

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Estudo de dois membros
da família das proteínas da membrana
externa de *Helicobacter pylori*,
homC e *homD***

Rita Rego Jesus Cordeiro

Mestrado em Microbiologia Clínica

2011

**A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão
Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de
Medicina de Lisboa em reunião de 21/06/2011.**

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Estudo de dois membros
da família das proteínas da membrana
externa de *Helicobacter pylori*,
homC e *homD***

Rita Rego Jesus Cordeiro

Mestrado em Microbiologia Clínica

**Dissertação orientada pela Doutora Mónica Oleastro e
co-orientada pelo Professor Doutor Mário Ramirez**

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são
da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo
qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa
pelos conteúdos nele apresentados.**

A presente dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa por opção do autor.

Índice

Agradecimentos	i
Lista de Abreviaturas	ii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	x
Resumo	xii
Abstract	xiv
<u>Capítulo I: Introdução</u>	1
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS RELATIVAMENTE A <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1. Breve História sobre a Descoberta de <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2. Microbiologia de <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.2.1. Descrição do Género e Filogenia.....	2
1.2.2. Características Morfológicas.....	4
1.2.3. Características Fisiológicas.....	5
2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR <i>Helicobacter pylori</i>	5
3. RESPOSTA IMUNITÁRIA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR <i>Helicobacter pylori</i>	8
4. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO POR <i>Helicobacter pylori</i>	9
5. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	11
6. VARIAÇÃO GEOGRÁFICA.....	13

7. VIRULÊNCIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	16
7.1. Factores de Virulência.....	17
7.1.1. Ilhéu de Patogenicidade <i>cag</i>	17
7.1.2. <i>VacA</i>	19
7.2. Proteínas da membrana externa.....	21
7.2.1. Duplicação de genes.....	25
7.2.2. Regulação por variação de fase.....	26
7.2.3. Variação alélica.....	27
7.2.4. Presença de genes específicos de estirpe que codificam para proteínas da membrana externa.....	28
7.3. Adesão de <i>Helicobacter pylori</i> às células epiteliais gástricas.....	28
7.3.1. <i>babA</i>	29
7.3.2. <i>sabA</i>	31
Capítulo II: Objectivos	33
Capítulo III: Materiais e Métodos	35
1. ESTIRPES DE <i>Helicobacter pylori</i> E MATERIAL GENÓMICO.....	35
1.1. Cultura das estirpes de <i>Helicobacter pylori</i>	37
1.2. Extracção de DNA genómico.....	38
2. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÓMICA DOS GENES <i>homC</i> E <i>homD</i> NA AMOSTRA DE ESTIRPES EM ESTUDO.....	38
3. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA, ANÁLISE FILOGENÉTICA E DOS PARÂMETROS EVOLUTIVOS DOS GENES <i>homC</i> E <i>homD</i>	41

4. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA PROTEÍNA HomD.....	44
5. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	44
5.1. Construção de estirpes mutantes de <i>Helicobacter pylori</i> para os genes <i>homC</i> e <i>homD</i>	45
5.2. Ensaio da secreção <i>in vitro</i> da citocina pro-inflamatória IL-8.....	46
5.3. Ensaio de adesão <i>in vitro</i>	47
6. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIGÉNICAS DE HomC E HomD.....	48
6.1. Construção das proteínas recombinantes HomC e HomD.....	48
6.2. SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	51
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
Capítulo IV: Resultados	54
1. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÓMICA DOS GENES <i>homC</i> E <i>homD</i> NA AMOSTRA DE ESTIRPES EM ESTUDO.....	54
2. ANÁLISE FILOGENÉTICA, PARÂMETROS EVOLUTIVOS E AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS GENES <i>homC</i> E <i>homD</i>	56
2.1. Análise filogenética das sequências dos genes <i>homC</i> e <i>homD</i>	56
2.1.1. Sequências do gene <i>homC</i>	56
2.1.2. Sequências do gene <i>homD</i>	58
2.2. Avaliação da variabilidade genética das sequências dos genes <i>homC</i> e <i>homD</i>	60
2.2.1. Sequências do gene <i>homC</i>	60
2.2.1.1. Análise do segmento 2 nas sequências do gene <i>homC</i>	63

2.2.1.2. Distribuição dos alelos do gene <i>homC</i> de acordo com a patologia e perfil de virulência das estirpes.....	71
2.2.2. Sequências do gene <i>homD</i>	77
2.2.2.1. Distribuição dos motivos KP das proteínas HomD de acordo com a patologia e perfil de virulência das estirpes.....	80
2.3. Cálculo dos parâmetros evolutivos dos genes <i>homC</i> e <i>homD</i>	82
2.3.1. gene <i>homC</i>	84
2.3.2. gene <i>homD</i>	90
3. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA PROTEÍNA HomD.....	91
4. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	94
5. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIGÊNICAS DE HomC E HomD.....	97
<u>Capítulo V: Discussão e Conclusão</u>	100
<u>Capítulo VI: Bibliografia</u>	107
Anexos	134

Agradecimentos

À Mónica Oleastro por todo o seu apoio científico ao longo destes anos, em que a sua orientação, dedicação e amizade foram de extrema importância para a realização deste trabalho.

À Andrea Santos, Ana Pelerito e João Benoliel pela amizade e apoio prestado ao longo destes últimos anos.

À Alexandra Nunes e ao João Paulo Gomes pela disponibilidade e conhecimentos científicos transmitidos na análise bioinformática realizada neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Oncobiologia do Departamento de Genética do INSA, principalmente à Patrícia Barros, pela disponibilidade, dedicação e conhecimentos transmitidos na construção das proteínas recombinantes.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Victor Segalen Bordeaux 2, Unidade INSERM U853, principalmente ao Jonathan Ferrand e Doutora Armelle Ménard, pela disponibilidade e ajuda na realização prática dos ensaios *in vitro*.

Aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio prestado e pela oportunidade de concretizar este trabalho.

Ao Ricardo por todo o amor e carinho, mas principalmente, pelo grande apoio e ajuda prestada ao longo destes anos.

Um grande beijinho e Muito obrigada

Lista de Abreviaturas

AGS	<i>Human gastric epithelial adenocarcinoma cells</i>
APCs	<i>Antigen presenting cells</i>
BabA	<i>Blood group antigen binding adesin</i>
BSA	Albumina do soro bovino
C	Cancro gástrico
<i>C. pyloridis</i>	<i>Campylobacter pyloridis</i>
<i>cag PAI</i>	Ilhéu de patogenicidade <i>cag</i>
<i>cagA</i>	<i>Cytotoxin associated gene A</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CT	Citosina/Timina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
G	Gastrite
G+C	Guanina+Citosina
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
h	Hora
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>

IFN- γ	Interferão γ
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Ka	Substituições não-sinónimas
kDa	Kilodaltons
KP	Lisina-prolina
Ks	Substituições sinónimas
LB	<i>Luria-bertani</i>
MALT	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
min	Minuto
MOI	Multiplicidade de infecção
N.D.	Não Disponível
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NOD1	<i>Nucleotide binding oligomerization domain containing protein 1</i>

OipA	<i>Outer inflammatory protein A</i>
OMPs	<i>Outer membrane proteins</i>
ORF	<i>Open reading frames</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PSA	Persulfato de amónio
s	Segundo
S.D.	<i>Standard deviation</i>
SabA	<i>Sialic acid binding adhesin</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SST4	Sistema de secreção do tipo IV
terminal-N	Terminal amino
Th1	<i>Type 1 helper T cells</i>
Th2	<i>Type 2 helper T cells</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	Factor de necrose tumoral α
TSB	<i>Trypticase soya broth</i>
UP	Úlcera péptica
<i>vacA</i>	<i>Vacuolating cytotoxin gene A</i>

Lista de Figuras

Figura 1: Anatomia do estômago do Homem e a localização de <i>Helicobacter pylori</i>	4
Figura 2: Representação esquemática dos factores que contribuem para o desenvolvimento da doença pela infecção por <i>Helicobacter pylori</i> e possíveis quadros clínicos associados a esta infecção.....	7
Figura 3: Populações de <i>Helicobacter pylori</i> e a sua distribuição em todo o mundo. A, Árvore filogenética das populações e subpopulações de <i>Helicobacter pylori</i> , os diâmetros dos círculos representam a diversidade genética dentro de cada população e os ângulos dos arcos preenchidos são proporcionais ao número de isolados. B, Distribuição de nove populações e subpopulações entre 769 estirpes estudadas.....	15
Figura 4 : Estrutura e diversidade alélica do gene <i>vacA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> : estrutura da citotoxina VacA (A); mosaicism do gene <i>vacA</i> (B).....	20
Figura 5: Caracterização de factores de virulência de <i>Helicobacter pylori</i> e os seus principais efeitos nas células hospedeiras.....	21
Figura 6: Análise filogenética das cinco famílias de parólogos da estirpe de referência J99.....	22
Figura 7: Produtos de amplificação de DNA separados em gel de agarose a 1% corado com <i>GelRed</i> TM	55

Figura 8: Análise filogenética de 167 sequências do gene <i>homC</i> de 142 estirpes clínicas e 25 estirpes de referência de <i>Helicobacter pylori</i>	57
Figura 9: Análise filogenética de 129 sequências do gene <i>homD</i> de 104 estirpes clínicas e 25 estirpes de referência de <i>Helicobacter pylori</i>	59
Figura 10: Representação gráfica da similaridade entre 165 sequências de nucleótidos do gene <i>homC</i> de estirpes de <i>Helicobacter pylori</i> (estirpes de origem Ocidental, vermelho; Oriental/Ameríndia, verde e Africana, azul).....	61
Figura 11: Alinhamento representativo das variações no segmento 1 do gene <i>homC</i> . Foram usadas 22 estirpes de referência de <i>Helicobacter pylori</i>	62
Figura 12: Alinhamento representativo das variações do segmento 2 (do aminácido 454 ao 590, assinalados com linhas a tracejado) das proteínas HomC de estirpes clínicas e de referência de <i>Helicobacter pylori</i>	64
Figura 13: Distribuição dos oito alelos do gene <i>homC</i> (AI-AVIII) em 165 estirpes clínicas e de referência de <i>Helicobacter pylori</i>	65
Figura 14: Distribuição dos oito alelos do gene <i>homC</i> (AI-AVIII) em 165 estirpes clínicas e de referência de <i>Helicobacter pylori</i> de acordo com a origem geográfica (Ocidental, Oriental/Ameríndia e Africana).....	65
Figura 15: Análise filogenética de 167 sequências do gene <i>homC</i> de 142 estirpes clínicas e 25 estirpes de referência de <i>Helicobacter pylori</i>	67
Figura 16: Representação gráfica da similaridade entre sequências de nucleótidos do gene <i>homC</i> de estirpes de <i>Helicobacter pylori</i> de origem geográfica diferente (A:	

77 estirpes de origem Ocidental, B: 68 estirpes de origem Oriental e C: 20 estirpes de origem Africana) apresentando os diferentes alelos *homC*.....69

Figura 17: Representação gráfica da similaridade entre sequências de nucleótidos do gene *homC* de estirpes de *Helicobacter pylori* apresentando os diferentes alelos *homC* (A: 51 estirpes do alelo AI a vermelho; B: 26 estirpes do alelo AII a azul; C: 15 estirpes do alelo AIII a amarelo e D: 68 estirpes do alelo AIV a verde).....70

Figura 18: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (AI-AIV) em 148 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a patologia.....72

Figura 19: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (AI-AIV) em 148 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a patologia: gastrite e úlcera péptica em cada grupo geográfico considerado (grupos Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano).....74

Figura 20: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (AI-AIV) em 127 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com o genótipo de virulência.....75

Figura 21: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (AI-AIV) em 127 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com o genótipo de virulência, em cada grupo geográfico (Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano).....76

Figura 22: Representação gráfica da similaridade entre 129 sequências do gene *homD* de estirpes de *Helicobacter pylori* de origem geográfica diferente.....77

- Figura 23:** Alinhamento representativo da variação das repetições dos motivos KP das proteínas HomD de estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori*.....79
- Figura 24:** Distribuição do número de repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD em 129 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori*.....79
- Figura 25:** Distribuição do número de repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD em 129 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a origem geográfica da estirpe.....80
- Figura 26:** Distribuição do número de repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD em 116 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a patologia (gastrite, úlcera péptica e cancro gástrico).....81
- Figura 27:** Distribuição do genótipo virulento e do genótipo não virulento de 85 estirpes clínicas de *Helicobacter pylori* de acordo com o intervalo das repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD.....82
- Figura 28:** Representação gráfica dos perfis de índice de antigenicidade de probabilidade de exposição à superfície da bactéria e de hidrofiliidade e de sequências de proteínas exemplificativas do número menor (2 KP), número intermédio (5 KP) e maior (9 KP) número de repetições de motivos KP nas proteínas HomD.....93

Figura 29: Ensaio *in vitro* da indução da secreção de IL-8 (A) e de adesão às células epiteliais gástricas (B), utilizando estirpes selvagens e mutantes de *Helicobacter pylori* para os genes *homC* e *homD*.....96

Figura 30: Lisados proteicos separados por SDS-PAGE e corados com solução de azul de Coomassie da cultura não induzida e induzida com IPTG, correspondentes à proteína rHpHomD.....98

Figura 31: Análise da antigenicidade da proteína recombinante HomD em lisados proteicos separados por SDS-PAGE da cultura induzida e não induzida com IPTG durante 3h.....99

Figura 32: Representação do marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder* com fragmentos de DNA de 500 pb a 12 Kb.....141

Figura 33: Mapa do vector pCR[®]2.1-TOPO[®]148

Figura 34: Mapa do vector pGEX-4T-3.....153

Figura 35: Representação do marcador de peso molecular *Precision Plus ProteinTM Standards* com padrões de 250 a 10 kDa.....165

Lista de Tabelas

<u>Tabela 1:</u> Distribuição das estirpes clínicas de <i>Helicobacter pylori</i> (n=142) em estudo de acordo com a região geográfica, patologia, sexo e idade dos doentes.....	36
<u>Tabela 2:</u> <i>Primers</i> utilizados para amplificar os <i>loci homC</i> e <i>homD</i>	39
<u>Tabela 3:</u> <i>Primers</i> utilizados para sequenciação dos <i>loci homC</i> e <i>homD</i>	40
<u>Tabela 4:</u> Características gerais das estirpes de referência de <i>Helicobacter pylori</i> totalmente sequenciadas e anotadas (n=25) que foram incluídas no presente estudo.....	42
<u>Tabela 5:</u> <i>Primers</i> utilizados na reacção de amplificação e sequenciação da cassette de resistência à Canamicina.....	46
<u>Tabela 6:</u> <i>Primers</i> utilizados nas reacções de amplificação e posterior sequenciação dos clones de <i>Escherichia coli</i> resultantes.....	50
<u>Tabela 7:</u> Análise das distâncias moleculares, substituições sinónimas e não sinónimas para as sequências correspondentes ao gene completo e segmentos 1, 2 e 3 do gene <i>homC</i>	86
<u>Tabela 8:</u> Análise das distâncias moleculares, substituições sinónimas e não sinónimas para as sequências correspondentes ao gene completo e segmentos 1, 2 e 3 do gene <i>homC</i> dos alelos mais prevalentes.....	88

Tabela 9: Análise das distâncias moleculares, substituições sinónimas e não sinónimas para as sequências correspondentes ao gene completo do gene *homD*.....91

Tabela 10: Características das estirpes de *Helicobacter pylori* e dos respectivos genes *homC* e *homD* utilizados para a construção dos mutantes.....94

Tabela 11: Mistura reaccional utilizada na clonagem dos produtos de PCR com os locais de restrição no vector pCR[®]2.1-TOPO[®]150

Tabela 12: Mistura reaccional utilizada na digestão do TOPO com os genes *homC* e *homD* clonados e do vector pGEX-4T-3 com a enzima de restrição *Sall*.....156

Tabela 13: Mistura reaccional utilizada na digestão do DNA de TOPO com os genes *homC* e *homD* clonados e vector com a enzima de restrição *NotI*.....157

Tabela 14: Mistura reaccional utilizada na ligação.....158

Tabela 15: Solução para a preparação do gel de separação com 10% de acrilamida/bis-acrilamida 40%.....163

Tabela 16: Solução para a preparação do gel *stacking* com 4% de acrilamida/bis-acrilamida.....164

Tabela 17: Preparação de tampões e soluções de trabalho.....166

Resumo

Neste trabalho pretendeu-se estudar a diversidade genética e evolução dos genes *homC* e *homD*, que codificam para OMPs de *H. pylori*, num painel de 189 estirpes isoladas de doentes de origem geográfica diferente e com diversas gastropatologias. Foram utilizadas as técnicas de PCR e sequenciação e ferramentas de bioinformática. Posteriormente, pretendeu-se esclarecer o papel destes genes na virulência de *H. pylori*, através de ensaios *in vitro* e avaliação da antigenicidade das respectivas proteínas.

A reconstrução filogenética do gene *homC* revelou uma segregação geográfica, com três grupos predominantes, Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano. Foram identificadas oito variantes alélicas, com especificidade geográfica nos alelos mais prevalentes. Os resultados sugerem que estas variantes podem estar envolvidas na adaptação da bactéria ao hospedeiro e constituir marcadores da patologia gástrica e da virulência da estirpe.

O gene *homD* mostrou menor diversidade genómica. No entanto, no terminal-N das proteínas HomD foi observada uma zona variável de repetições de motivos de KP (2-9 KP), tendo-se verificado uma correlação entre um menor número de repetições de motivos KP (≤ 4 KP) e a UP e o maior número de repetições (≤ 7 KP) e a gastrite. A análise *in silico* da proteína HomD mostrou que esta região de repetições exibe um elevado índice de hidrofobicidade e antigenicidade e uma alta probabilidade de exposição à superfície da bactéria. A corroborar estes resultados, demonstrou-se que a proteína HomD é antigénica.

Os ensaios *in vitro* sugerem que o gene *homC* poderá estar envolvido na resposta inflamatória de *H. pylori*.

Globalmente, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o gene *homC* está implicado na interacção entre *H. pylori* e o hospedeiro, contribuindo para a virulência desta bactéria. O gene *homD* parece ser um importante antígeno de *H. pylori*, e devido à sua elevada conservação a nível mundial, poderá constituir um novo alvo vacinal ou terapêutico.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; OMPs; *homC*; *homD*.

Abstract

This work aimed to study the genetic diversity and evolution of *homC* and *homD* genes, coding for *H. pylori* OMPs, in a panel of 189 strains isolated from patients from different geographical origins and presenting different gastric diseases. PCR, sequencing and bioinformatics analysis were used. Subsequently, to clarify the role of these genes in *H. pylori* virulence, *in vitro* experiments and evaluation of the proteins antigenicity were performed.

Phylogenetic reconstruction of *homC* gene revealed a geographic segregation, with three predominant groups, Western, East Asian/Amerindian and African. Eight allelic variants were identified, with geographic specificity regarding the most prevalent alleles. The results suggest that these variants may be involved in bacteria adaptation to the host and constitute markers of gastric pathology and of strain virulence.

homD gene showed a lower genomic diversity. However, in the N-terminus of HomD a region with a variable number of KP motifs repeats (2-9 KP) was observed, with correlation between the lower number of KP motifs repeats (≤ 4 KP) and peptic ulcer disease and the largest number of repeats (≤ 7 KP) and gastritis. *In silico* analysis of HomD protein showed that this region exhibits a strong hydrophilicity and antigenicity and a high probability of being exposed to the bacterial surface. In support of these results, it was demonstrated that HomD protein is antigenic.

In vitro experiments suggest that *homC* gene may be involved in *H. pylori* inflammatory response.

Overall, the results of this study suggest that *homC* gene is involved in the interaction between *H. pylori* and the host, contributing to bacterial virulence. *homD* gene appears to be an important *H. pylori* antigen, and because of its high global conservation likely constitutes a new therapeutic or vaccine target.

Keywords: *Helicobacter pylori*; OMPs; *homC*; *homD*.

Capítulo I: Introdução

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS RELATIVAMENTE A *Helicobacter pylori*

1.1. Breve História sobre a Descoberta de *Helicobacter pylori*

A primeira referência a microrganismos actualmente identificados como *Helicobacter* começou antes da viragem do século XIX, com a descrição de “espiroquetas” na mucosa gástrica de animais, por Bizzozero em 1893, e por Salomon em 1896, no estômago de gatos e cães^{20,147}. A primeira observação destes microrganismos no estômago humano foi feita em 1906 por Krienitz⁸⁷. Desde essa data e até à década de oitenta, foram reportadas várias observações destes microrganismos em tecidos gástricos, de indivíduos *post-mortem* e de doentes com úlcera péptica e carcinoma gástrico^{44,59}. No entanto, como a cultura da bactéria nunca tinha sido conseguida até à data, os microbiologistas assumiram que o estômago humano era um órgão estéril. No início de 1980, o gastroenterologista Barry Marshall e o seu colega patologista, Robert Warren, encontraram bactérias de forma espiralada em metade das biopsias obtidas de doentes atendidos nas consultas de rotina de gastroenterologia, e verificaram que a sua presença estava relacionada com a inflamação da mucosa¹⁶⁷. As tentativas para a cultura da bactéria falharam inicialmente, e a primeira cultura bacteriana a partir de uma amostra gástrica foi conseguida acidentalmente, durante um feriado de Páscoa, quando as placas foram deixadas na incubadora durante um período de tempo mais longo. Estes resultados foram primeiramente publicados em 1983 na revista *The Lancet*, começando assim a era *Helicobacter*^{97,167}. A bactéria foi inicialmente designada por

Campylobacter pyloridis e foi encontrada em todos os doentes com úlcera duodenal e na maioria dos doentes com úlcera gástrica, tendo sido sugerido que *C. pyloridis* seria um factor importante no desenvolvimento da doença ulcerosa péptica¹⁰⁰. Na tentativa de preencher os postulados de Koch, Marshall ingeriu uma cultura de *C. pyloridis* desenvolvendo posteriormente uma gastrite aguda, e as biopsias obtidas por endoscopia mostraram a presença de uma bactéria com forma espiralada na sua mucosa inflamada, mostrando a relação entre a gastrite e a infecção por *C. pyloridis*⁹⁹. Além disso, a sua situação clínica foi resolvida através de um tratamento com antibióticos. Em 1987, a nomenclatura do microrganismo foi revista para *Campylobacter pylori* e apenas em 1989 foi criado um novo género, *Helicobacter*, e o microrganismo foi então designado por *Helicobacter pylori*^{63,98}.

