveis elevados de glicoconjugados sializados são encontrados em indivíduos infectados e estão associados à doença gástrica severa, incluindo a displasia e o cancro (5,19,20). Assim, se considerarmos que o grau e intensidade da infecção, e respectiva resposta imunitária, é muito diferente nos adultos e nas crianças, poderá justificar-se a diferença de genótipos *sabA* entre as duas populações. Relativamente ao gene *hopZ*, o genótipo funcional foi o mais prevalente em ambos os casos. Estudos de mutagenese sugerem que a proteína HopZ é uma adesina importante na medida em que uma mutação no gene correspondente, traduz uma perda considerável na capacidade de adesão da bactéria à mucosa gástrica, o que pode explicar a preferência da bactéria pela funcionalidade do gene *hopZ* em ambas as populações (6).

A distribuição dos genótipos *sabA* por patologia, nos adultos, revelou que o genótipo funcional foi o mais prevalente tanto nos casos de DUP como de DNU, o que pode ser explicado pelo que foi referido anteriormente. O grau de inflamação da mucosa de um indivíduo adulto infectado é favorável

à existência de uma quantidade elevada de receptores aos quais a proteína SabA se pode ligar, independentemente da patologia gástrica. Nas estirpes isoladas de crianças, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a DNU e a DUP, sendo a maior prevalência do gene *sabA* funcional encontrada nas estirpes isoladas de DNU. Pode ser postulado que a presença de uma doença não ulcerosa ou de uma úlcera péptica irá disponibilizar diferentes receptores na mucosa infantil, seleccionando estirpes com diferentes fenótipos de adesão. Por outro lado, e assumindo um papel importante da proteína HopZ na adesão da bactéria, a associação entre o genótipo *hopZ off* e a DUP poderá reflectir uma desvantagem das estirpes aderentes, já que diminui a capacidade da bactéria de escapar à resposta imunitária do hospedeiro, tal como sugerido por Jonge *et al* (16).

Quanto ao gene *hopZ*, o facto de este se encontrar funcional em ambas as patologias, nas estirpes isoladas de crianças, mas ser ligeiramente menos prevalente no caso das estirpes isoladas dos adultos com DNU, comparativamente com os casos de DUP, deverá estar relacionado mais com diferenças ao nível dos receptores do hospedeiro, do que associado ao tipo de patologia apresentada pelo indivíduo.

Em relação ao potencial como marcadores de virulência, verificou-se que nem o gene *sabA* nem o gene *hopZ* estão, por si só, associados à DUP, quer na população pediátrica, quer na população adulta. A suportar estes resultados, observou-se uma forte associação entre os genótipos *sabA on* e *hopZ on* e os genótipos de menor virulência, nomeadamente, *cagA-*, *vacAs2* e *oipA off*, nas estirpes isoladas de crianças. No entanto, nestes casos, o estado não funcional do gene *sabA* encontrou-se estatisticamente associado à DUP. Mais, ao analisarmos a combinação de genótipos, verificamos que o genótipo *sabA off* pode contribuir para a distinção entre a DUP e a DNU, quando associado aos genótipos *cagA+*, *vacAs1*, e *cagA+ / vacAs1*, sendo que a combinação que apresentou um maior poder discriminatório entre DUP e DNU foi a associação *vacAs1 / sabA off*.

Outros trabalhos realizados com estirpes de *H. pylori* isoladas de diferentes patologias gástricas, nomeadamente, DNU, úlcera péptica e Linfoma de Malt referem também a ausência de relação entre a

funcionalidade dos genes *sabA* e *hopZ* e o tipo de patologia (15,16).

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo suportam a complexidade da interacção entre *H. pylori* e o hospedeiro, demonstrando diferenças de genótipos em estirpes isoladas de pacientes com diferentes características, crianças e adultos, e diferentes patologias. Entre os dois genes estudados, apenas o genótipo não funcional do gene *sabA* mostrou correlação com a DUP nas crianças, contribuindo para a distinção entre a DNU e a DUP, quando associado a outros genes de virulência de *H. pylori*.