Em 2005, Robert Warren e Barry Marshall foram galardoados com o prémio Nobel da Fisiologia e Medicina pela descoberta de *H. pylori* e o seu papel na gastrite e úlcera péptica.

1.2. Microbiologia de *Helicobacter pylori*

1.2.1. Descrição do Género e Filogenia

O género *Helicobacter* pertence à subdivisão *Epsilon*, filo *Proteobacteria*, ordem *Campylobacterales* e família *Helicobacteraceae*^{26,127}. Até à data, o género *Helicobacter* é composto por mais de 20 espécies identificadas, com muitas outras à espera de reconhecimento formal⁵⁸. Todos os membros do género *Helicobacter* são

microrganismos microaerófilos e na maioria dos casos são catalase e oxidase positiva, e muitas das espécies, mas nem todas, são urease positiva⁵.

A colonização do estômago e do tracto intestinal por espécies de *Helicobacter* é ubiqüitária no reino animal. Estas espécies podem ser subdivididas em duas linhagens, as espécies gástricas e as espécies entero-hepáticas (não gástricas) de *Helicobacter*. Ambos os grupos demonstram um grande nível de especificidade para determinados órgãos, por exemplo, as espécies gástricas de *Helicobacter* geralmente são incapazes de colonizar o intestino ou o fígado, e vice-versa¹⁵².

H. pylori apresenta a característica única de colonizar o epitélio gástrico humano, e de outros primatas. Normalmente coloniza o antro (parte inferior), região do estômago onde há menor produção de ácido, mas também coloniza a região do corpo (parte central) em indivíduos hiposecretóres (Figura 1). *H. pylori* sobrevive no estômago em condições de pH baixo (<5) produzindo abundantemente a enzima urease, que hidrolisa ureia em amoníaco e dióxido de carbono. O amoníaco tamponiza o pH do citosol e do periplasma, tal como o microambiente circundante à bactéria¹⁰⁶. *H. pylori* está localizada abaixo da camada de muco, à superfície das células epiteliais, onde parte da população bacteriana pode estar aderida, no entanto, a grande maioria das bactérias é móvel, utilizando o pH do muco como orientação quimiotática¹⁴⁸.

Dados mais recentes sugerem que *H. pylori* pode invadir as células da mucosa gástrica e estar presente dentro das células epiteliais gástricas e das células imunitárias. Além disso, *H. pylori* pode colonizar novamente o ambiente extracelular após a eliminação com antibióticos da população extracelular, sugerindo que pode

ser considerada uma bactéria intracelular facultativa. Esta invasão pode ter um papel na persistência e patogenicidade da bactéria⁴⁷.

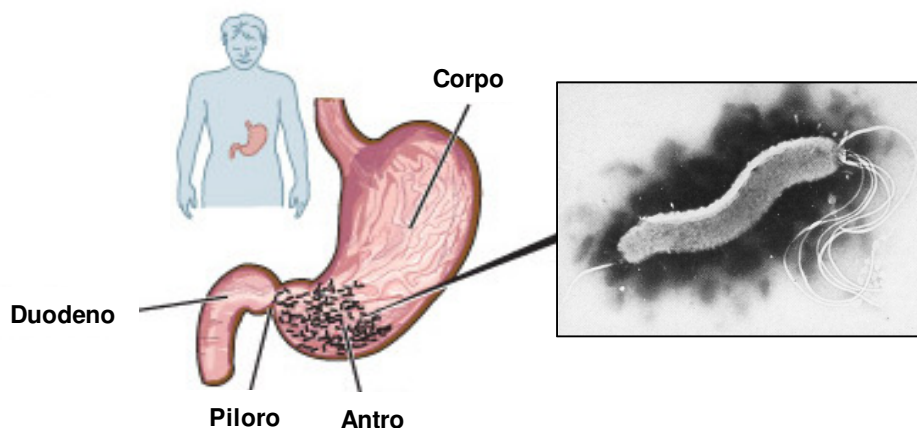


Figura 1: Anatomia do estômago do Homem e a localização de *Helicobacter pylori* (Adaptado de <http://www.helico.com/>).

1.2.2. Características Morfológicas

H. pylori é uma bactéria Gram negativa espiralada, não formadora de esporos, com um comprimento de 2,5 a 5 μm e largura de 0,5 a 1,0 μm , e possui cinco a sete flagelos unipolares com bainha e extremidades bulbosas⁶⁴. A morfologia espiralada e a presença de flagelos são essenciais para a colonização da mucosa gástrica⁴⁸. *In vitro*, forma colônias pequenas, translúcidas e brilhantes. Em condições de stress físico e químico pode apresentar uma forma cocóide, não cultivável *in vitro*. Esta alteração morfológica também já foi observada em culturas envelhecidas¹⁵². A forma cocóide da bactéria consegue sobreviver durante vários anos em águas de rio e foi proposta como sendo um factor importante na transmissão, através da excreção fecal, e na falência da terapêutica⁵.

1.2.3. Características Fisiológicas

H. pylori é uma bactéria microaerófila, que requer uma concentração de oxigénio reduzida (aproximadamente 5% de O₂, 5-10% de CO₂ e 85% de N₂), tendo uma temperatura óptima de crescimento de 37°C⁵. Apresenta forte actividade das enzimas urease, catalase e oxidase⁶⁴.

2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori*

H. pylori está etiologicamente associada a várias gastropatologias como gastrite crónica, úlcera péptica, e é considerada um factor de risco no carcinoma gástrico e linfoma de MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). Em 1994, *H. pylori* foi classificada como um carcinogénico de classe I pela Organização Mundial de Saúde em 1994. A infecção por *H. pylori* é normalmente adquirida na infância, e uma vez estabelecida no estômago, irá persistir durante toda a vida do hospedeiro, se não se proceder à sua erradicação com antibióticos¹³⁵. É a cronicidade desta infecção que leva ao desenvolvimento da doença gástrica mais severa, tendo as manifestações clínicas uma maior expressão na idade adulta.

Apesar de a maioria dos indivíduos com infecção crónica por *H. pylori* permanecerem assintomáticos, 10-20% irão desenvolver alterações significativas da mucosa gastroduodenal, particularmente a úlcera péptica (gástrica ou duodenal)¹³⁵. A gastrite atrófica, o carcinoma gástrico e o linfoma de MALT constituem manifestações clínicas menos frequentes desta infecção (~1-3% dos indivíduos infectados)¹³⁵ (Figura 2).

A maioria dos indivíduos infectados sintomáticos passa por um quadro clínico que envolve dores abdominais persistentes, dores epigástricas pós-prandiais, vômitos e indigestão. A análise histológica da biopsia gástrica destes doentes revela a presença de uma gastrite²¹. Em alguns casos, a infecção progride para doenças gástricas severas tais como úlcera duodenal, úlcera gástrica, atrofia gástrica e carcinoma gástrico. O padrão e a distribuição da gastrite estão fortemente relacionados com o risco de sequelas clínicas. É conhecido que doentes com uma secreção ácida elevada desenvolvem gastrite predominantemente no antro quando infectados com *H. pylori*, estando mais predispostos a desenvolver úlcera duodenal, enquanto os doentes com uma baixa produção de ácido apresentam gastrite predominantemente no corpo gástrico e têm mais propensão para desenvolver úlcera gástrica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e em última instância carcinoma gástrico^{12,43,101} (Figura 2). A carcinogénese gástrica deve ser considerada como uma doença multifactorial onde a infecção por *H. pylori*, os factores genéticos do hospedeiro e os factores ambientes desempenham um papel no seu desenvolvimento².

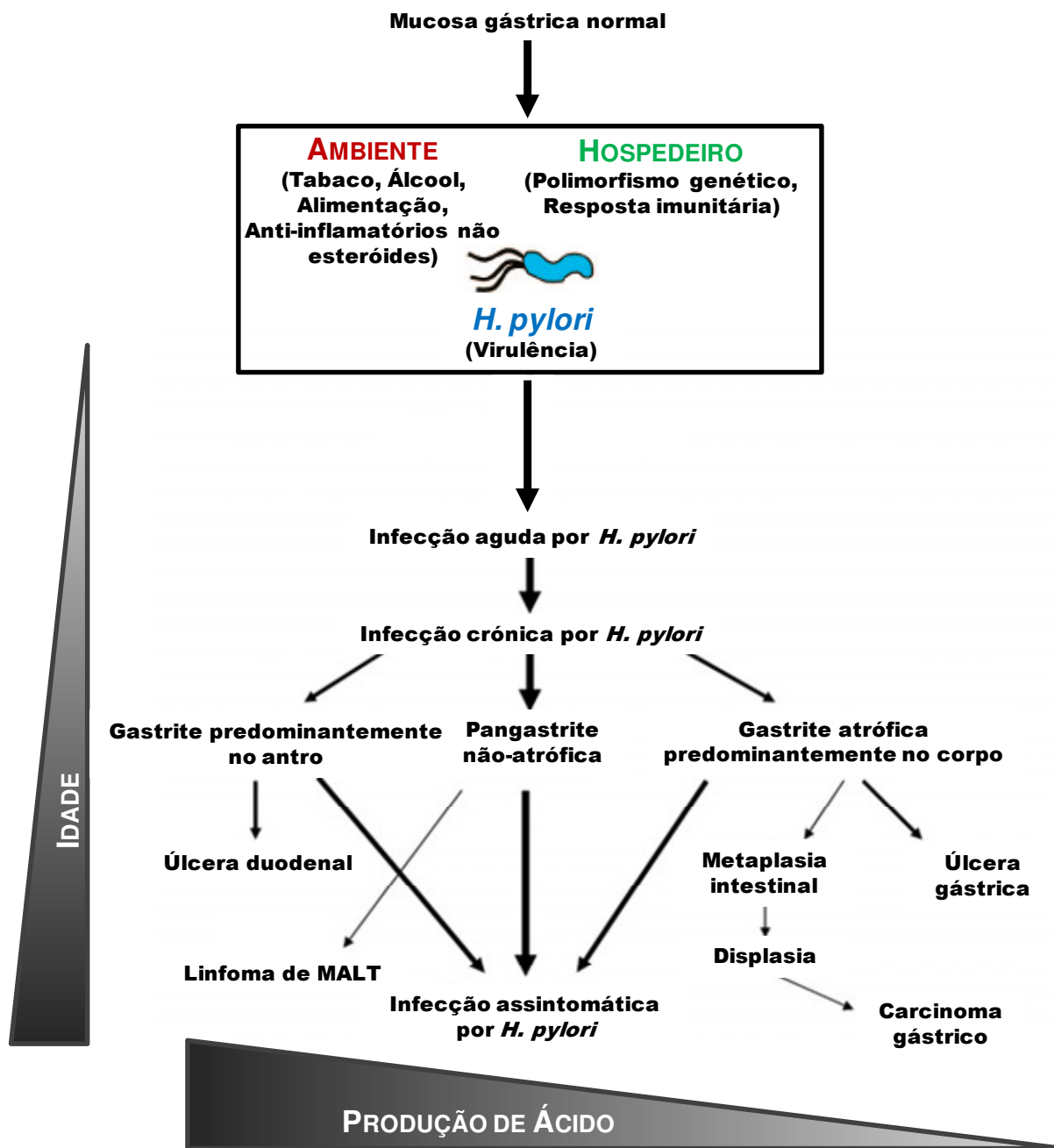


Figura 2: Representação esquemática dos factores que contribuem para o desenvolvimento da doença pela infecção por *Helicobacter pylori* e possíveis quadros clínicos associados a esta infecção. (Adaptado de ^{135,88}).

3. RESPOSTA IMUNITÁRIA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori*

A infecção por *H. pylori* persiste na mucosa gástrica do hospedeiro durante décadas, a menos que a bactéria seja erradicada. Durante a sua longa convivência com os seres humanos, *H. pylori* tem-se adaptado através de estratégias complexas para manter a inflamação do epitélio gástrico, ao limitar a extensão da resposta imunitária a fim de evitar a sua eliminação, mecanismos esses que incluem a redução do reconhecimento pelos sensores do sistema imunitário, regulação baixa das células do sistema imunitário e escape aos efectores imunitários.

O sistema imune inato representa a "primeira linha de defesa" na resposta a patógenos. O reconhecimento de moléculas bacterianas é mediado pelos receptores *Toll-Like* (TLRs, *Toll-Like Receptors*), expressos nas células apresentadoras de antígenos (APCs, *Antigen Presenting Cells*). O contacto bacteriano com as APCs leva à secreção de citocinas pro-inflamatórias. De facto, a infecção por *H. pylori* tem sido associada a níveis de citocinas pro-inflamatórias elevadas, tais como factor de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8³⁷. Esta resposta imediata promove uma reacção inflamatória, caracterizada pela presença de células polimorfonucleares, e também promove lesões na mucosa devido à libertação de citocinas, de espécies reactivas de oxigénio e de óxido nítrico³⁷.

A colonização da mucosa gástrica por *H. pylori* é acompanhada por uma reacção imunológica local e sistémica, simultaneamente humoral e celular. *H. pylori* induz tanto a resposta imune humoral como a celular, que incluem a produção de anticorpos do tipo IgA, IgG e IgM^{36,140}.

A gastrite crónica activa está associada a um aumento da proporção das células T CD4/CD8 na mucosa gástrica, devido à acumulação de linfócitos T auxiliares CD4⁺¹⁶³. Além disso, os doentes infectados com *H. pylori* têm uma produção elevada de interferão γ (IFN- γ) pelas células T, que é consistente com a resposta do tipo Th1. De facto, na infecção por *H. pylori*, as células T da mucosa produzem níveis abundantes de citocinas pró-inflamatórias Th1: IL-12, IL-18 e TNF- α , e níveis baixos de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10)¹⁶³. Assim, a resposta imunitária à infecção por *H. pylori* contribui para a inflamação crónica e consequentes danos no epitélio gástrico e, ao mesmo tempo, não é completamente protectora, uma vez que a infecção persiste por toda a vida. Uma resposta Th1 mais robusta na mucosa, também tem sido associada com a progressão para uma gastrite atrófica e cancro gástrico⁷¹. Curiosamente, no linfoma MALT, são encontradas mais citocinas Th2⁶⁵.

4. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori*

A infecção por *H. pylori* é uma das infecções crónicas mais difundidas em todo o mundo, atingindo cerca de metade da população mundial²³. O conhecimento actual sugere que a aquisição de *H. pylori* ocorre predominantemente na infância e está bem estabelecido o papel importante do contágio intrafamiliar. Os principais factores que colocam um indivíduo em risco de adquirir uma infecção por *H. pylori* incluem práticas sanitárias inadequadas, classe social baixa e condições de vida com grande densidade populacional. No entanto, outras variáveis, tais como área geográfica e idade estão também significativamente e independentemente associadas a um aumento da prevalência da infecção por *H. pylori*²³.

A prevalência da infecção por *H. pylori* tem uma variação marcada entre países em desenvolvimento e desenvolvidos. Em países em desenvolvimento a taxa de infecção atinge quase 50% das crianças e mais de 90% dos adultos, enquanto nos países industrializados *H. pylori* infecta cerca de 20-50% dos adultos e 10% das crianças e tem vindo a diminuir ao longo do tempo^{16,104}. Em Portugal, a prevalência da infecção por *H. pylori* está mais próxima da situação observada nos países em desenvolvimento, chegando aos 80% na população adulta e variando entre aproximadamente 20% em crianças com idade inferior a 5 anos e 50% em crianças com idades compreendidas entre 10 e 15 anos^{107,124,138}.

Vários estudos sugerem que a transmissão directa pessoa a pessoa é a via mais provável de aquisição da infecção, quer por via oral-oral, gástrica-oral ou fecal-oral^{23,62,84,144,170}. A detecção de DNA de *H. pylori* no vómito, saliva, placa dentária, suco gástrico e fezes^{23,38,78,92} também suporta estas vias de transmissão, embora haja dificuldade em distinguir entre microrganismos viáveis e não viáveis, o que gera uma certa controvérsia na capacidade patogénica da bactéria nestes produtos biológicos. Foram também sugeridas outras vias de transmissão, tais como água e transmissão zoonótica^{17,45,68}. Estudos recentes, têm demonstrado um estilo de vida alternativo de *H. pylori* com a formação de biofilmes, facilitando a sobrevivência da bactéria em situações de stress^{30,153}. Foi sugerido o papel dos biofilmes de *H. pylori* como transmissores ambientais na distribuição de água, pois foi detectado DNA de *H. pylori* na água potável, águas subterrâneas, rios, nos sistemas de distribuição de água e sistemas de águas residuais^{18,24,50,110,168}.

5. DIVERSIDADE GENÉTICA

Os primeiros genomas de *H. pylori* foram sequenciados em 1997 e 1999, sendo, até essa data, a primeira bactéria a ter dois genomas completamente sequenciados e comparados a partir de dois isolados independentes^{4,162}. Hoje em dia, existem 25 genomas completamente sequenciados e anotados^{15,41,55,57,66,81,96,117,160}.

H. pylori exibe uma das maiores variabilidades genômicas conhecidas entre as bactérias, e é tão diversificada que é quase impossível encontrar duas estirpes independentes com perfis genômicos idênticos. Esta diversidade acentuada traduz as alterações genômicas sofridas pela bactéria para uma adaptação constante a um hospedeiro durante toda a vida deste^{53,155}. Além disso, a comparação de genomas de várias estirpes revelou que cerca de 10% dos genes são específicos de estirpe^{4,15,41,55,57,66,81,96,117,160}. Muitos destes genes específicos de estirpe estão localizados em duas regiões denominadas zonas de plasticidade 1 e 2, e alguns deles são transcritos, sugerindo que são funcionais¹¹⁴. As zonas de plasticidade contêm várias sequências de inserção, bem como genes com homologia, ao nível da proteína, com algumas recombinases, integrases e topoisomerases. A sua presença implica eventos de recombinação, incluindo a transposição, promovendo diferenças no conteúdo e em rearranjos genômicos das estirpes. Além destas duas regiões, algumas estirpes de *H. pylori* possuem um ilhéu de patogenicidade *cag* (*cag* PAI), enquanto que outras não⁶⁶.

Existem vários mecanismos responsáveis pela diversidade genética de *H. pylori*, sendo os mais importantes a alta frequência de recombinação e a elevada taxa de mutação. A taxa de recombinação em *H. pylori* é mais elevada que a de qualquer

outro microrganismo caracterizado até à data^{53,155}. A recombinação genética tem um papel importante na adaptação do microrganismo ao seu ambiente. No caso de *H. pylori*, a adaptação ao hospedeiro, durante a infecção de longo termo, parece resultar de uma troca genética entre estirpes em colonização mista^{74,80,85}. *H. pylori* é naturalmente competente, permitindo a entrada de DNA exógeno, cromossomal ou plasmídico, de estirpes de *H. pylori* vizinhas seguida de eventos de recombinação para a integração do DNA estranho no cromossoma⁸⁶. A alta frequência de recombinação e o pequeno tamanho dos fragmentos recombinantes (cerca de 417 pb) resulta em genes com organização em mosaico⁵³. Também já foi descrita a ocorrência de recombinação intragenômica em *H. pylori*, especialmente entre genes da grande família das proteínas da membrana externa (OMPs, *Outer membrane protein*), levando a uma variação na ausência de uma colonização mista^{6,136,151}.

A ocorrência de mutações pontuais é outro mecanismo que gera diversidade genética em *H. pylori*, envolvido por exemplo no desenvolvimento de resistência aos antibióticos¹⁰². É possível que a elevada taxa de mutações em *H. pylori* seja devida a uma relativa deficiência nos sistemas de reparação do DNA, uma vez que muitos destes sistemas parecem estar ausentes neste microrganismo⁸⁶.

Muitos dos genes identificados em *H. pylori* contêm sequências repetidas (repetições homopoliméricas ou dinucleótidos), tais como os genes que codificam OMPs, componentes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeo e sistemas de restrição/modificação^{4,15,41,55,57,66,81,96,117,160,162}. Estas sequências repetidas são locais preferenciais de ocorrência de mutações (*hotspots*) facilmente geradas pelo mecanismo de *slipped strand mispairing* durante a replicação do DNA. Este evento

constitui um mecanismo de regulação da expressão genética, alterando a funcionalidade dos genes ou afectando a actividade do promotor⁶⁹.

6. VARIAÇÃO GEOGRÁFICA

As análises filogenéticas, com base na comparação de sequências de várias categorias de genes de *H. pylori*, mostram que existem alelos distintos de genes em diferentes regiões geográficas. Assumindo que a infecção por *H. pylori* se transmite de pessoa a pessoa, particularmente no seio familiar, é provável que a diversidade geográfica de estirpes de *H. pylori* tenha tido origem numa evolução de tempo durante longos períodos em regiões geográficas diferentes. Pensa-se que os diferentes alelos de *H. pylori*, encontrados em isolados de várias regiões, reflectem tanto a população original, que foi primeiramente introduzida numa área particular, como a selecção antigénica ou variantes funcionais com vantagens de crescimento e persistência numa determinada população hospedeira^{42,156}. Um estudo de sequências de genes *housekeeping* e de genes associados à virulência de estirpes de *H. pylori* isoladas de diferentes regiões geográficas, mostrou que as estirpes da Ásia Oriental formavam um *cluster*, o mesmo se observando para as estirpes Africanas, enquanto as estirpes originárias da Europa, América e Austrália formavam um terceiro grupo mais heterogéneo¹.

Um outro estudo que incluiu mais de 500 estirpes de *H. pylori* isoladas dos cinco continentes, mostrou igualmente que os subtipos genéticos baseados na diversidade dos genes associados à virulência formavam *clusters* de acordo com a origem geográfica. Este estudo mostrou também um parentesco genético entre estirpes

isoladas de Ameríndios, população Índia da América do Sul, e estirpes isoladas de Espanhóis. Esta relação levou à sugestão de que os conquistadores Espanhóis, cerca de 500 anos atrás, trouxeram estirpes Europeias para a América do Sul⁸². A influência Europeia é também suportada por outros estudos, que demonstram a formação de *clusters* genómicos das sequências dos alelos do gene da adesina *babA* de estirpes isoladas de Espanhóis e Ameríndios do Perú⁸. No entanto, outro estudo mostrou que estirpes isoladas de Ameríndios da Amazônia Venezuelana tinham influência genética da Ásia Oriental. A acumulação de mutações nos “alelos Asiáticos” sugerem que *H. pylori* acompanhou o Homem quando os ancestrais dos actuais Ameríndios da América do Sul migraram da Ásia há mais de 11,000 anos atrás⁶¹. Da mesma maneira, outros autores utilizaram as subdivisões geográficas das estirpes de *H. pylori* para traçar ambas as migrações modernas e dos ancestrais do Homem. Baseados na reconstrução da história de *H. pylori*, sugeriram que as rotas de migração do Homem são complexas e que a infecção por *H. pylori* foi introduzida nas Américas pelas migrações da Ásia dos ancestrais do Homem e pelas migrações modernas da África e da Europa⁵⁴. No entanto, a origem das estirpes de *H. pylori* dos Ameríndios da América do Sul ainda é controversa¹⁷¹.

Apesar da frequente taxa de recombinação, as espécies de *H. pylori* podem ser divididas em seis populações com distribuições geográficas distintas, baseadas nas diferenças de sequências de sete genes *housekeeping* (Figura 3). Estas populações são designadas por *hpEurope*, que é comum na Europa e em países colonizados por Europeus; *hpAfrica1*, composta pelas subpopulações *hspWAfrica* (África Ocidental, África do Sul e Américas) e *hspSAfrica* (África do Sul); *hpEastAsian*, constituída pelas subpopulações *hspMaori* (Polinésios, Melanésios e Nativos

Tailandeses), *hspAmerind* (Índios Americanos) e *hspEAsia* (Ásia Oriental); *hpNEAfrica* (África do Norte); *hpAfrica2*, que representa uma população da África do Sul muito distinta; e *hpAsia2*, que está localizada na Ásia do Sul e Central^{91,157}. Mais recentemente, foi identificada a população *hpSahul* que é específica de Aborígenes da Austrália e de povos de tribos da Nova Guiné^{108,175}. Estas populações modernas são o resultado de dezenas de milhares de anos de vivência entre o Homem e *H. pylori*, em conjunto com a migração das populações, o isolamento geográfico e a recombinação inter-estirpes^{9,91,157}.

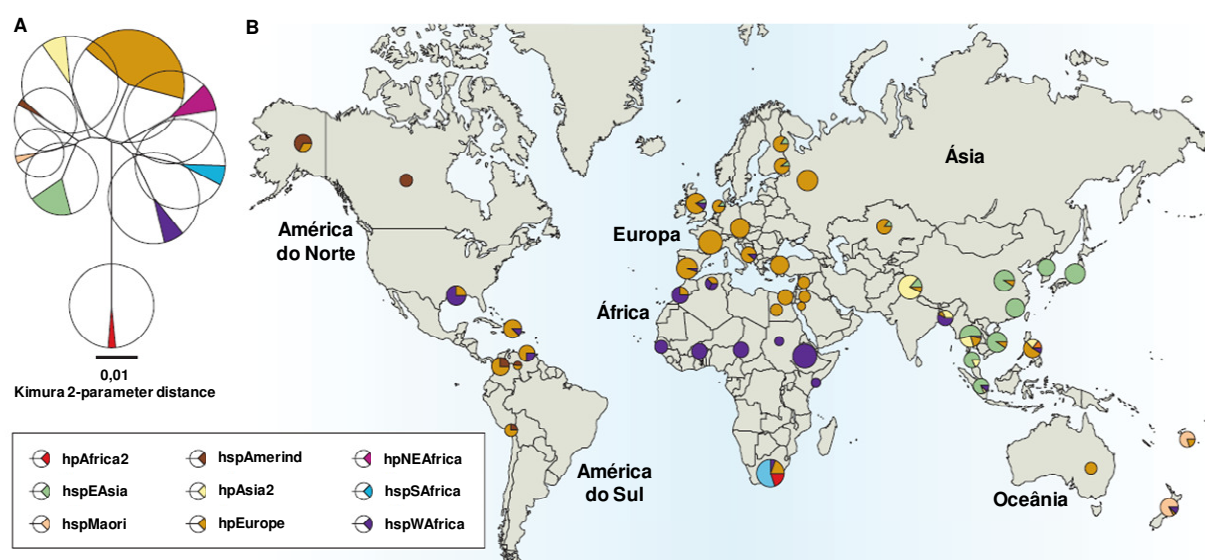


Figura 3: Populações de *Helicobacter pylori* e a sua distribuição em todo o mundo. A, Árvore filogenética das populações e subpopulações de *Helicobacter pylori*, os diâmetros dos círculos representam a diversidade genética dentro de cada população e os ângulos dos arcos preenchidos são proporcionais ao número de isolados. B, Distribuição de nove populações e subpopulações entre 769 estirpes estudadas. (Adaptado de ^{91,157}.)

Todos estes estudos mostram que as estirpes de *H. pylori* de diferentes regiões geográficas apresentam características diferentes e únicas, que levam à sua diferenciação filogenética de acordo com o seu historial genético, no entanto, a data da associação entre esta bactéria e o Homem é um assunto ainda por elucidar. Recentemente, foi demonstrado que em paralelo com o Homem, a infecção por *H. pylori* disseminou-se do Este Africano há cerca de 58,000 anos atrás. Estes resultados mostram que o Homem anatomicamente moderno já se encontrava infectado com *H. pylori* antes das migrações de África e demonstram que desde então *H. pylori* tem permanecido intimamente associada às populações hospedeiras⁹¹.

7. VIRULÊNCIA DE *Helicobacter pylori*

H. pylori infecta cronicamente a mucosa gástrica humana e esta cronicidade vai contribuir para o desenvolvimento da doença. Portanto, os factores que contribuem para colonização e persistência da bactéria estão inerentemente relacionados com a virulência de *H. pylori*. Após a entrada na mucosa gástrica, *H. pylori* tem que sobreviver no meio ácido e atravessar a camada de muco para alcançar o seu nicho ecológico, as células epiteliais gástricas. A resistência ao ácido, a quimiotaxia, a motilidade e a adesão são assim processos fundamentais para a colonização das células epiteliais gástricas. Neste contexto, a enzima urease, envolvida na resistência ao ácido, os flagelos, que conferem motilidade à bactéria, e as adesinas que permitem à bactéria aderir às células alvo podem ser considerados factores ubiqüitários na persistência da infecção, e importantes na virulência²⁹.

7.1. Factores de Virulência

Os principais marcadores de virulência de *H. pylori* incluem, até à data, o ilhéu de patogenicidade *cag*, a citocina vacuolizante VacA e algumas proteínas da membrana externa (*babA*, *sabA*, etc.)

7.1.1. Ilhéu de Patogenicidade *cag*

O ilhéu de patogenicidade *cag* (*cag* PAI) é uma região de ~40 kb que contém 31 genes que codificam uma série de proteínas implicadas na virulência das estirpes de *H. pylori*²⁷. O conteúdo em G+C do *cag* PAI (35%) difere do resto do genoma de *H. pylori* (39%), sugerindo que foi adquirido horizontalmente^{1,4}. Este ilhéu de patogenicidade está integrado no gene da glutamato racemase e flanqueado por sequências repetidas de 31 pb²⁷. O ilhéu *cag* PAI pode ser encontrado como uma unidade não interrompida ou dividida em duas unidades quer por uma sequência de inserção IS605 ou por um grande fragmento de DNA cromossomal, e em alguns casos, está total ou parcialmente suprimido^{13,27,94}. Nesta região está localizado o gene *cagA*, que codifica para a proteína CagA, que é normalmente usado como marcador do ilhéu de patogenicidade completo, apesar de a sua presença não indicar um ilhéu funcional^{73,146}. Este gene está presente em 50-70% das estirpes isoladas em países Ocidentais e em 90% das estirpes isoladas na Ásia Oriental, e foi estatisticamente associado com a úlcera duodenal e o cancro gástrico^{67,93,113,126,130,131,165}.

Além da proteína CagA, o ilhéu de patogenicidade codifica para componentes do sistema de secreção do tipo IV (SST4) envolvidos na injeção de moléculas

bacterianas, como a própria proteína CagA e o peptidoglicano, para o interior das células do hospedeiro^{7,28,31,56,149} (Figura 5). Através deste sistema, a proteína CagA é translocada para o interior das células gástricas humanas onde sofre fosforilação dos resíduos de tirosina, em sequências repetidas específicas (motivos EPIYA), por cinases do hospedeiro^{115,143,154}. A proteína CagA fosforilada vai interagir com uma série de moléculas envolvidas nas vias de sinalização das células do hospedeiro, como a tirosina fosfatase SHP-2, resultando em alterações morfológicas nas células epiteliais e proliferação celular^{70,150,176}. A interacção entre o SST4 e a célula hospedeira resulta também na indução de citocinas pro-inflamatórias na mucosa gástrica^{105,109,149}. A interleucina-8 (IL-8) é a principal citocina envolvida na resposta inflamatória, sendo responsável pela infiltração de neutrófilos no local de infecção^{21,37}. A secreção de IL-8 induzida pela bactéria *H. pylori* é dependente da activação do factor nuclear kB (NF-kB), um factor de transcrição localizado no citoplasma, e de moléculas de sinalização celular, a cinase MAP (*Mitogen Activated Protein*) e a proteína activadora 1. Além da proteína CagA, o SST4 também injecta componentes do peptidoglicano de *H. pylori* nas células hospedeiras através de vesículas na membrana externa, onde são reconhecidos pelo receptor NOD1 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 1*)^{109,166} (Figura 5).

Os níveis de IL-8 estão relacionados directamente com a severidade da gastrite. Assim, a presença do *cag* PAI funcional nas estirpes de *H. pylori* aumenta a expressão *in vivo* de IL-8 na mucosa e este incremento está directamente relacionado com uma resposta inflamatória mais severa induzida por estas estirpes, resultando num quadro clínico mais grave (doença ulcerosa péptica)¹³³.

7.1.2. *VacA*

O gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin*) de *H. pylori* que codifica para a proteína VacA, uma citotoxina vacuolizante, é considerado um importante factor de virulência em *H. pylori*, sendo mais prevalente nas estirpes isoladas de úlcera péptica e carcinoma gástrico³⁵.

A citotoxina (protoxina) apresenta um peso molecular de 88kDa e é constituída por dois domínios, p33 e p55, que são clivados após a secreção da toxina pela bactéria¹⁵⁹ (Figura 4). O domínio p55 medeia a ligação às células do hospedeiro, enquanto o domínio p33, em conjunto com o terminal-N do domínio p55, é responsável pela vacuolização quando expresso no citoplasma das células³⁹. A toxina pode formar oligómeros que em condições ácidas são reduzidos a monómeros, permitindo que a toxina seja inserida nas camadas lipídicas formando canais iónicos^{34,158}. Vários efeitos celulares têm sido descritos para a proteína VacA, quer nas células epiteliais e quer em células do sistema imunitário³² (Figura 5).

O gene *vacA* está presente em todas as estirpes de *H. pylori* embora apresente diferentes níveis de expressão e toxicidade³³. Apresenta uma estrutura em mosaico, resultante da diversidade alélica observada em três regiões distintas do gene: a região sinal (s) (alelos do tipo s1a, s1b, s1c ou s2), a região média (m) (alelos do tipo m1 ou m2), e uma região intermédia (i) (alelos do tipo i1 ou i2)^{10,141} (Figura 4). As estirpes com o alelo s1 produzem uma citotoxina completamente activa enquanto as estirpes com o alelo s2 produzem a toxina não activa devido à presença de uma extensão hidrofílica no terminal-N que bloqueia as actividades de vacuolização e formação de poros⁹⁰ (Figura 5). A região média do gene *vacA* está envolvida na

ligação às células alvo, e as estirpes do alelo m2 têm acção vacuolizante em menos tipos linhas celulares comparando com as estirpes do alelo m1¹²⁹. As estirpes que possuem o gene *vacA* do tipo s1/m1 têm revelado uma acção citotóxica reforçada quando comparadas com os tipos s1/m2 e s2/m2, e estão epidemiologicamente associadas à doença ulcerosa péptica e ao carcinoma gástrico^{11,165}. A região intermédia do gene foi também relacionada como sendo um determinante importante na acção citotóxica de *H. pylori*¹⁴¹. As estirpes do tipo i1 têm uma acção vacuolizante enquanto que as do tipo i2 não¹⁶⁹.

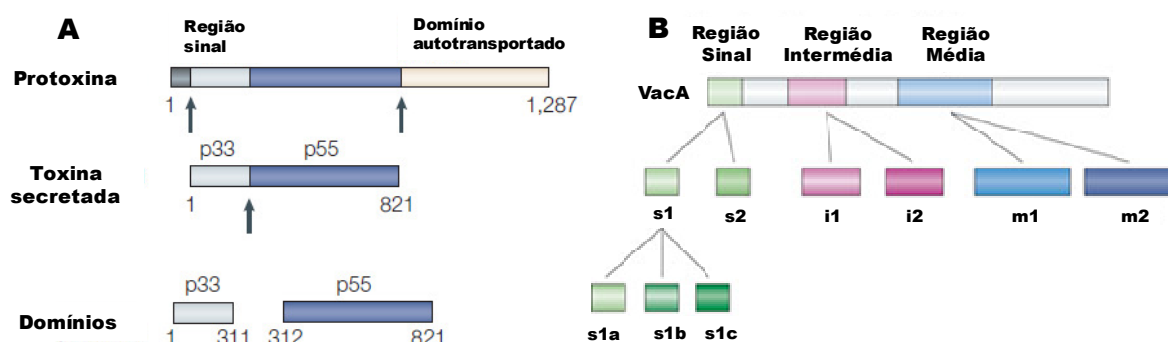


Figura 4 : Estrutura e diversidade alélica do gene *vacA* de *Helicobacter pylori*: estrutura da citotoxina VacA (A); mosaicismo do gene *vacA*. (B) (Adaptado de^{32,134}.)

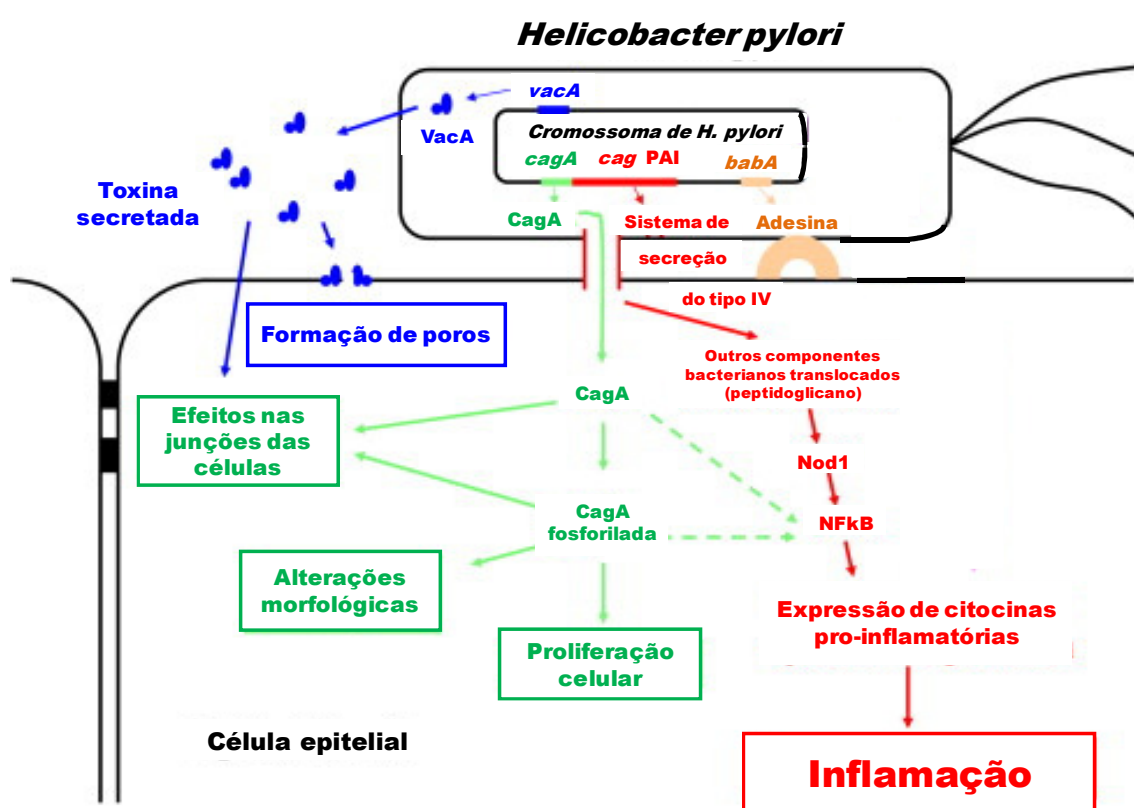


Figura 5: Caracterização de factores de virulência de *Helicobacter pylori* e os seus principais efeitos nas células hospedeiras. (Adaptado de ¹⁴².)

7.2. Proteínas da membrana externa

As proteínas de superfície bacterianas medeiam interações importantes entre o patógeno e o hospedeiro e são essenciais para a colonização, adesão, sobrevivência e virulência dos patógenos. Podem estar envolvidas no transporte de moléculas através da membrana bacteriana, na aderência ao tecido do hospedeiro, e no escape à resposta imunitária do hospedeiro³.

A análise das sequências do genoma das estirpes de referência 26695 e J99 revelou a presença de uma grande família de genes que codificam para proteínas da

membrana externa (OMPs, *Outer Membrane Proteins*) de *H. pylori* que representam cerca de 4% das regiões codificantes de cada estirpe^{4,162}. Foram identificadas cinco famílias de genes parólogos de OMPs, contendo entre 3 e 33 membros que variam em tamanho entre 27 e 135kDa (família 1, Hop e Hor; família 2, Hof; família 3, Hom; família 4, FecA e Frp; família 5, Hef)³ (Figura 6).

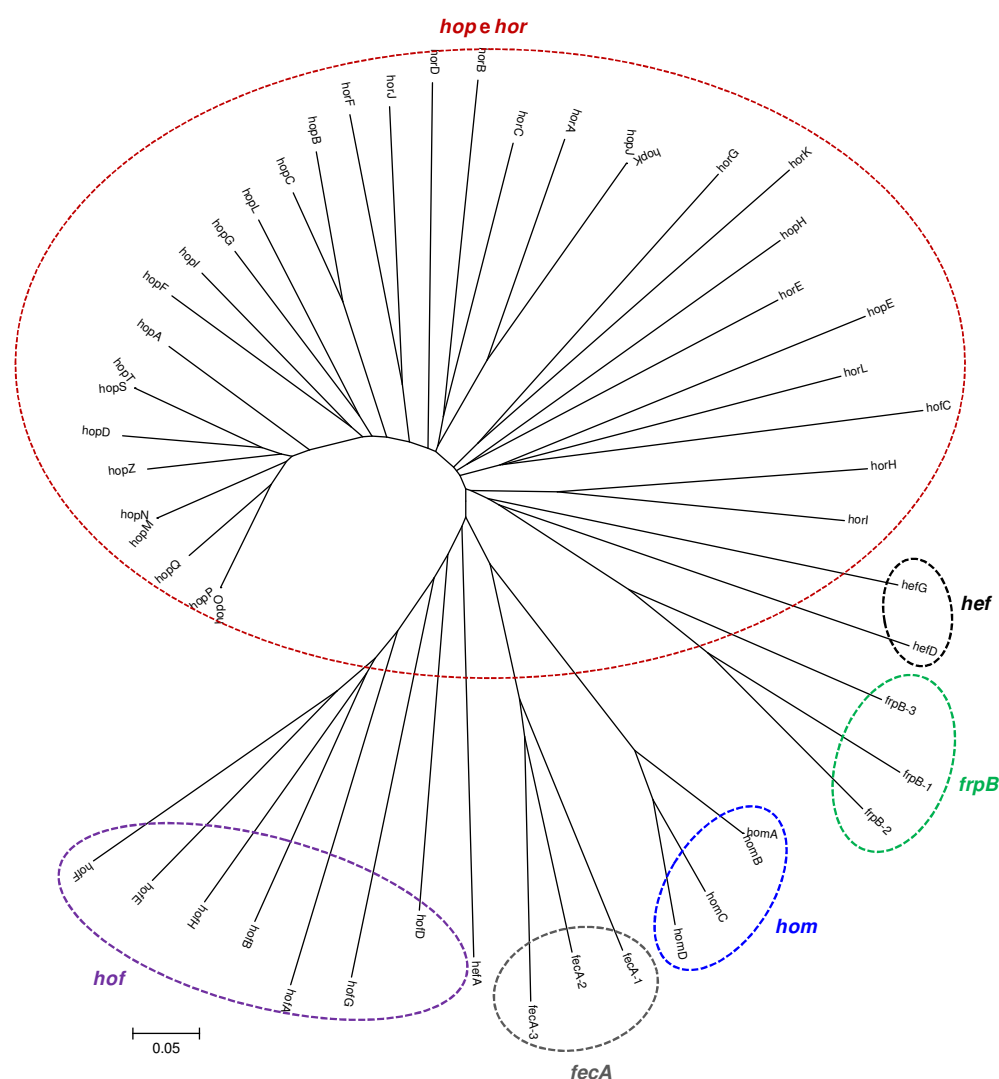


Figura 6: Análise filogenética das cinco famílias de parólogos da estirpe de referência J99. As sequências foram obtidas da base de dados NCBI e a árvore filogenética foi criada pelo programa *MEGASoftware* 4.0.2 utilizando o teste de

filogenia *Bootstrap Neighbor Joining Tree* com 1000 réplicas e modelo *Kimura 2-parameter*. O valor do índice de comprimento dos ramos está representado na árvore.