Correspondência:

L. Monteiro

Centro de Bacteriologia.

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

Tel.: +351-21-7519231

Fax: +351-21-7526400

e-mail: m.lurdes.monteiro@insa.min-saude.pt

BIBLIOGRAFIA

1. Cover T. L., D. E. Berg, M. J. Blaser and H. L. T. Mobley. *Helicobacter pylori* pathogenesis, p. 509-558. In E. Groisman (ed), Principles of bacterial pathogenesis, 2001, Academic Press, New York, N.Y.
2. Dunn, B. E., H. Cohen and M. J. Blaser. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol, 1997, Rev. 10: 720-741.
3. Levinson G. and G. A. Gutman. Slipped-strand Mismatching: a major mechanism for DNA sequence evolution. Mol. Biol. Evol., 1987, 4: 203-221.
4. Henderson I., P. Owen, and J. Nataro. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. Molecular Microbiology, 1999; 33: 919-932.
5. Mahdavi J, B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, et al. *Helicobacter pylori* *sabA* adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science, 2002; 297: 573-8.
6. Peck B., M. Ortkamp, K. D. Diehl, E. Hundt and B. Knapp. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*, 1999, Nucleic Acids

- Research, vol. 27. no. 16, 3325- 3333.
7. Galmiche A, J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J.C. Chambard, S. Contamin, et al. The N- terminal 34 KDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 2000; 19:6361-62370.
 8. Godoy A. P., M. L. Ribeiro, Y. H. Benvenuto, L. Vitiello., M. B. Miranda, S. Mendonca, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates, *BMC Gastroenterol*, 2003; 3: 1-6.
 9. Blaser MJ and Atherton. J. C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, 2004. 113:321-33.
 10. Akopyants N. S., Clifton S. W., Kersulyte, Crabtree J. E., Youree B. E., Reece C. A., et al. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, 1998, 28 (1), 37:53.
 11. Stein M., R. Rappuoli, and A. Covacci. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97-1263:1268.
 12. Alm R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, et al. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1999, 397: 176-180.
 13. Tomb J.F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, et al. The complete genome of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 1997, 388: 539-547.
 14. Oleastro M, M. Gerhard, A. I. Lopes, P. Ramalho, J. Cabral, A. S. Guerreiro, et al. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003, 22:85-91.
 15. Lehours P., A. Ménard, S. Dupouy, B. Bergey, F. Richey, F. Zerbib, et al. Evaluation of the Association of Nine *Helicobacter pylori* Virulence Factors with Strains Involved in Low-Grade Gastric Mucosa - Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Infect. Immun*, 2004, 880-888.
 16. de Jonge R., R. G. J. Pot, R. J. L. F. Loffeld, A. H. M van Vliet., E. J. Kuipers, J. G. Kusters. The functional status of the *Helicobacter pylori* sabB adhesin gene as a putative marker for disease outcome. *Helicobacter*, 2004, 9: 158-64.
 17. J. L. Guruge, P. G. Falk, R. G. Lorenz, M. Dans, H. P. Wirth, M. J. Blaser, et al. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, vol. 95, 3925: 3930.
 18. Blom J., A. Gernow, S. Holck, V. Wewer, A. Norgaard, L. B. Graff, et al. Different patterns of *Helicobacter pylori* adherence to gastric mucosa cells in children and adults. An ultrastructural study. *Scand J Gastroenterol*. 2000, 35 (10) - 1033: 40.
 19. Sipponen P, Lindgren J. Sialylated Lewis determinant CA 19-9 in benign and malignant gastric tissue. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]*. 1986 Sep; 94(5): 305-11.
 20. Amado M, Carneiro F, Seixas M, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. Dimeric sialyl-Le(x) expression in gastric carcinoma correlates with venous invasion and poor outcome. *Gastroenterology*. 1998 Mar; 114(3): 462-70.