Dentro da grande família das OMPs de *H. pylori* (família 1), existem 21 membros que contêm os terminais N e C conservados e são denominados por proteínas Hop. Os outros 11 membros não contêm o terminal-N e, portanto, constituem a sub-família chamada Hor³. Na família 1, as regiões altamente conservadas podem ter estruturas e funções similares, tais como a integração das proteínas na membrana externa ou interações proteína-proteína com outros membros da família. Por outro lado, a sequência do domínio variável que difere entre os membros da família das OMPs pode codificar funções únicas, como a capacidade de agir como adesinas ou porinas³. Alguns membros da grande família, HopA a HopE, apresentam homologia na sequência do terminal-N e foi demonstrado que funcionam como porinas⁵¹, e dois destes membros, HopB (AlpB) e HopC (AlpA), estão também envolvidos na adesão às células epiteliais gástricas¹¹⁶. Outras OMPs foram também identificadas como adesinas BabA (HopS), SabA (HopP), HopZ e OipA (HopH)^{46,72,95,132}.

A família 2, família Hof, contém oito membros exibindo um elevado nível de similaridade nos aminoácidos (> 95%)³. Ainda não é conhecida nenhuma função dos membros desta família.

Na família 3, família Hom, existem três membros na estirpe de 26695 (HomA, HomC e HomD), enquanto a estirpe J99 contém um membro adicional, HomB.

Todos estes membros apresentam os terminais C e N conservados, enquanto que o domínio central da molécula tem uma variabilidade significativa. O membro específico da estirpe J99 desta família de parólogos, JHP870 (HomB), é 90% idêntico a JHP649 (HomA), onde todas as diferenças se restringem ao domínio central (resíduos 147-344), sugerindo que a presença do gene *homB* pode ter resultado de uma duplicação do gene relativamente recente. O *locus* ocupado pelo gene *homB* no genoma da estirpe J99 é ocupado por uma região intergénica no genoma da estirpe 26695, sendo os genes flanqueantes ortólogos. Curiosamente, a região intergénica contém uma zona de 219 nucleótidos que é 96,8% semelhante ao gene *jhp0870*. A presença deste fragmento de DNA na estirpe 26695, nesta localização genómica, sugere que o ortólogo do gene *jhp0870* já terá existido nesta estirpe³. Estudos recentes sugerem que o gene *homB* constitui um novo factor de virulência de *H. pylori*, dado à sua associação com a doença ulcerosa péptica, enquanto que o gene *homA*, foi correlacionado com a gastrite não ulcerosa^{118,121,123}. No entanto, outro estudo sugere que o genótipo *homB* pode constituir um marcador para distinguir o cancro gástrico da úlcera duodenal⁷⁷. Foi também demonstrado que a proteína HomB é antigénica e está implicada na activação da secreção de IL-8 *in vitro*. Ensaio de adesão *in vitro* sugerem também que a proteína HomB está envolvida na adesão de *H. pylori* às células epiteliais gástricas¹¹⁸. Os genes *homC* e *homD* ainda não foram alvo de estudo.

A quarta família (FecA e FrpB) mostra homologia com OMPs de outras bactérias envolvidas na regulação do ferro, e inclui duas subfamílias com três membros cada, as proteínas FecA-like e as proteínas FrpB-like, devido à sua semelhança com o

receptor de citrato férrico de *Escherichia coli* e com a principal OMP reguladora de ferro nas espécies de *Neisseria*, respectivamente³.

Ambas as estirpes 26695 e J99, contêm três membros HefA, HefD e HefG, homólogos a genes que codificam para sistemas de efluxo, que pertencem à família 5 e são altamente conservados, partilhando uma identidade ao nível da proteína superior a 92%^{3,19}.

As OMPs das bactérias Gram negativas medeiam a interação com o ambiente circundante. Assim, a variabilidade na expressão destas proteínas que conduzam a alterações na composição das proteínas ao nível da membrana externa da bactéria pode desempenhar um papel na colonização e persistência da infecção por *H. pylori* e, por consequência, na gravidade da doença associada. Têm sido identificados em *H. pylori* vários mecanismos para gerar diversidade ao nível da expressão das OMPs, que incluem: duplicação de genes, regulação por variação de fase, diversidade alélica e presença de genes específicos de estirpe que codificam para OMPs.

7.2.1. Duplicação de genes

A análise das sequências de diversas OMPs revelou que alguns genes *hop* apresentam duas cópias no mesmo genoma. Ambas as estirpes de referência 26695 e J99 contêm três pares de genes *hop* duplicados: *hopJ/hopK*, *hopM/hopN* e *hopS (babA)/hopT (babB)*, que também estão presentes na grande maioria das estirpes clínicas^{3,72}. A presença de genes *hop* duplicados pode indicar processos evolutivos em curso onde os genes duplicam, por recombinação intragenómica, e

que depois acumulam mutações para divergirem gradualmente em genes que codificam novas proteínas Hop funcionalmente distintas. Este processo é provavelmente similar ao processo que gerou a família Hop inteira. Além disso, foi sugerido que a duplicação de genes *hop* representa uma forma de regulação da expressão de proteínas para a adaptação às mudanças na inflamação e na resposta do hospedeiro^{3,151}.

A família *hom* também é constituída por um par de duplicados, os genes *homA* e *homB*, e a análise de sequências destes genes mostrou que podem estar presentes em cópia única ou duas cópias no mesmo genoma. Foi também mostrada diversidade ao nível da localização genómica e do número de cópias destes genes, entre estirpes de origem Ocidental e Oriental, sugerindo uma adaptação ao hospedeiro com características diferentes de genética populacional. E ainda a observação de duas cópias do gene *homB* no mesmo genoma foi mais prevalente em estirpes isoladas de doentes com úlcera péptica do que com gastrite, sugerindo que a duplicação não é um fenómeno aleatório mas uma vantagem biológica, podendo facilitar a expressão elevada de uma proteína particular para a adaptação ao hospedeiro¹¹⁸.

7.2.2. Regulação por variação de fase

Alguns dos genes *hop*, tais como, *babB*, *sabA*, *sabB*, *hopZ* e *oipA*, contêm repetições de dinucleótidos CT na região 5' e são possivelmente regulados por variação de fase^{14,95,132,173}. Durante a replicação do DNA, na zona das repetições pode ocorrer um *mispairing* das bases complementares, o que leva a uma

“derrapagem” da polimerase na cadeia resultando na adição ou deleção de unidades de CT. A mudança do número de repetições pode resultar na adição ou remoção prematura de codões STOP, e, portanto, na mudança de fase *on/off* alterando a expressão da proteína⁶⁹. A geração de diversidade por variação de fase na estrutura à superfície da membrana é uma característica comum em várias espécies bacterianas e tem mostrado contribuir para a variação antigénica e virulência durante a infecção¹⁶⁴.

7.2.3. Variação alélica

Vários genes de *H. pylori* que codificam para OMPs apresentam variação alélica, como é o caso de *babA*, *babB*, *hopQ*, *hopZ*, *homA* e *homB*^{25,120,132,137}. Em todos estes casos, é observado um perfil conservado de segmentação do gene, com a região variável localizada na região média do gene, e com a existência de pelo menos duas variantes alélicas altamente conservadas. Por exemplo, duas famílias distintas de alelos do gene *hopQ* foram encontradas e designadas por tipo I ou tipo II. O alelo *hopQ* tipo I é significativamente mais frequente nas estirpes com genótipo virulento (*cag* PAI+/*vacAs1*) isoladas de doentes com úlcera do que nas estirpes *cag* PAI-/*vacAs2* isoladas de doentes sem doença ulcerosa, embora a função específica da proteína HopQ seja desconhecida. Com base nesses resultados, os alelos *hopQ* podem ser indicadores úteis para identificar estirpes de *H. pylori* ulcerogénicas²⁵. No caso dos genes *babA* e *babB*, foram descritas cinco e três variantes alélicas diferentes, respectivamente, no entanto, nenhuma destas

variantes foi relacionada com o genótipo virulento ou com a capacidade da estirpe para se ligar ao seu receptor específico¹³⁷.

Do mesmo modo, também para os genes *homA* e *homB* foram descritas cinco e três variantes alélicas, respectivamente, não havendo, no entanto, associação com a função putativa destas proteínas. Pode assim especular-se que a variação alélica nestas OMPs pode contribuir para a diversidade antigénica¹²⁰.

7.2.4. Presença de genes específicos de estirpe que codificam para proteínas da membrana externa

Algumas estirpes de *H. pylori* contêm genes específicos de estirpe que codificam para OMPs, tais como, *hopU* e *homB*, fenómeno esse que pode reflectir uma vantagem adaptativa durante a evolução da interação entre o patogénio e hospedeiro³.

7.3. Adesão de *Helicobacter pylori* às células epiteliais gástricas

No estômago humano, a grande maioria da população bacteriana de *H. pylori* é encontrada na camada de muco, que protege as células epiteliais da acidez do lúmen do estômago. Apenas uma parte desta população é encontrada aderida à superfície das células epiteliais. Contudo, a adesão ao epitélio gástrico é considerado um factor importante na capacidade de *H. pylori* colonizar e causar doença. A ligação às células hospedeiras facilita: 1) a colonização, impedindo que as bactérias sejam eliminadas do estômago pelos movimentos gástricos

peristálticos, 2) a injeção eficiente de proteínas tóxicas da bactéria para a célula hospedeira, tais como CagA e VacA, e 3) o ganho de nutrientes que são libertados das células que são danificadas pela inflamação. Assim, as bactérias com melhores propriedades de aderência conseguem colonizar o hospedeiro com densidades populacionais mais elevadas. No entanto, a adesão pode ser perigosa para *H. pylori*, uma vez que também estimula a resposta imunitária do hospedeiro e expõe a bactéria a níveis elevados de compostos bactericidas^{139,172}. Assim, a regulação da adesão à célula hospedeira é necessária para a sobrevivência de *H. pylori* na mucosa gástrica.

H. pylori expressa múltiplas adesinas diferentes, no entanto, até à data, as adesinas melhores caracterizadas de *H. pylori* são a adesina *babA* (*Blood group Antigen-Binding Adesin*) (Figura 5), que medeia a ligação aos antígenos do grupo sanguíneo, nomeadamente os antígenos ABO e *Lewis*^b, e a adesina *sabA* (*Sialic Acid-Binding Adhesin*), que se liga às glicoproteínas sialil-*Lewis*^x e sialil-*Lewis*^y, que constituem receptores das células da mucosa do hospedeiro durante a inflamação^{72,95}.

7.3.1. *babA*

Vários estudos sugerem que a adesão de *H. pylori* ao epitélio gástrico humano é mediada por ligação de BabA aos antígenos do grupo sanguíneo, mais especificamente, dos tipos H1 e *Lewis*^b^{22,52}. Os indivíduos com grupos sanguíneos A e B têm menos antígenos do tipo *Lewis*^b disponíveis que os indivíduos com grupo sanguíneo O, o que pode explicar a razão pela qual os indivíduos com grupo

sanguíneo O são mais susceptíveis ao desenvolvimento de úlcera péptica que os indivíduos com grupos sanguíneos A e B²².

A análise do gene *babA*, mostrou a presença de duas variantes alélicas, alelos *babA1* e *babA2*, que são idênticas excepto numa inserção de 10 pb, que codifica um codão de iniciação da tradução, e que está presente no alelo *babA2* e ausente no *babA1*. A deleção do alelo *babA2* resulta numa perda de capacidade de ligação aos antígenos de *Lewis*^b, enquanto que a deleção do alelo *babA1* não tem qualquer efeito. Este resultado sugere que o alelo *babA2* codifica a capacidade de adesão aos antígenos de *Lewis*^b ⁷². Vários estudos indicam que o alelo *babA2* tem relevância clínica, devido à sua associação com a úlcera péptica e com o desenvolvimento de cancro gástrico^{60,122,125,126}.

A comparação de sequências mostrou que o gene *babA* (*hopS*) tem um gene com 88% de similaridade, denominado por *babB* (*hopT*)³. A elevada similaridade entre estes e outros membros da família das OMPs de *H. pylori* pode torná-los sujeitos a recombinação homóloga. Na verdade, foi demonstrado em estirpes isoladas de doentes dos EUA e do Japão, a presença de sequências quimeras *babA/babB* em fase de leitura, sugerindo a ocorrência de fenómenos de recombinação entre estes dois *loci*¹³⁶. Recentemente, foi mostrada que a perda de expressão do gene *babA* pode ocorrer ou por eventos de recombinação, em que o gene *babA* estava ausente e substituído por uma segunda cópia do gene *babB*, ou por uma alteração no número de repetições CT na região 5' do gene *babA*, resultando numa variação de fase ou numa perda expressão do gene. A ausência do gene *babA* e a duplicação de *babB* foi também observada em estirpes clínicas de *H. pylori*. Conjuntamente, estes resultados sugerem que os mecanismos de variação de fase *on/off* e

duplicação de genes por eventos de recombinação entre os genes *babA* e *babB*, fornecem à bactéria a capacidade de alternar entre os fenótipos aderente e não-aderente, a fim de se adaptar às mudanças na resposta inflamatória e imunitária do hospedeiro¹⁵¹.

7.3.2. *sabA*

A segunda adesina de *H. pylori* melhor caracterizada é *sabA* que medeia a ligação aos antigénios associados à inflamação, sialil-Lewis^x e sialil-Lewis^y⁹⁵. Na verdade, a inflamação do tecido gástrico e as alterações malignas promovem a síntese de glicoconjugados sialisados, que são raras no estômago de indivíduos saudáveis^{95,145}. Deste modo, foram encontrados níveis elevados de glicoconjugados sialisados em doentes infectados por *H. pylori*, que diminuíram após a erradicação da infecção e tratamento da gastrite. Portanto, um carboidrato sialisado que é usado para sinalizar a infecção e a inflamação e para orientar as respostas de defesa imunitária, é também usado como um receptor na adesão do patógeno¹²⁸.

Nas estirpes de referência 26695 e J99, o gene *sabA* apresenta homologia com com o gene *sabB* (*hopO*), para o qual ainda não foi atribuída nenhuma função^{3,95}. Ambos os genes *sabA* e *sabB* contêm repetições de dinucleótidos CT na região 5' e que pode ser regulada por variação de fase⁹⁵. Este facto reforça a hipótese das propriedades flexíveis de aderência de *H. pylori*, em resposta às mudanças ambientais. Foi avaliado o *status* funcional dos genes *sabA* e *sabB* como marcadores putativos da doença gástrica, e o *status* “off” de ambos os genes foi associado à úlcera péptica em diversas populações^{40,174}. Uma explicação para isto

pode ser o facto de as bactérias sofrerem variação de fase e mudar para o *status* "off" nos locais de inflamação vigorosa, não havendo ligação aos antigénios sialil-Lewis^x, a fim de escaparem às células de defesa imunitária. Por outro lado, o *status* "on" do gene *sabA* foi associado ao cancro gástrico e à metaplasia intestinal, sugerindo que pode haver uma relação entre o gene *sabA* e os receptores expressos por este estado do epitélio alterado¹⁷⁴.

Capítulo II: Objectivos

A infecção por *H. pylori* é uma das infecções crónicas mais difundidas em todo o mundo, atingindo cerca de metade da população mundial²³. Embora na maioria dos casos a infecção seja assintomática, a sua associação etiológica com a gastrite, úlcera péptica (gástrica e duodenal) e carcinoma gástrico está bem documentada e é universalmente aceite^{12,21,43,101}.

Diferentes factores, inerentes ao hospedeiro, ao ambiente e à própria bactéria actuam no determinismo da patogénese gastroduodenal. As proteínas de superfície, nomeadamente as OMPs, estão envolvidas na relação entre *H. pylori* e a mucosa gástrica humana, contribuindo para a colonização e persistência da infecção. Diversas OMPs de *H. pylori* foram já estudadas, tendo sido identificadas como envolvidas na adesão da bactéria às células epiteliais gástricas, funcionando como porinas, ou ainda estando implicadas na variabilidade antigénica^{46,51,72,95,116,118,120,132}.

Os genes *homC* e *homD*, pertencentes à família *hom*³, codificam para OMPs e constituem objecto de estudo do presente trabalho. Este trabalho teve como objectivo o estudo da diversidade e evolução destes genes, e o esclarecimento do seu papel na virulência de *H. pylori*. Para tal foi realizada a avaliação da variabilidade genética dos genes *homC* e *homD*, bem como a análise filogenética e evolutiva destes genes, numa amostra de estirpes clínicas de *H. pylori*, isoladas de biopsias gástricas de doentes de diferentes regiões geográficas apresentando diversas patologias gástricas, nomeadamente, gastrite, úlcera péptica e cancro gástrico. Foram também avaliadas as propriedades antigénicas das proteínas HomC

e HomD, a sua contribuição para as características pro-inflamatórias de *H. pylori* bem como o seu envolvimento na adesão de *H. pylori* à mucosa gástrica.

Capítulo III: Materiais e Métodos

1. ESTIRPES DE *Helicobacter pylori* E MATERIAL GENÓMICO

Foram estudadas 164 estirpes clínicas de *H. pylori* isoladas de biopsias gástricas de doentes de origem Ocidental, Oriental e Africana apresentando patologia gastroduodenal diversa (gastrite, G), doença ulcerosa péptica (UP) gástrica ou duodenal, e cancro gástrico (C)) (Tabela 1). As estirpes de *H. pylori* foram isoladas de doentes de Portugal, França, Alemanha, Suécia, Japão e Coreia do Sul, e pertencem à colecção de estirpes bacterianas da Unidade de *Campylobacter/Helicobacter* do Departamento de Doenças Infecciosas (DDI) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Foi também utilizado o material genómico de estirpes de *H. pylori* do Brasil, Colômbia, Estados Unidos da América (EUA) e Burquina-Faso (gentilmente cedido por Doutor Yoshio Yamaoka, Department of Medicine, Michael E. DeBakey Veterans Affairs Medical Center and Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EUA).

Foram ainda utilizadas três estirpes de referência de *H. pylori*, as estirpes 26695 (ATCC 700392), J99 (ATCC 700824) e HPAG1, cujos genomas já se encontram sequenciados, como controlos das reacções de amplificação^{4,117,162}.

Tabela 1: Distribuição das estirpes clínicas de *Helicobacter pylori* (n=164) em estudo de acordo com a região geográfica, patologia, sexo e idade dos doentes.

Origem	Patologia	Nº de estirpes	Sexo masculino (%)	Média idade ± SD (anos)
Países Ocidentais				
Portugal	G	12	47,3	51,8±15,4
	UP	15		
	C	2		
	Total	29		
Alemanha	G	9	50,0	58,6±11,9
	UP	5		
	Total	14		
Suécia	G	7	58,8	66,6±11,2
	UP	8		
	Total	15		
França	G	1	N.D.	N.D.
	UP	1		
	Total	2		
EUA	G	14	67,9	48,7±12,0
	UP	2		
	Total	16		
Brasil	G	5	52,4	52,8±16,4
	UP	6		
	C	1		
	Total	12		
Colômbia	G	6	57,9	50,0±12,7
	UP	1		
	Total	7		

Continuação tabela 1.

Origem	Patologia	Nº de estirpes	Sexo masculino (%)	Média idade \pm SD (anos)
Países da Ásia Oriental				
Japão	G	10	57,9	44,3 \pm 12,7
	UP	19		
	C	1		
	Total	30		
Coreia do Sul	G	17	76,1	44,7 \pm 9,9
	UP	11		
	C	1		
	Total	29		
País da África Ocidental				
Burquina-Faso	UP	10	N.D.	N.D.

Nº, número;
SD, Desvio padrão;
G, gastrite; UP, úlcera péptica; C, cancro gástrico;
N.D., Não disponível.

1.1. Cultura das estirpes de *Helicobacter pylori*

As estirpes de *H. pylori* conservadas a -80°C em meio TSB com glicerol, foram semeadas em meio HP selectivo e não selectivo (Biogerm, Maia, Portugal), e incubadas a 37°C numa atmosfera de microaerófilia (5% de O₂; 10% de CO₂; 85% de N₂), durante 48 horas. Uma placa de cultura foi utilizada para extracção de DNA e a outra para recongelar a estirpe de modo a repor a colecção de bactérias (Anexo I).

1.2. Extracção de DNA genómico

A extracção de DNA genómico foi realizada utilizando o kit comercial *QIAamp® DNA Mini* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo II).

2. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÓMICA DOS GENES *homC* E *homD* NA AMOSTRA DE ESTIRPES EM ESTUDO

Para o estudo da diversidade genómica dos genes *homC* e *homD*, na amostra em estudo, foram identificados os *loci* de cada gene alvo, por análise dos genomas de estirpes sequenciadas (Tabela 4), e desenhados oligonucleótidos iniciadores (doravante designados por *primers*) nas respectivas regiões genómicas flaqueantes (Tabela 2) e no interior dos genes (Tabela 3). Todos os *primers* descritos neste trabalho foram desenhados com recurso ao software *Web Primer3* (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Procedeu-se depois à amplificação e sequenciação de cada *locus*, pelas técnicas de PCR e sequenciação.

A reacção de amplificação foi realizada num volume final de 25µl contendo: 1µl de DNA, Tampão 1X, 2,8mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), 0,5µM de cada *primer*, 1U de *Bio-X-Act™ Long DNA Polimerase* (Bioline Ltd, Londres, Reino Unido), e água destilada estéril. Em cada ensaio usou-se um controlo negativo constituído por água destilada estéril, e como controlos positivos o DNA de três estirpes de referência 26695, J99 e HPAG1. A reacção de amplificação consistiu num ciclo inicial de 5min a 95°C e 1min a 58°C, seguido de 35 ciclos constituídos por uma extensão de 3min a 68°C, uma

desnaturação a 95°C durante 30s e uma hibridação dos *primers* a 58°C durante 30s, com um ciclo de extensão final de 10min a 68°C, realizada num Termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems Inc., Foster City, EUA).

Tabela 2: *Primers* utilizados para amplificar os *loci homC* e *homD*.

Região Genómica	Primer	Sequência (5' → 3')	Tm (°C)
<i>homC</i>	<i>homCF1</i>	CAAACAATACCGCAATTTCTC	52,7
	<i>homCR1</i>	TCGCATCCCGTTAGATATGG	57,5
<i>homD</i>	<i>homDF1</i>	CTCACCCGCCCTTATGAAAC	60,2
	<i>homDR1</i>	CCCtTAGAAAATCCACCC	54,9

Os produtos de amplificação foram detectados por electroforese em gel de agarose de 1% corado com *GelRed™* (Biotium Inc., Hayward, EUA), em tampão de corrida TBE 0,5X (Anexo III). Os produtos esperados variam entre cerca de 2305 e 2528pb para o *locus homC* e entre 2508 e 2526pb para o *locus homD*. Foi utilizado como marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder* com fragmentos de DNA de 500pb a 12Kb (Invitrogen S.A, Barcelona, Espanha) (Anexo IV).

Os produtos de amplificação foram purificados com o kit *JETQUICK PCR Purification Spin* (Genomed GmbH, Löhne, Alemanha), segundo instruções do fabricante (Anexo V). Estes produtos purificados foram sujeitos a sequenciação enzimática utilizando o *Big Dye® Terminator* (Applied Biosystems Inc.) e o Sequenciador automático *Genetic Analyser Abi-Prism 3130 xl* (Applied Biosystems Inc.). A reacção de sequenciação foi realizada num volume final de 10µl contendo:

2µl de *Big Dye® V1.1* (Applied Biosystems Inc.), 0,5µM de *primer*, 0,5 a 7,5µl de DNA purificado e água destilada estéril. O programa de sequenciação consistiu num ciclo inicial de desnaturação de 30s a 96°C, seguido de 25 ciclos constituídos por uma desnaturação de 10s a 96°C, uma hibridação de 5s a 50°C e uma extensão de 4min a 60°C. Estas reacções foram realizadas num Termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems Inc.). Após a reacção cíclica os produtos foram entregues na Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA para sequenciar.

Tabela 3: *Primers* utilizados para sequenciação dos *loci homC* e *homD*.

Região Genómica	Primer	Sequência (5'→3')	Tm (°C)
<i>homC</i>	homCF1	CAAACAATACCGCAATTTCTC	52,7
	homCF2	GTCAATTTAGGCGTGATAGA	52,1
	homCR2	CCCCTAAAATAGGGCTTCTA	54,8
	homCR1	TCGCATCCCGTTAGATATGG	57,5
<i>homD</i>	homDF1	CTCACCCGCCCTTATGAAAC	60,2
	homDF2	GGGCGTGATAGAGACTATCC	58,1
	homDF3	GCCAATAACGAAAAAATCC	50,3
	homDR3	GGCAGAATGATTTGAGATTG	52,1
	homDR2	CCACCGGTAGGGCGTTTTGA	64,9
	homDR1	CCCTTAGAAAATCCACCC	54,9

As sequências de nucleótidos obtidas foram visualizadas no programa *Chromas LITE* (Version 2.01) e comparadas recorrendo ao programa *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Em seguida, foram traduzidas em

sequências de aminoácidos correspondentes recorrendo ao programa *EMBOSS transeq* (www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/).

3. AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA, ANÁLISE FILOGENÉTICA E DOS PARÂMETROS EVOLUTIVOS DOS GENES *homC* E *homD*

De modo a avaliar a variabilidade genética e os parâmetros filogenéticos e evolutivos, foi realizada uma análise bioinformática das sequências nucleotídicas e respectivas sequências de aminoácidos previstas. Foram também utilizadas as sequências nucleotídicas de 25 estirpes de referência de *H. pylori* cujos genomas já se encontram sequenciados e anotados (tabela 4).

Tabela 4: Características gerais das estirpes de referência de *Helicobacter pylori* totalmente sequenciadas e anotadas (n=25) que foram incluídas no presente estudo.

Estirpe	Nº de acesso de GenBank [#]	Patologia	Origem	População*	Referência
26695	AE000511	G	Reino Unido	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	162
J99	AE001439	UP	EUA	Africano (<i>hpsWAfrica</i>)	4
HPAG1	CP000241	G	Suécia	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	117
Shi470	CP001072	N.D.	Peru	Ameríndio (<i>hpsAmerind</i>)	81
G27	CP001173	N.D.	Itália	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	15
P12	CP001217	UP	Alemanha	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	56
B38	FM991728	MALT	França	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	160
B8	FN598874	UP	EUA	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	55
SJM180	CP002073	G	Peru	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	N.D.
Lithuania75	CP002334	N.D.	Lituânia	Ocidental (<i>hpEurope</i>)	N.D.
51	CP000012	UP	Coreia do Sul	Oriental (<i>hpsEAsia</i>)	N.D.
52	CP001680	UP	Coreia do Sul	Oriental (<i>hpsEAsia</i>)	N.D.
35A	CP002096	UP	Japão	Oriental (<i>hpsEAsia</i>)	N.D.
F16	AP011940	N.D.	Japão	Oriental (<i>hpsEAsia</i>)	66
F30	AP011941	N.D.	Japão	Oriental (<i>hpsEAsia</i>)	66

Continuação Tabela 4.

Estirpe	Nº de acesso de GenBank [#]	Patologia	Origem	População*	Referência
F32	AP011943	N.D.	Japão	Oriental (<i>hpsEAsia</i>)	66
F57	AP011945	N.D.	Japão	Oriental (<i>hpsEAsia</i>)	66
v225d	CP001582	G	Venezuela	Ameríndio (<i>hpsAmerind</i>)	96
Sat464	CP002071	N.D.	Peru	Ameríndio (<i>hpsAmerind</i>)	N.D.
PeCan4	CP002074	C	Peru	Ameríndio (<i>hpsAmerind</i>)	N.D.
Cuz20	CP002076	N.D.	Peru	Ameríndio (<i>hpsAmerind</i>)	N.D.
908	CP002184	UP	França	Africano (<i>hpsWAfrica</i>)	41
Gambia94/24	CP002332	N.D.	Gâmbia	Africano (<i>hpsWAfrica</i>)	N.D.
SouthAfrica7	CP002336	N.D.	África do Sul	(<i>hpsSAfrica</i>)	N.D.
India7	CP002331	N.D.	Índia	(<i>hpAsia2</i>)	N.D.

G, gastrite; UP, úlcera péptica; C, cancro gástrico; MALT, linfoma de *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*;

N.D., Não disponível;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lpoks.cgi>;

* Classificação da população de *H. pylori* segundo a distribuição geográfica das estirpes adaptada de 91,157.

A variabilidade genética foi determinada a partir de gráficos de similaridade, utilizando alinhamentos gerados pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), com recurso à aplicação do programa *SimPlot* 3.5.1 (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRoftware/simplot/>).

A análise da filogenia foi realizada através de árvores filogenéticas criadas pelo programa *MEGASoftware* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) 4.0.2 (<http://www.megasoftware.net/>), a partir de alinhamentos múltiplos das sequências de nucleótidos e respectivas sequências de aminoácidos previstas, obtidos no *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9.

Os parâmetros evolutivos foram determinados recorrendo ao programa *MEGASoftware* 4.0.2, utilizando alinhamentos também gerados no *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9, calculando-se: distância molecular, frequência de substituições sinónimas (Ks), frequência de substituições não-sinónimas (Ka) e razão entre substituições não-sinónimas e substituições sinónimas (Ka/Ks).

4. ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA HomD

Os parâmetros índice de antigenicidade, hidrofiliidade e a probabilidade de exposição à superfície da bactéria foram analisados para as sequências traduzidas da proteína HomD de *H. pylori*, utilizando o programa *Protean software, DNASTAR package* (Version 5.0).

5. ENSAIOS *IN VITRO*

Para avaliar a contribuição das proteínas HomC e HomD para as características pro-inflamatórias de *H. pylori* e o papel destas proteínas na adesão de *H. pylori* à mucosa gástrica foram realizados ensaios de indução da secreção *in vitro* da citocina inflamatória IL-8 e ensaios de aderência *in vitro* utilizando estirpes selvagens e mutantes de *H. pylori* para os genes *homC* e *homD*.

5.1. Construção de estirpes mutantes de *Helicobacter pylori* para os genes *homC* e *homD*

As estirpes mutantes de *H. pylori* para os genes *homC* e *homD* foram construídas pela inserção de uma cassette de Canamicina por transformação natural e recombinação hómologa dupla (Anexo IV). Para cada gene foi utilizado um plasmídeo suicida que contém o gene alvo interrompido por uma cassette de resistência à Canamicina de 1838pb (*homC*: pILL570Hp0373ΔTnKm, *homD*: pILL570Hp1453ΔTnKm) (gentilmente cedidos por Doutor Ivo Boneca, Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, França). Foram utilizadas seis estirpes clínicas de *H. pylori* as quais se demonstrou previamente serem naturalmente transformáveis, através de experiências de transformação natural não letal com o gene *flaA* inactivado com uma cassette de resistência ao Clorofenicol.

A correcta inserção da cassette de Canamicina no genoma das estirpes transformadas foi confirmada por PCR com os *primers* externos localizados nas regiões genómicas conservadas, adjacentes aos genes *homC* e *homD*, e subsequente sequenciação. As condições das reacções de amplificação encontram-se descritas anteriormente (ponto 2) e os *primers* estão descritos nas Tabelas 2, 3 e 5.

Tabela 5: *Primers* utilizados na reacção de amplificação e sequenciação da cassette de resistência à Canamicina.

Região Genómica	Primer	Sequência (5'→ 3')	Tm (°C)
Cassete de Resistência à Canamicina	F1-clone	ACTAATGCTTGAAACCCAG	52,8
	R1-clone	CTCCAATTCACCTGTTCCCTTGC	57,7

Para os ensaios *in vitro* foram utilizados os pares de estirpes de *H. pylori* selvagens e mutantes *homC* e *homD*, e as duas estirpes de referência 26695 (ATCC 700392) e J99 (ATCC 700824). Para ambos os ensaios as estirpes de *H. pylori* selvagens e mutantes foram cultivadas durante 48h e foram ressuspendidas em meio *Brucella*. A suspensão foi testada por microscopia de contraste de fase para verificar a pureza, motilidade e viabilidade das estirpes e foi ajustada para uma densidade óptica a 600nm de 0,6, que corresponde a 3×10^7 UFC/ml.

Estes ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Victor Segalen Bordeaux 2, Unidade INSERM U853, tendo as co-culturas e Citometria de Fluxo sido realizadas nesse laboratório e a quantificação de IL-8 realizada no INSA.

5.2. Ensaio da secreção *in vitro* da citocina pro-inflamatória IL-8

As suspensões bacterianas das estirpes de *H. pylori* foram inoculadas, em triplicado, em células epiteliais gástricas humanas AGS (ATCC CRL-173), com

60-70% de confluência e multiplicidade de infecção (MOI) igual a 100, em meio F-12K (Invitrogen S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen S.A.) e 50µg/ml de Vancomicina (Invitrogen S.A.), durante 18h a 37°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação para quantificar a secreção da citocina IL-8 por ELISA utilizando o kit *Quantikine Human IL-8 Immunoassays* (R&D Systems Europe Ltd, Lille, França), segundo as instruções do fabricante (Anexo VII). Os resultados foram expressos depois de serem deduzidos os valores de secreção basal pela linha celular AGS.

5.3. Ensaio de adesão *in vitro*

As bactérias foram marcadas com fluorescência ao nível da membrana celular, através do kit *PKH2 Green Fluorescent Linker* (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha). Inicialmente, centrifugou-se as suspensões bacterianas a 3000rpm durante 10min e os *pellets* bacterianos obtidos foram ressuspensos em 500µl de diluente A. De seguida, adicionou-se mais 500µl de diluente A com 0,5µl de corante PKH2 e incubou-se à temperatura ambiente durante 2min. A reacção foi parada com a adição de 1ml de soro fetal bovino incubando-se por 2min e depois juntou-se 2ml de meio de cultura celular e incubou-se por mais 2min. Posteriormente, voltou-se a centrifugar a 3000rpm durante 10min e lavaram-se duas vezes os *pellets* obtidos com meio de cultura celular. Por fim, as suspensões bacterianas foram inoculadas, em triplicado, nas células epiteliais gástricas humanas AGS, com 60-70% de confluência e MOI igual a 100, durante 18 horas a 37°C. Depois da co-cultura as células foram lavadas duas vezes com PBS e recuperadas. A fluorescência celular emitida foi quantificada através da técnica de Citometria de Fluxo utilizando o

aparelho *FACSCalibur Flow Cytometer* (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA) e o software *CellQuest*.

6. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIGÉNICAS DE HomC E HomD

De modo a avaliar a antigenicidade das proteínas HomC e HomD foram construídas proteínas recombinantes e o seu carácter antigénico foi determinado pelas técnicas de SDS-PAGE e *Western blot*.

6.1. Construção das proteínas recombinantes HomC e HomD

As ORFs correspondentes aos genes *homC* e *homD* da estirpe de referência 26695 foram amplificadas utilizando *primers* desenhados no início e fim dos genes e que incluem os locais de restrição das enzimas *Sall* e *NotI* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) (Tabela 6), utilizando as mesmas condições das reacções de amplificação descritas anteriormente (ver ponto 2). Os fragmentos de PCR obtidos foram clonados no vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Anexo VIII) utilizando o kit *TOPO TA Cloning[®]* (Invitrogen S.A), segundo as indicações do fabricante (Anexo IX). Após a clonagem, foi realizada a extracção de DNA plasmídico utilizando o kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin* (Genomed GmbH), segundo as indicações do fabricante (Anexo X), e a correcta inserção do fragmento foi confirmada por PCR e sequenciação, utilizando os *primers* descritos nas Tabelas 3 e 6.

As proteínas recombinantes HomC e HomD (rHpHomC e rHpHomD, respectivamente), foram preparadas utilizando o vector de fusão Glutathione-S-Transferase (GST) pGEX-4T-3 (GE Healthcare) (Anexo XI). Para cada

gene, foi realizada uma dupla digestão de 3500ng de DNA do TOPO com cada gene clonado e 3000ng de DNA do vector pGEX-4T-3 com as enzimas de restrição *Sall* (GE Healthcare) e *NotI* (GE Healthcare), em duas reacções separadas, a 37°C durante 1h (Anexo XII). As digestões foram sendo controladas em gel de agarose a 0,8% e quando se verificou digestão total, as bandas de interesse foram excisadas do gel e procedeu-se à extracção do DNA utilizando o kit *JETQUICK Gel Extraction Spin* (Genomed GmbH), segundo as indicações do fabricante (Anexo XIII). O fragmento de DNA purificado de cada gene foi ligado ao vector purificado com a enzima T4 DNA Ligase utilizando o kit *Rapid DNA Ligation* (Roche Diagnostics), segundo as instruções do fabricante, e o plasmídeo resultante foi transformado em células de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen S.A) (Anexo XII). Foi realizada uma extracção de DNA plasmídico pelo kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin* (Genomed GmbH), segundo as indicações do fabricante (Anexo X), e a correcta inserção do fragmento foi confirmada por PCR e sequenciação (Tabelas 3 e 6). Por fim, os vectores de expressão com o respectivo fragmento clonado foram transformados em células de *E. coli* BL-21 (Invitrogen S.A) para expressão das respectivas proteínas (Anexo XII).

A partir de uma colónia resultante da transformação foi realizada uma pré-cultura com 6ml de LB líquido suplementado com 50 μ g/ml de Ampicilina (Sigma-Aldrich) a 37°C com agitação durante a noite. Para induzir a expressão das proteínas recombinantes, as células do inóculo anterior foram cultivadas em 250ml de meio LB líquido suplementado com 50 μ g/ml de Ampicilina (Sigma-Aldrich) a 37°C com agitação, até atingirem a fase exponencial de crescimento ($DO_{600nm} = 0,4-0,6$). De seguida, foi adicionado 0,1M de IPTG (Invitrogen S.A) e retirou-se 1000 μ l de cultura

nos pontos de 30min, 1h, 2h e 3h, de forma a confirmar a expressão das proteínas recombinantes. Em paralelo, foi também crescida cultura sem IPTG para controlar a indução. De seguida, procedeu-se à lise directa das amostras. A cultura retirada em cada ponto foi centrifugada a 6000rpm durante 3min, ressuspendida em 25µl de tampão de lise (Tampão da amostra 2X, benzonase 1X (Sigma-Aldrich) e MgCl₂ 0,01M) e deixada 15min à temperatura ambiente. Por fim desnaturaram-se as amostras a 95°C durante 10min e foram guardadas a -20°C até serem utilizadas.

Tabela 6: *Primers* utilizados nas reacções de amplificação e posterior sequenciação dos clones de *E. coli* resultantes.

Região Genómica	Primer	Sequência (5'→3')	Tm (°C)
<i>homC</i>	homCiSall	gtcgacATGCTAAGATTCGTTAGTAAAACG	59,4
	homCfNotI	gcggccgcCTAAAAAATCCACCCGTAATTA	67,1
<i>homD</i>	homDiSall	gtcgacATGTTAAACTCGCTAGCAAAACG	61,8
	homDfNotI	gcggccgcTTAGAAAATCCACCCGTAATTA	66,6
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	M13F ¹	GTAAAACGACGGCCAG	54,3
	M13R ¹	CAGGAAACAGCTATGAC	49,9
pGEX-4T-3	pGEX5' ¹	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	70,0
	pGEX3' ¹	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	69,2

¹ Estes *primers* são fornecidos nos respectivos kits de clonagem.

6.2. SDS-PAGE e *Western blot*

Os lisados proteicos da cultura não induzida e induzida com IPTG, correspondentes às proteínas rHpHomC e rHpHomD, foram posteriormente separados por SDS-PAGE num gel constituído por um *stacking* gel e um gel de separação contendo 4% e 10% de Acrilamida/bis-acrilamida 40% (37,5:1), respectivamente, utilizando-se o tampão de corrida SDS-PAGE 1X. Foi utilizado o marcador de peso molecular *Precision Plus ProteinTM Standards* (com fragmentos de 10 kDa a 250 kDa) (Bio Rad Laboratories Ltd.) (Anexo XV) e a electroforese foi realizada no aparelho *Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis System* (Bio Rad Laboratories Ltd.), com amperagem constante (20mA) durante 1h (Anexo XIV).

Os géis foram preparados em duplicado, tendo um sido corado com solução de azul de Coomassie e o outro utilizado para *Western blot*.

O gel foi corado com solução de azul de Coomassie durante 1h e posteriormente descorou-se com a solução *Destain* durante outra hora. Em paralelo com a coloração com azul de Coomassie, foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF (Bio Rad Laboratories Ltd.), previamente hidratada com metanol e lavada com água destilada, utilizando um *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer cell* (Bio Rad Laboratories Ltd.) a voltagem constante (100V) durante 1h. Foi utilizado o tampão de transferência 1X. No final da corrida, a membrana foi corada com a solução de azul de Coomassie até ao aparecimento das bandas, para verificar se houve transferência, e de seguida foi descorada com a solução *destain* e lavada com TTBS 1X. A membrana foi depois bloqueada com 5% de leite magro em TTBS 1X, durante 1h à temperatura ambiente, lavada três vezes com TTBS 1X

durante 10min cada e por fim foi cortada em tiras de modo a ser incubada com diferentes soros.

As tiras da membrana foram incubadas separadamente com uma *pool* de cinco soros de doentes com um título de IgG anti-*H. pylori* positivo, previamente determinado com um kit comercial *Pyloriset EIA-G III* (Orion Diagnostica, Espoo, Finlândia) e uma *pool* de cinco soros de doentes com um título de IgG anti-*H. pylori* negativo que foi utilizada como controlo negativo. Foi também utilizado um anticorpo anti-GST (GE Healthcare) para confirmar a presença da proteína recombinante.

Duas tiras da membrana foram incubadas separadamente com as *pools* de soros humanos diluídos 1/500 com 5% de leite magro em TTBS 1X, a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas três vezes com TTBS durante 10min cada, e o conjugado formado por anti-IgG humano acoplado com peroxidase (GE Healthcare), diluído 1:5000 em 5% de leite magro em TTBS 1X, foi adicionado com incubação à temperatura ambiente durante 1h. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TTBS 1X durante 10min cada.

A outra tira foi incubada com o anticorpo anti-GST (GE Healthcare) diluído 1/1000 em 5% de leite magro em TTBS 1X à temperatura ambiente durante 1h. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com TTBS durante 10min cada, e incubada com o respectivo conjugado *gt- α -Rabbit-Pox* (Bio Rad Laboratories Ltd.) diluído a 1/3000 com 5% de leite magro em TTBS 1X, à temperatura ambiente durante 1h. Por fim, foi lavada três vezes com TTBS 1X durante 10min cada.

A revelação foi realizada por quimioluminescência, que consistiu na incubação das membranas durante 1min com 2ml de solução ECL, que depois foram expostas

na chapa durante os tempos de 5s, 10s e 30s, e reveladas no revelador automático *Kodak Medical X-ray processor* (Carestream Health, Stuttgart, Alemanha).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar associações entre duas variáveis qualitativas, sendo utilizadas tabelas de contingência de 2x2, recorreu-se ao teste Exacto de *Fisher* com recurso à aplicação do programa *EpiInfo*TM 3.5.3. (<http://www.cdc.gov/epiinfo>).

A comparação dos valores médios de uma variável quantitativa por os grupos de uma variável qualitativa com duas categorias foi feita através do teste paramétrico *t* de *Student* para duas amostras independentes.

Todos os testes utilizados foram bilaterais. Foi estabelecido em 5% o nível de significância dos testes, tendo-se rejeitado a hipótese nula quando a probabilidade de significância do teste (*p value*) foi inferior a este valor.

Capítulo IV: Resultados

1. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÓMICA DOS GENES *homC* E *homD* NA AMOSTRA DE ESTIRPES EM ESTUDO

Para o estudo da diversidade genômica dos genes *homC* e *homD* foram amplificadas e sequenciadas as regiões genômicas flaqueantes conservadas de cada gene alvo, pelas técnicas de PCR e sequenciação.

Pela amplificação destas regiões utilizando os *primers* externos, verificou-se que nas estirpes clínicas ambos os genes ocupam as mesmas regiões genômicas que nas estirpes de referência, doravante designados *locus homC* e *locus homD*. Foram obtidos produtos de amplificação com tamanhos entre 2305 e 2528pb para o *locus homC* e entre 2508 e 2526pb para o *locus homD*. Na figura 7, podem ser observados os produtos de amplificação obtidos para algumas estirpes de referência, separados em gel de agarose.

Os produtos de amplificação foram posteriormente sequenciados e as respectivas sequências de nucleótidos foram analisadas recorrendo ao programa *MultAlin*. Em seguida, foram traduzidas para as sequências de aminoácidos correspondentes recorrendo ao programa *EMBOSS transeq*.

Para todas as estirpes analisadas, foi obtida uma sequência codificante em cada *locus* analisado. Todas as sequências obtidas foram identificadas por homologia com o respectivo gene, *homC* e *homD*, recorrendo à aplicação BLAST, Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os fragmentos correspondentes ao gene *homC* apresentam tamanhos entre 2085 e 2256pb, e no

gene *homD* entre 2223 e 2299pb. No total, foram obtidas 142 sequências de nucleótidos do gene *homC* e respectivas sequências de aminoácidos, e 104 para o gene *homD*.

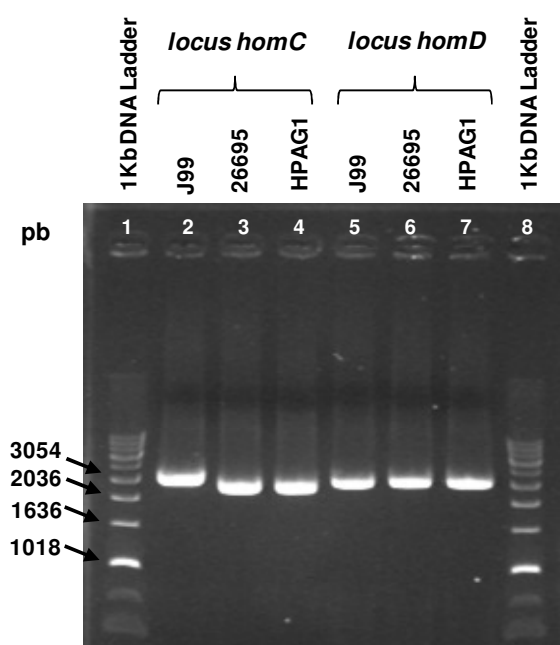


Figura 7: Produtos de amplificação de DNA separados em gel de agarose a 1% corado com *GelRedTM* (Biotium Inc.). As linhas 1 e 8 representam o marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder* com fragmentos de DNA de 500pb a 12Kb (Invitrogen S.A), as linhas 2, 3 e 4 representam o *locus homC*; as linhas 5, 6 e 7 o *locus homD* das estirpes de referência J99 (2528pb; 2508pb), 26695 (2305pb; 2516pb) e HPAG1 (2305pb; 2526pb), respectivamente.

2. ANÁLISE FILOGENÉTICA, PARÂMETROS EVOLUTIVOS E AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DOS GENES *homC* E *homD*

De modo a avaliar os parâmetros filogenéticos e evolutivos e a variabilidade genética dos genes *homC* e *homD*, foi realizada uma análise bioinformática das sequências nucleotídicas e respectivas sequências de aminoácidos previstas.

2.1. Análise filogenética das sequências dos genes *homC* e *homD*

A análise da filogenia foi realizada através de árvores filogenéticas criadas pelo programa *MEGASoftware* 4.0.2 utilizando o teste de filogenia *Bootstrap Neighbor Joining Tree* com 1000 réplicas e modelo *Kimura 2-parameter*⁸³, a partir de alinhamentos múltiplos das sequências de nucleótidos obtidos no *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9. pelo método *ClustalW*¹⁶¹ e utilizando *Bootstrap Neighbor Joining Tree* com 1000 réplicas.

2.1.1. Sequências do gene *homC*

A reconstrução filogenética das 167 sequências do gene *homC* de estirpes clínicas (n=142) e de referência (n=25) sugere uma agregação das estirpes baseada na origem geográfica suportada por valores de *bootstrap* ($\geq 75\%$), podendo observar-se três grupos: grupo Ocidental, composto por estirpes isoladas de doentes de países Ocidentais (Portugal, França, Alemanha, Suécia, Brasil, Colômbia e EUA – população *hpEurope*^{91,157}); grupo Oriental/Ameríndio, composto por estirpes originárias da Ásia Oriental (Japão e Coreia do Sul – subpopulação *hspEAsia*^{91,157}) e da América do Sul (Peru e Venezuela – subpopulação *hspAmerind*^{91,157}); e grupo

Africano, formado por estirpes oriundas de países Africanos (Burquina-Faso e Gâmbia – subpopulação *hspWAfrica*^{91,157}) e de outros países (Portugal, França, Brasil e EUA) (Figura 8).

Analisando cada grupo, a análise filogenética mostra uma maior proximidade entre as sequências do grupo Oriental/Ameríndio enquanto que nos outros dois grupos, Ocidental e Africano, verifica-se uma maior dispersão entre as estirpes.

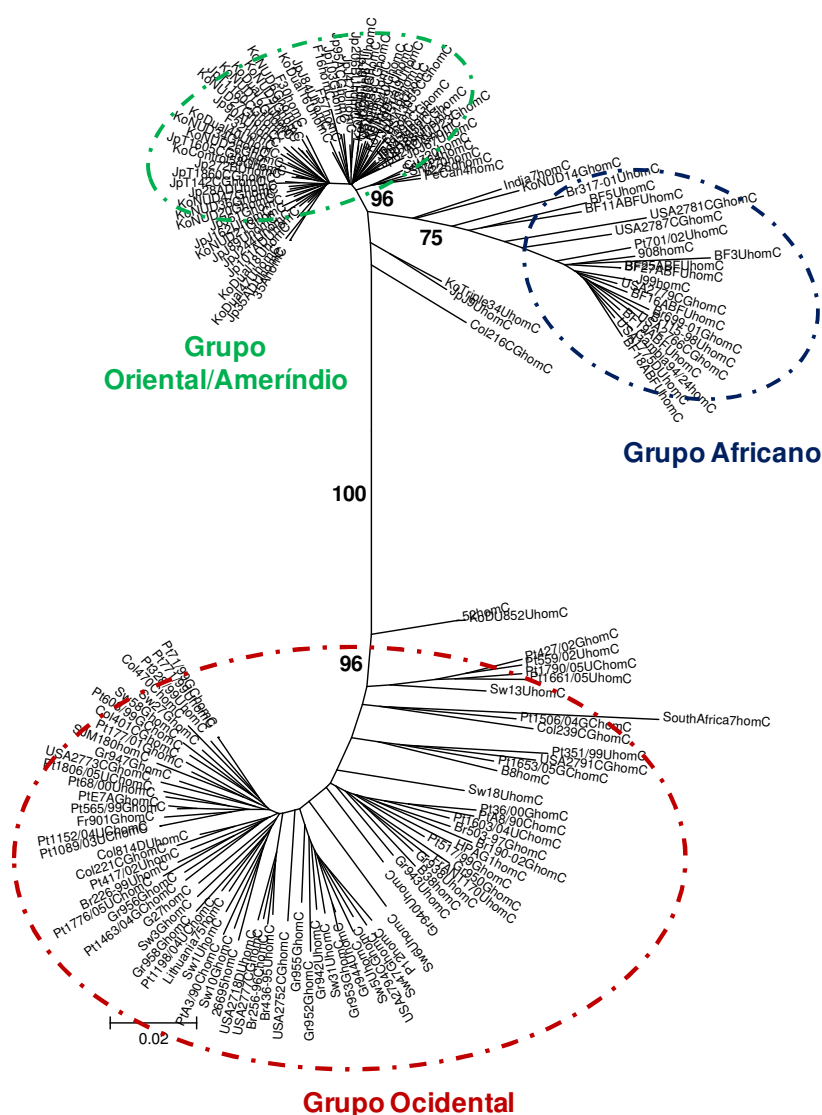


Figura 8: Análise filogenética de 167 sequências do gene *homC* de 142 estirpes clínicas e 25 estirpes de referência de *Helicobacter pylori*. O país de origem (Pt,

Portugal; Fr, França; Sw, Suécia; Gr, Alemanha; USA, Estados Unidos da América; Br, Brasil; Col, Colômbia; Jp, Japão; Ko, Coreia do Sul, BF, Burquina-Faso) e a patologia (G, Gastrite; U, Úlcera péptica; C, Cancro gástrico) estão representados no início e no fim da designação de cada estirpe clínica, respectivamente. O valor do índice de comprimento dos ramos está representado na árvore. Os números junto dos ramos principais indicam os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$ depois de 1000 interações. Os círculos a tracejado assinalam os grupos originados segundo a origem geográfica das estirpes: vermelho, grupo Ocidental; verde, grupo Oriental/Ameríndio e azul, grupo Africano.

Esta divisão das estirpes por grupos consoante a origem geográfica foi utilizada nas análises posteriores. As estirpes de referência South Africa e India7 foram excluídas por não pertencerem a nenhum grupo geográfico definido.

2.1.2. Sequências do gene *homD*

A análise filogenética de 129 sequências do gene *homD* de estirpes clínicas (n=104) e de referência (n=25) mostra, no geral, uma maior conservação genómica em todas as estirpes independentemente da origem geográfica, excluindo a estirpe de referência SouthAfrica7 que apresenta uma maior distância em relação às outras estirpes, não sendo suportada por valores de *bootstrap*. No entanto, também é possível detectar grupos compostos por estirpes com a mesma origem geográfica, suportados por valores de *bootstrap* ($\geq 75\%$), mas que não incluem todas as estirpes da mesma origem, como se verifica para o gene *homC*: grupo I, constituído por

algumas estirpes de países Ocidentais (Portugal, França, Alemanha, Suécia, Brasil, Colômbia e EUA), grupo II, composto por algumas estirpes originárias da Ásia Oriental (Japão e Coreia do Sul) e da América do Sul (Peru e Venezuela); e grupo III, formado por estirpes oriundas de países Africanos (Burquina-Faso e Gâmbia) e de outros países (Portugal, França, Brasil, Colômbia e EUA) (Figura 9).

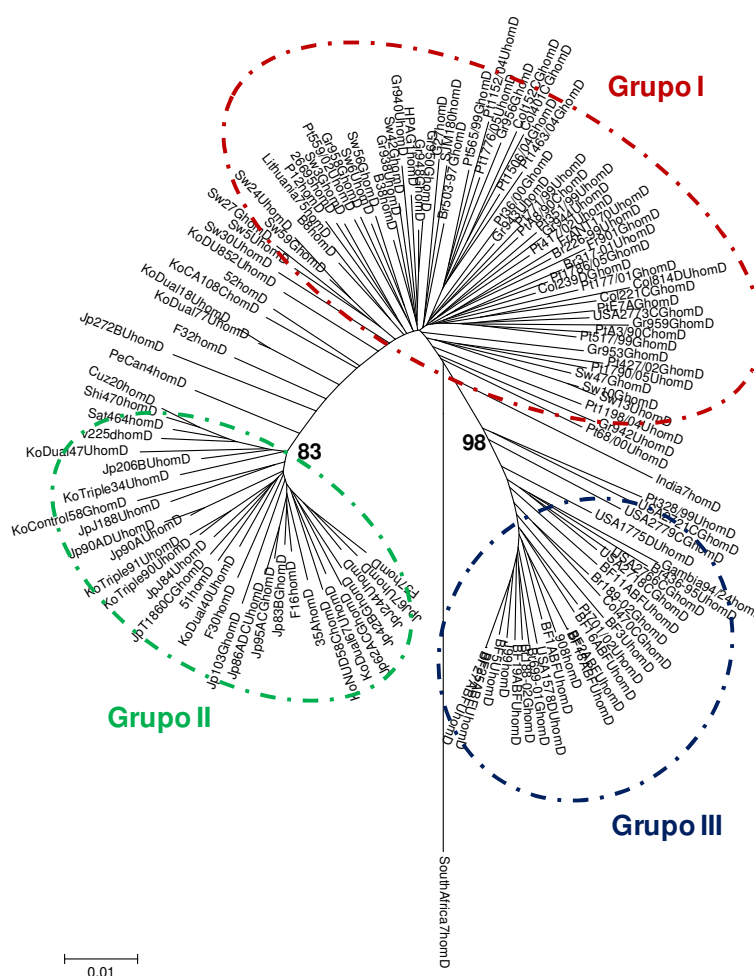


Figura 9: Análise filogenética de 129 sequências do gene *homD* de 104 estirpes clínicas e 25 estirpes de referência de *Helicobacter pylori*. O país de origem (Pt, Portugal; Fr, França; Sw, Suécia; Gr, Alemanha; USA, Estados Unidos da América; Br, Brasil; Col, Colômbia; Jp, Japão; Ko, Coreia do Sul, BF, Burquina-Faso) e a patologia (G, Gastrite; U, Úlcera péptica; C, Cancro gástrico) estão representados no

início e fim da designação de cada estirpe clínica, respectivamente. O valor do índice de comprimento dos ramos está representado na árvore. Os números junto dos ramos principais indicam os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$ depois de 1000 interações. Os círculos a tracejado assinalam os grupos compostos por estirpes com a mesma origem geográfica: vermelho, grupo I, verde, grupo II e azul, grupo III.

2.2. Avaliação da variabilidade genética das sequências dos genes *homC* e *homD*

De seguida, foi avaliado o grau de similaridade entre as sequências de nucleótidos de todas as estirpes em estudo, utilizando alinhamentos múltiplos gerados pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9, pelo método *ClustalW*⁶¹ e utilizando *Bootstrap Neighbor Joining Tree* com 1000 réplicas. A partir desses alinhamentos foram gerados gráficos de similaridade pelo método *Kimura 2-parameter*⁸³, que assume que a proporção de transições é maior que a de transversões, com recurso à aplicação do programa *SimPlot* 3.5.1.

2.2.1. Sequências do gene *homC*

A observação dos gráficos de similaridade sugere igualmente a existência de uma segregação das estirpes por origem geográfica, mas neste caso as estirpes separam-se em dois conjuntos apenas, um constituído pelo grupo Ocidental (conjunto I) e o outro pelos grupos Oriental/Ameríndio e Africano (conjunto II). A análise destes gráficos sugere ainda a existência de três regiões distintas no gene, designadas por segmento 1 (0 a 1300pb), segmento 2 (1300 a 1900pb) e segmento

3 (1900 a 2300pb) (Figura 10), em que no segmento 1 as estirpes se distinguem pela sua origem geográfica, no segmento 2 existe variabilidade entre os dois conjuntos de estirpes e dentro do mesmo conjunto, e o segmento 3 é uma região do gene muito mais conservada.

Mais em detalhe, observam-se no segmento 1 diferenças notórias entre as sequências de nucleótidos do conjunto I (grupo Ocidental) e do conjunto II (grupos Oriental/Ameríndio e Africano), onde a percentagem mínima de similaridade entre as sequências é de cerca de 40%. Esta diferença traduz-se principalmente em inserções de nucleótidos, que variam entre 9 a 20 nucleótidos, observadas nas estirpes do grupo Oriental/Ameríndio e Africano e ausentes nas estirpes do grupo Ocidental (Figura 11).

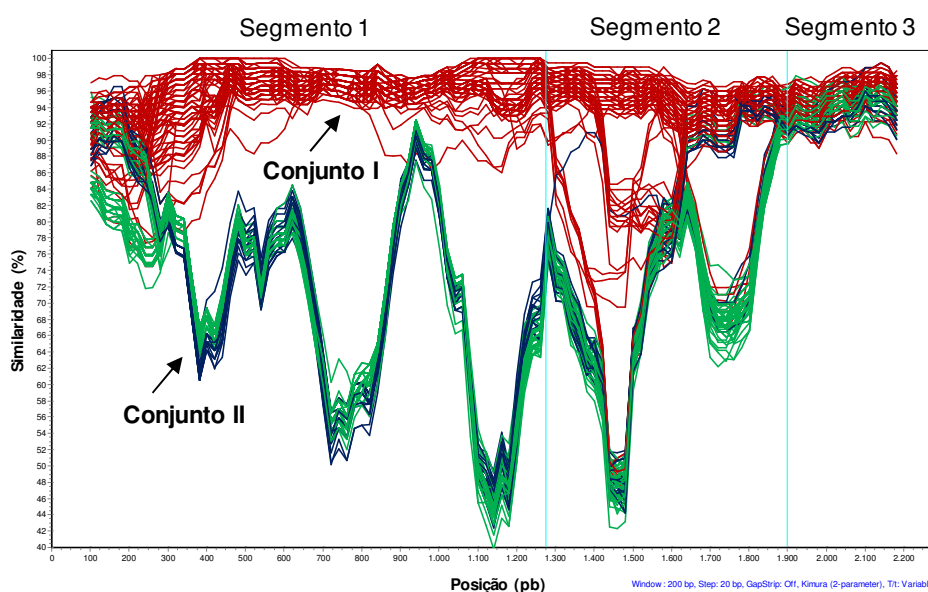


Figura 10: Representação gráfica da similaridade entre 165 sequências de nucleótidos do gene *homC* de estirpes de *Helicobacter pylori* (estirpes de origem Ocidental, vermelho; Oriental/Ameríndia, verde e Africana, azul). Os gráficos foram gerados com o modelo *Kimura 2-parameter*, uma janela de 200pb, um passo de

20pb, sem *Gap Strip* e como referência a sequência do gene *homC* da estirpe de referência 26695 (HP0373).

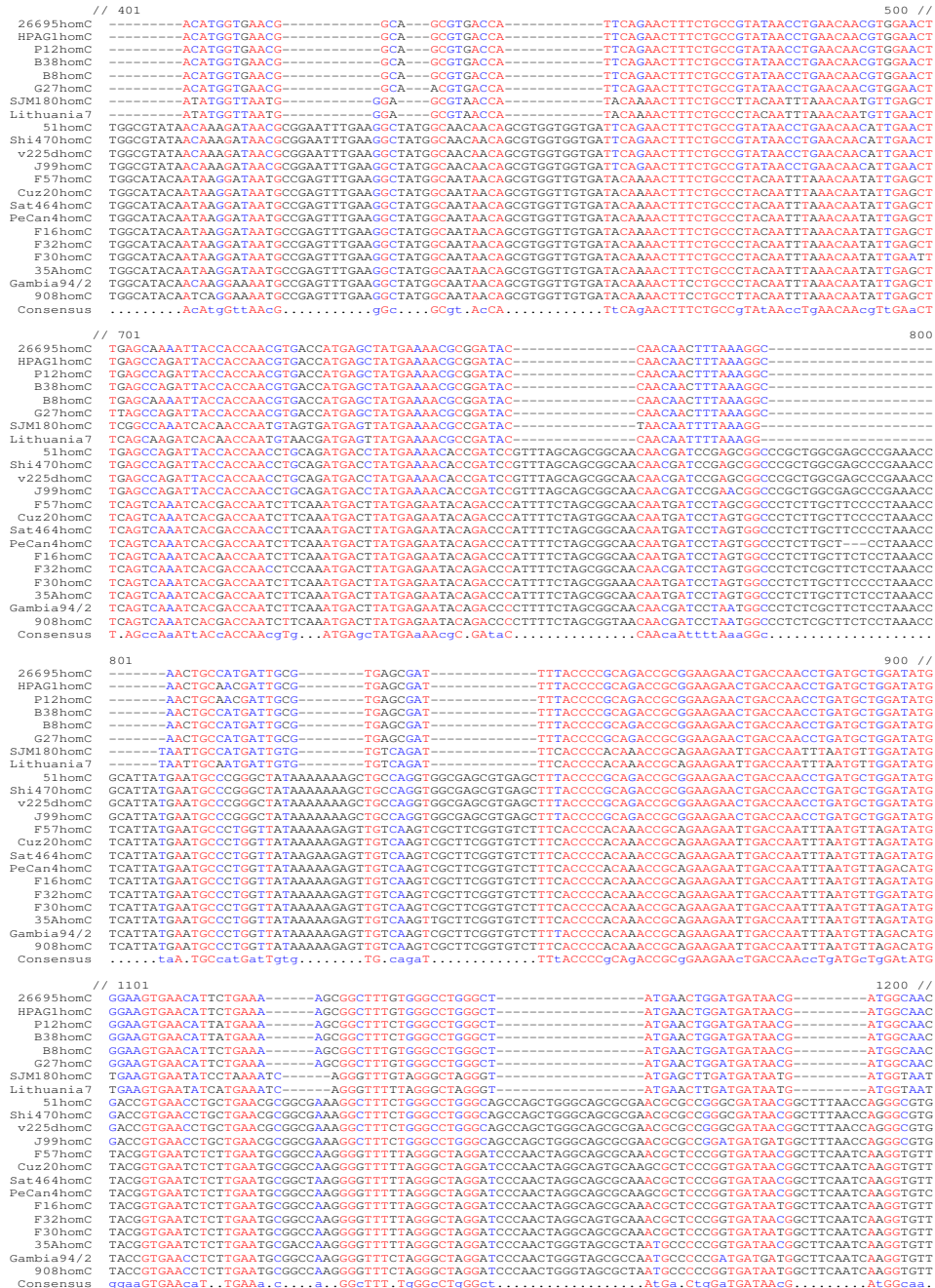


Figura 11: Alinhamento representativo das variações no segmento 1 do gene *homC*. Foram usadas 22 estirpes de referência de *Helicobacter pylori*. A sequência

da estirpe 26695 de origem Ocidental foi usada como referência. Os traços indicam deleções de nucleótidos.

Relativamente ao segmento 2, verifica-se que, à semelhança do segmento 1, é também uma região muito variável do gene (similaridade mínima de aproximadamente de 43%), mas neste caso, as diferenças são observadas entre estirpes de conjuntos diferentes e entre estirpes do mesmo conjunto (Figura 10). Este padrão sugere a existência de variantes alélicas nesta região do gene.

Em relação ao segmento 3, as sequências apresentam uma maior similaridade entre elas (cerca de 90%), sugerindo que esta região é bastante conservada nos três grupos de estirpes e entre eles.

2.2.1.1. Análise do segmento 2 nas sequências do gene *homC*

Devido ao elevado grau de polimorfismo observado no segmento 2 do gene *homC*, por um lado, e à tendência de formação de grupos não geográficos, por outro, procedeu-se a uma análise mais detalhada desta região, incluindo quer a análise das sequências de bases, quer das respectivas sequências proteicas.

Assim, a partir de um alinhamento gerado com as proteínas putativas HomC (Figura 12), observou-se que nas estirpes clínicas e de referência estudadas, existem oito variantes alélicas distintas, denominadas AI, AII, AIII, AIV, AV, AVI, AVII e AVIII. Estas variantes foram identificadas em todas as estirpes estudadas, embora com diferentes frequências (Figura 13).

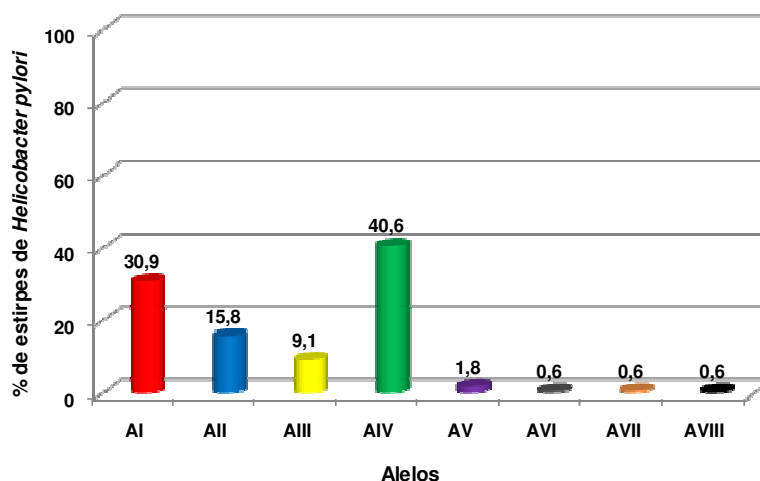


Figura 13: Distribuição dos oito alelos do gene *homC* (AI-AVIII) em 165 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori*.

De seguida, foi estimada a frequência de cada alelo por grupo geográfico (definidos no ponto 2.1.1, Figura 8).

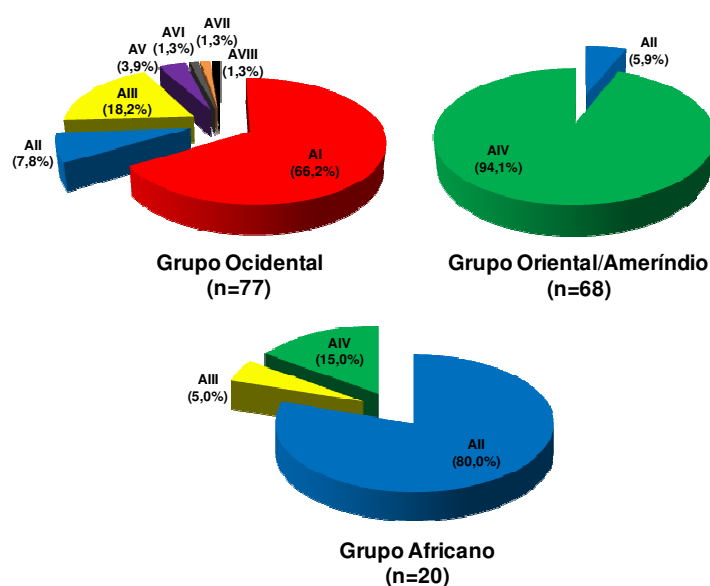


Figura 14: Distribuição dos oito alelos do gene *homC* (AI-AVIII) em 165 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a origem geográfica (Ocidental, Oriental/Ameríndia e Africana).

Nas estirpes clínicas e de referência do grupo Ocidental observam-se todos os alelos excepto o alelo AIV, sendo o alelo AI o predominante (66,2%). Os alelos AII, AIII e AV têm uma frequência de 7,8, 18,2 e 3,9%, respectivamente, enquanto os alelos AVI, AVII e AVIII só foram observados cada um numa estirpe (1,3%). Nas estirpes do grupo Oriental/Ameríndio, apenas foram observados os alelos AII e AIV, sendo o alelo AIV o predominante (94,1%). No grupo Africano, foram observados os alelos AII, AIII e AIV, com prevalências de 80,0, 5,0 e 15,0%, respectivamente (Figura 14).

Em resumo, o grupo Ocidental foi o que mostrou maior variabilidade alélica (sete alelos diferentes), enquanto que o grupo Oriental/Ameríndio foi o que mostrou menor variabilidade (apenas dois alelos diferentes). Foi possível detectar uma variante alélica predominante em cada grupo geográfico (AI para o grupo Ocidental, AIV para o grupo Oriental/Ameríndio e AII para o grupo Africano). De notar ainda que o alelo AI, predominante no grupo Ocidental, só foi observado neste grupo de estirpes, enquanto que o alelo AII é o único que é observado nos três grupos geográficos.

Após a identificação das variantes alélicas, reavaliou-se a análise filogenética verificando-se que dentro de cada grupo geográfico existe uma segregação por variantes alélicas (Figura 15).

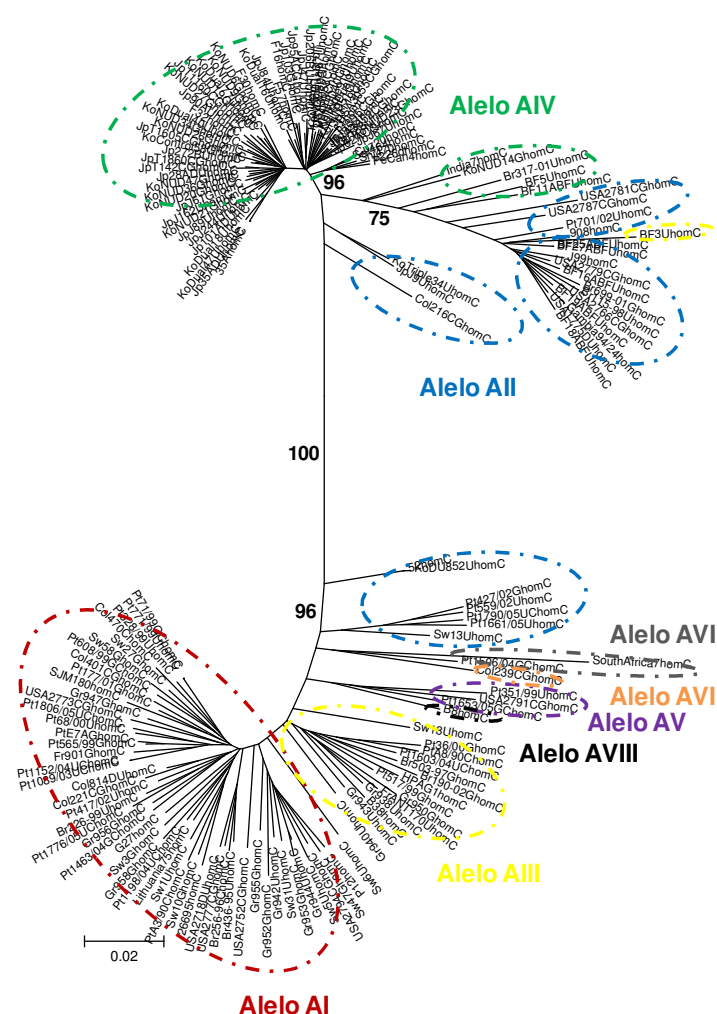


Figura 15: Análise filogenética de 167 sequências do gene *homC* de 142 estirpes clínicas e 25 estirpes de referência de *Helicobacter pylori*. O país de origem (Pt, Portugal; Fr, França; Sw, Suécia; Gr, Alemanha; USA, Estados Unidos da América; Br, Brasil; Col, Colômbia; Jp, Japão; Ko, Coreia do Sul, BF, Burquina-Faso) e a patologia (G, Gastrite; U, Úlcera péptica; C, Cancro gástrico) estão representados no início e fim da designação de cada estirpe clínica, respectivamente. O valor do índice de comprimento dos ramos está representado na árvore. Os números junto dos ramos principais indicam os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$ depois de 1000 interações. Os círculos a tracejado assinalam os oito alelos do gene *homC*

(AI-AVIII): vermelho, AI; azul, AII; amarelo, AIII; verde, AIV; roxo, AV; cinzento, AVI; laranja, AVII e preto, AVIII.

De forma a avaliar as semelhanças e diferenças entre os vários alelos, foram gerados gráficos de similaridade a partir de sequências nucleotídicas representativas dos alelos definidos.

Primeiramente, foi feita uma análise das sequências do gene *homC* por grupo geográfico incluindo todas as variantes alélicas observadas em cada grupo. Esta análise permite confirmar a região alélica como sendo o segmento 2, já que dentro de cada grupo geográfico, é o único dos três segmentos onde é observada elevada variabilidade (Figura 16). Por análise destes gráficos, verifica-se que o alelo AII (cor azul) é o que apresenta menor grau de similaridade com os alelos predominantes nos grupos Ocidental (alelo AI – cor vermelha, Figura 16A) e Oriental/Ameríndio (alelo AIV – cor verde, Figura 16B).

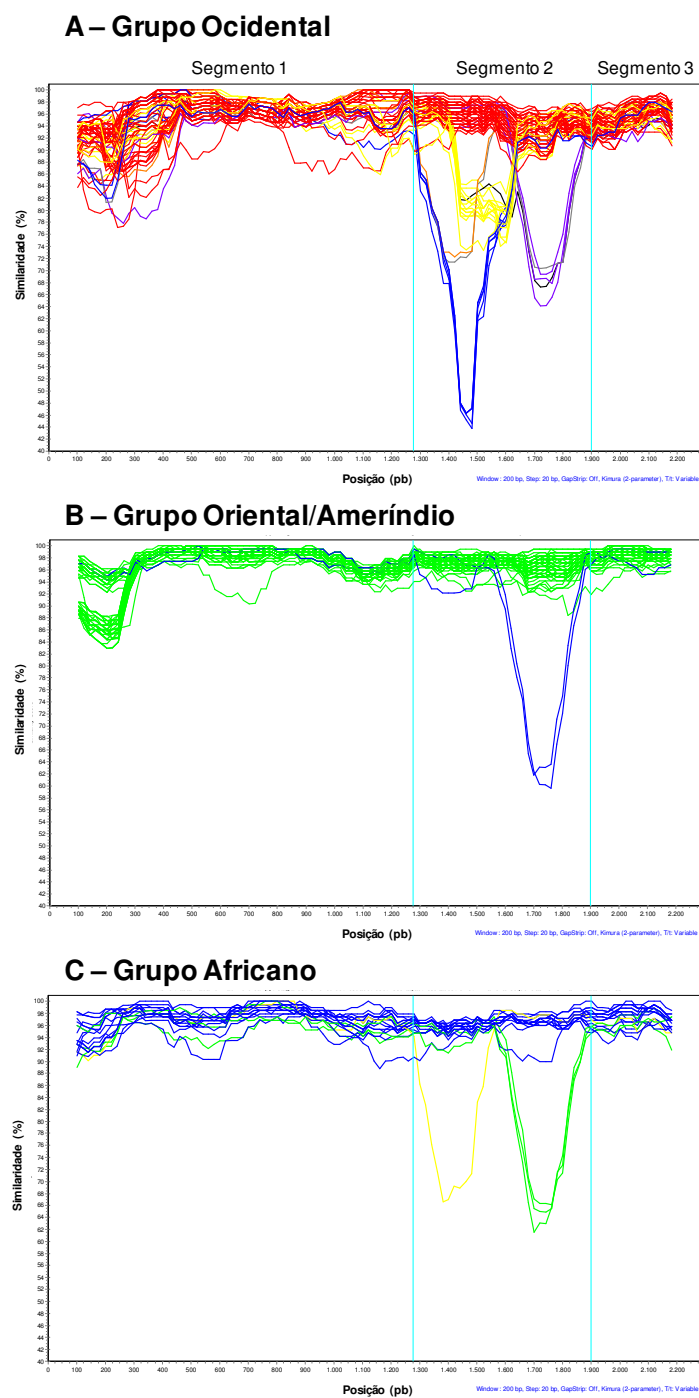


Figura 16: Representação gráfica da similaridade entre seqüências de nucleótidos do gene *homC* de estirpes de *Helicobacter pylori* de origem geográfica diferente (A: 77 estirpes de origem Ocidental, B: 68 estirpes de origem Oriental e C: 20 estirpes de origem Africana) apresentando os diferentes alelos *homC*. Os gráficos foram gerados com o modelo *Kimura 2-parameter*, uma janela de 200pb, um passo

de 20pb, sem *Gap Strip* e como referência a sequência do gene *homC* da estirpe de referência 26695 (HP0373) no gráfico A, o gene *homC* da estirpe 51 (KHP_0983) no gráfico B e da estirpe J99 (jhp1008) no gráfico C. Os alelos estão representados com cores diferentes: AI, vermelho; AII, azul; AIII, amarelo; AIV, verde; AV, roxo; AVI, laranja; AVII, cinzento e AVIII, preto.

De seguida, construíram-se gráficos de similaridade por variante alélica (Figura 17). A análise destes gráficos também suporta a definição do segmento 2 como a região alélica, já que dentro de cada alelo esta região é bastante conservada, independentemente da origem geográfica da estirpe, e contrariamente ao segmento 1 onde se observam nas sequências diferenças consoante a origem da estirpe.

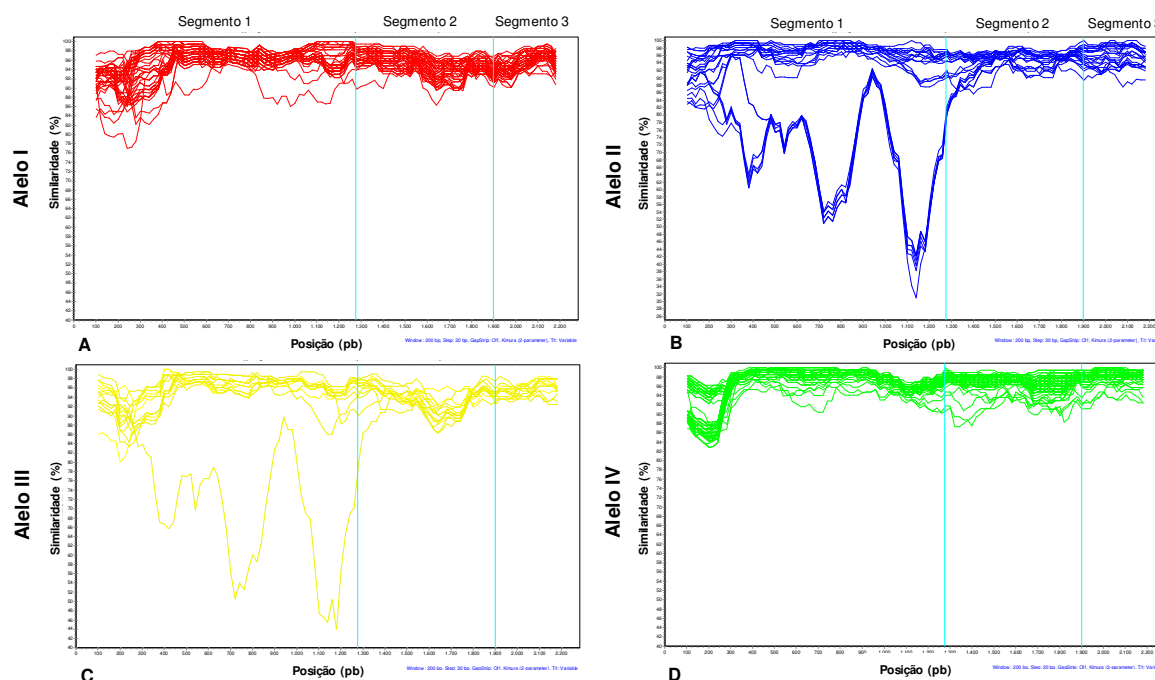


Figura 17: Representação gráfica da similaridade entre sequências de nucleótidos do gene *homC* de estirpes de *Helicobacter pylori* apresentando os

diferentes alelos *homC* (A: 51 estirpes do alelo AI a vermelho; B: 26 estirpes do alelo AII a azul; C: 15 estirpes do alelo AIII a amarelo e D: 68 estirpes do alelo AIV a verde). Os gráficos foram gerados com o modelo *Kimura 2-parameter*, uma janela de 200pb, um passo de 20pb, sem *Gap Strip* e utilizando como referência a sequência do gene *homC* da estirpe de referência 26695 (HP0373) no gráfico A, J99 (jhp1008) no gráfico B, HPAG1 (HPAG1_1019) no gráfico C e 51 (KHP_0983) no gráfico D. Os alelos estão representados com cores diferentes: AI, vermelho; AII, azul; AIII, amarelo e AIV, verde.

2.2.1.2. Distribuição dos alelos do gene *homC* de acordo com a patologia e perfil de virulência das estirpes

Com o intuito de verificar uma possível associação entre os alelos do gene *homC* e a patologia associada ou o perfil de virulência das estirpes foi avaliada a distribuição dos alelos do gene *homC* tendo em conta estes dois parâmetros. Para esta análise foram excluídos os alelos pouco frequentes (AV, AVI, AVII e AVIII). Também as estirpes isoladas de doentes sem informação da patologia associada não foram incluídas nesta análise.

Os valores de p apresentados referem-se à comparação entre ter ou não o alelo por patologia (gastrite ou úlcera péptica) ou o alelo por genótipo de virulência (genótipo virulento ou genótipo não virulento). Só são apresentados os valores de p com significado estatístico ($p < 0,05$).

A distribuição dos alelos do gene *homC* em 148 estirpes isoladas de doentes com gastrite, úlcera péptica (UP) e cancro gástrico está apresentada na Figura 18. No

geral, verifica-se uma maior prevalência do alelo AI na gastrite, enquanto que o alelo AII é mais prevalente na UP (57,1 e 72,0%, respectivamente). No entanto, apenas a associação entre o alelo AII e a UP apresenta significado estatístico ($p=0,037$). Os alelos AIII e AIV apresentam prevalências semelhantes tanto para a gastrite como para a UP.

Em relação às estirpes isoladas de cancro gástrico, apresentam as variantes alélicas AI, AIII e AIV, mas nada de concreto se pode concluir visto haver um número muito reduzido de estirpes em estudo.

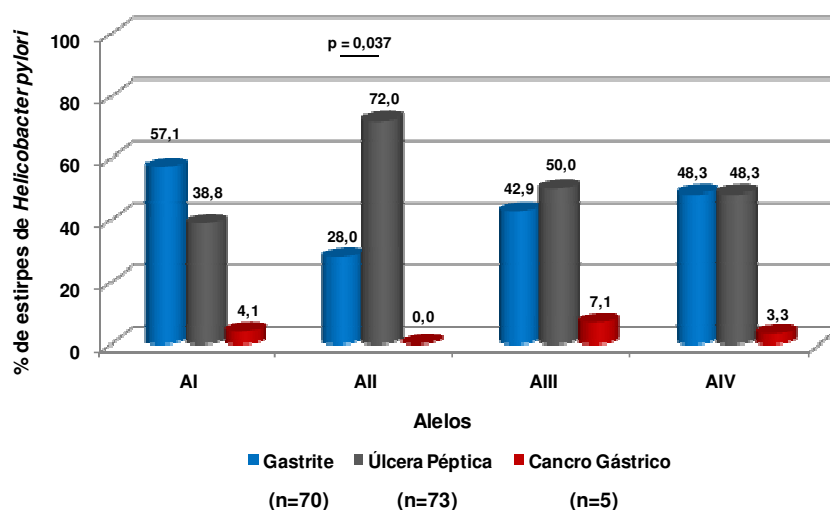


Figura 18: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (alelos AI-AIV) em 148 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a patologia.

A análise da distribuição dos alelos por patologia, dentro de cada grupo geográfico, mostra que no grupo Ocidental há uma associação entre o alelo AI (59,6%) e a gastrite e entre o alelo AII (66,7%) e a UP, embora sem significado estatístico. No grupo Oriental/Ameríndio, todas as estirpes do alelo AII foram

isoladas de casos de UP, e em relação ao alelo mais prevalente (alelo AIV) não se observa nenhuma associação com a patologia. No grupo Africano, todas as estirpes com os alelos AIII e AIV são isoladas de doentes com UP, apesar de o número de estirpes ser muito reduzido para tirar qualquer relação. Neste grupo geográfico, a UP é também a patologia mais frequente nas estirpes com o alelo AII (66,7%) (Figura 19).

Em resumo e comparando as patologias gastrite e UP, observa-se que o alelo AII, sendo o único alelo transversal aos três grupos geográficos, mantém nos três grupos, uma associação com as estirpes isoladas de UP, embora sem significado estatístico.

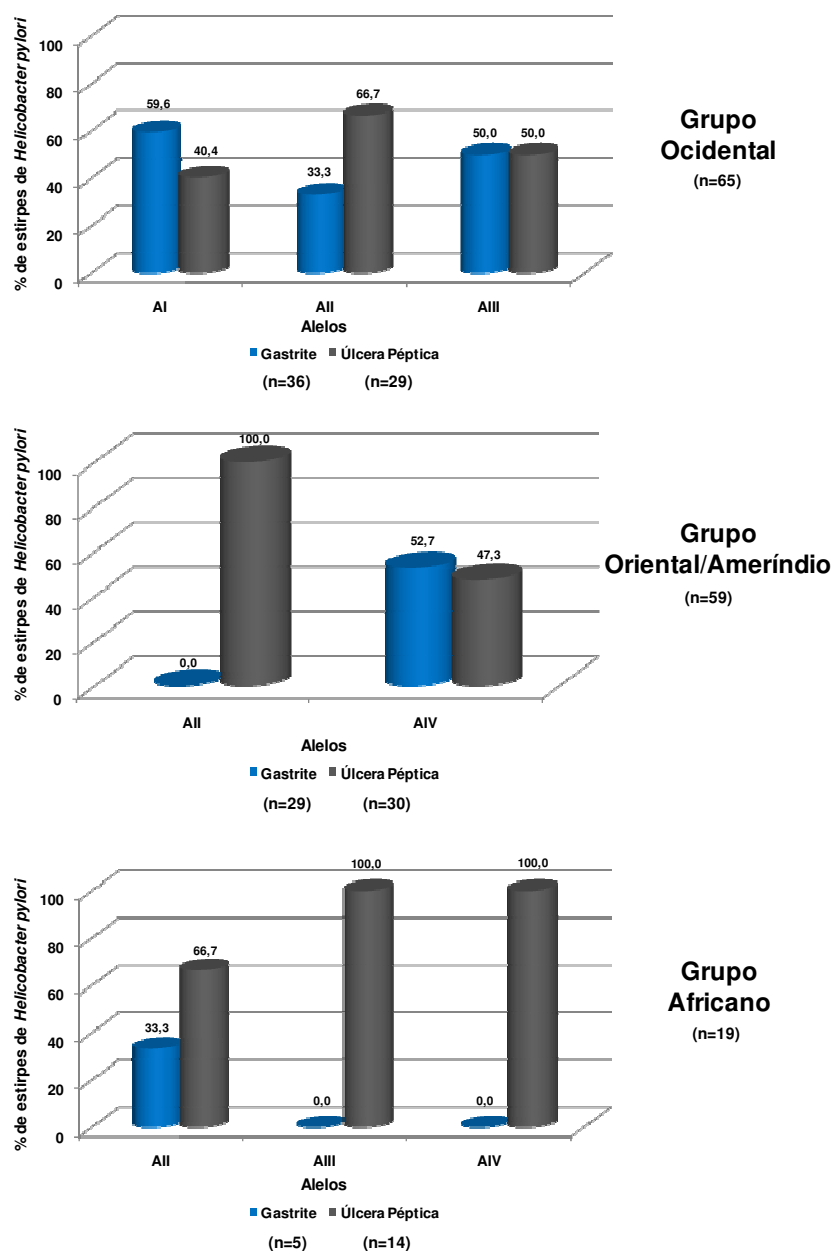


Figura 19: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (AI-AIV) em 143 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a patologia: gastrite e úlcera péptica em cada grupo geográfico considerado (grupos Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano).

Foi também avaliada a associação entre os alelos do gene *homC* e os genótipos de virulência de *H. pylori*, tais como, a presença ou ausência do ilhéu de patogenicidade *cag*, cujo marcador é o gene *cagA*, e o alelo s do gene *vacA*, em 127 estirpes clínicas e de referência da amostra em estudo com genótipos previamente determinados¹²¹. Foram categorizadas como estirpes virulentas as estirpes positivas para o gene *cagA* e o alelo *vacA* s1 (alelo citotóxico) e estirpes não virulentas as estirpes negativas para o gene *cagA* e com o alelo *vacA* s2 (alelo não citotóxico)^{67,90,167}.

A distribuição dos alelos *homC* de acordo com o genótipo de virulência das estirpes está apresentada na Figura 20. No geral, as estirpes com os alelos AI, AII, AIII e AIV estão mais associadas ao genótipo virulento (72,1%, 84,2%, 63,6% e 100,0%, respectivamente), sendo que a associação dos alelos AI e AIV com o perfil mais virulento é estatisticamente significativa.

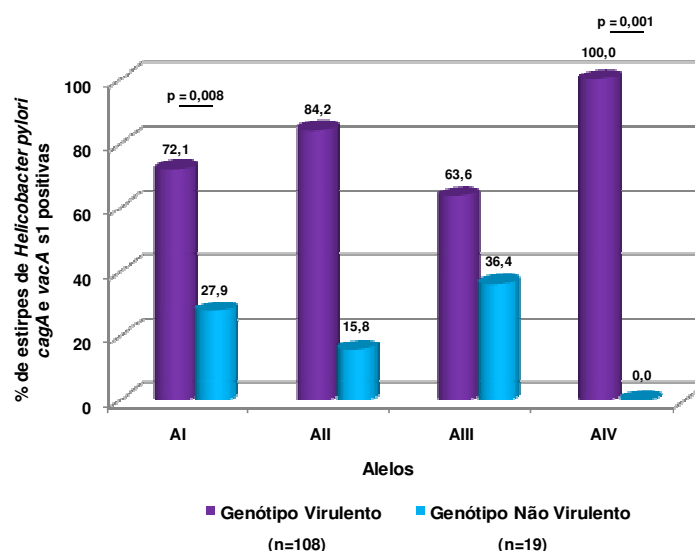


Figura 20: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (AI-AIV) em 127 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com o genótipo de virulência.

Considerando a distribuição dos alelos pelos genótipos de virulência em cada grupo geográfico (Figura 21), observam-se as mesmas associações, no entanto, verifica-se que todas as estirpes do grupo Oriental/Ameríndio são do genótipo virulento independentemente do alelo que apresentam, tal como descrito anteriormente^{93,121}.

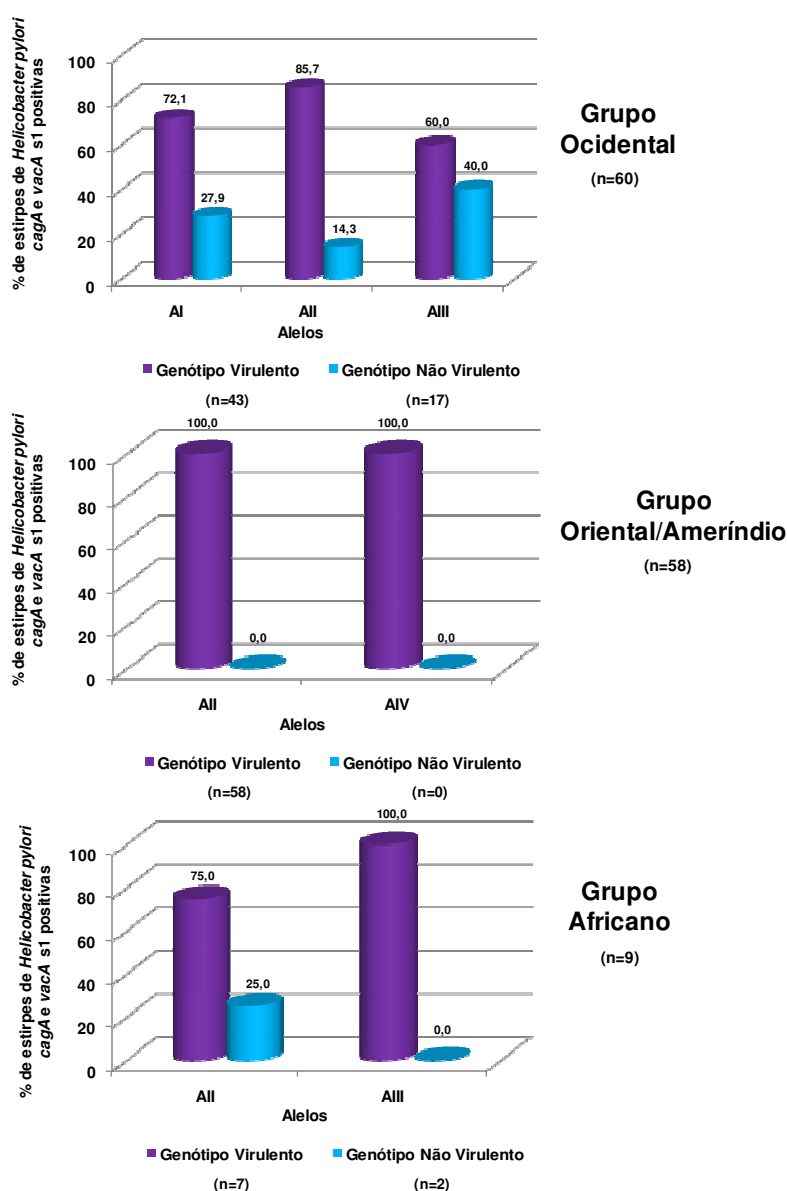


Figura 21: Distribuição dos alelos mais prevalentes do gene *homC* (AI-AIV) em 127 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com o genótipo de virulência, em cada grupo geográfico (Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano).

2.2.2. Sequências do gene *homD*

Pela observação do gráfico de similaridade da Figura 22, verifica-se que as sequências do gene *homD* são bastante conservadas, corroborando o que se observou na análise filogenética. A divisão das estirpes por origem geográfica não se verifica neste caso. O elevado grau de similaridade entre as sequências analisadas não sugere a existência de variantes alélicas. No entanto, observa-se uma pequena região variável, localizada entre aproximadamente 1500-1600pb, onde um grupo de estirpes (Conjunto II) apresenta um menor grau de similaridade (cerca de 80%) com a estirpe de referência, estirpe 26695 de origem Ocidental.

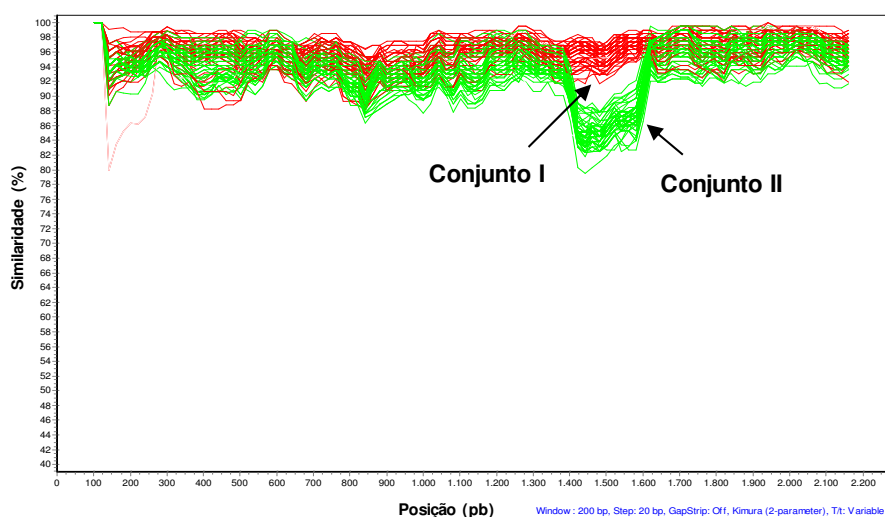


Figura 22: Representação gráfica da similaridade entre 129 sequências do gene *homD* de estirpes de *Helicobacter pylori* de origem geográfica diferente. Os gráficos foram gerados com o modelo *Kimura 2-parameter*, uma janela de 200pb, um passo de 20pb, sem *Gap Strip* e como referência a sequência da estirpe de referência 26695 (HP1453).

De seguida, foi realizada uma análise das respectivas sequências proteicas para avaliar as semelhanças e diferenças ao nível das proteínas. Assim, a partir de um alinhamento gerado com as proteínas HomD, verifica-se que a variação entre as estirpes observada no gráfico de similaridade deve-se a uma diferença de um péptido (GGQNQPAFPS) que difere entre as estirpes do conjunto I e as do conjunto II (KDKPYTAG).

Curiosamente, o péptido de 10 aminoácidos da proteína HomD das estirpes do conjunto I também se observa nos alelos AII, AIII, AIV e AVIII do gene *homC* (Figura 12). O péptido KDKPYTAG não existe em nenhuma variante alélica *homC*.

A presença destes péptidos nas estirpes dos grupos geográficos definidos anteriormente para o gene *homC* (ponto 2.1.1) foi analisada, e verifica-se que as estirpes do conjunto I são na maioria de origem Ocidental (78,6%) enquanto que as estirpes do conjunto II são maioritariamente de origem Oriental/Ameríndia e Africana (82,5 e 94,7%, respectivamente).

Ainda a partir do alinhamento gerado com as proteínas HomD, observa-se a existência de uma zona de repetições de motivos de Lisina-Prolina (KP) no terminal amino das proteínas (Figura 23). Este número de repetições varia entre 2-9 KP, sendo 5 KP o número de motivos repetidos mais frequentemente observado (53,5% das estirpes) (Figura 24). Consoante o número de repetições dos motivos de KP foram criados três intervalos: número baixo de repetições (≤ 4 KP), número intermédio (5-6 KP), número alto de repetições (≥ 7 KP).

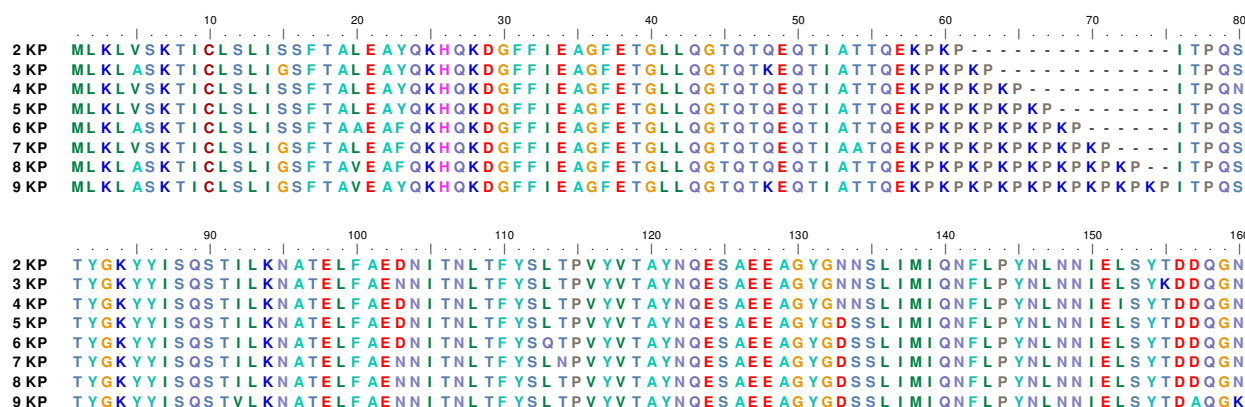


Figura 23: Alinhamento representativo da variação das repetições dos motivos KP das proteínas HomD de estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori*. Os traços indicam deleções.

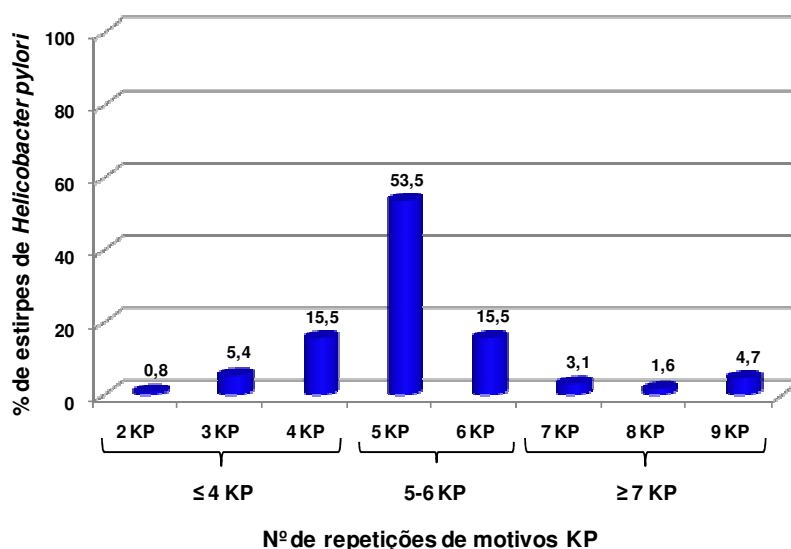


Figura 24: Distribuição do número de repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD em 129 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori*.

De seguida, foi realizada uma análise da distribuição do número de repetições dos motivos KP segundo a origem geográfica, nos grupos definidos anteriormente: Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano. Verifica-se que não existe nenhum padrão

específico de região geográfica, apenas que a repetição de 5 KP é a mais prevalente nos três grupos: 75,7% no grupo Ocidental; 55,0% no Ocidental/Ameríndio e 73,7% no Africano, seguida do padrão ≤ 4 KP, sendo o número de repetições ≥ 7 KP o padrão menos observado em todos os grupos (Figura 25).

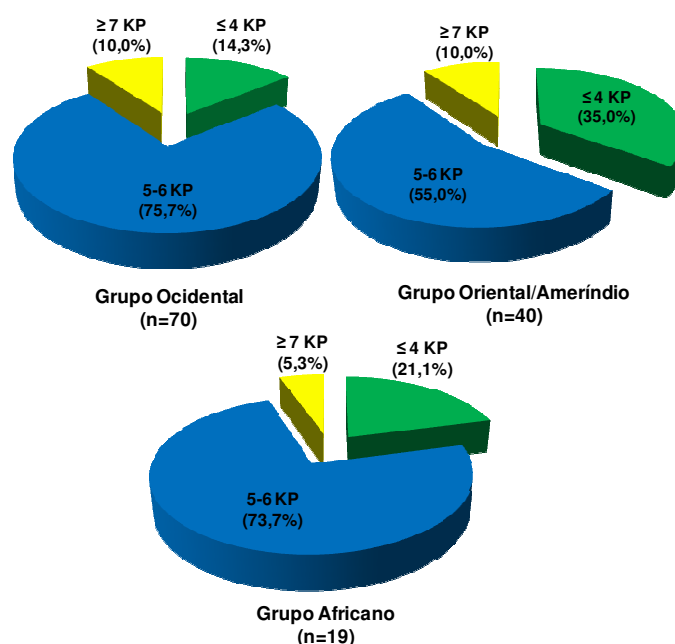


Figura 25: Distribuição do número de repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD em 129 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a origem geográfica da estirpe.

2.2.2.1. Distribuição dos motivos KP das proteínas HomD de acordo com a patologia e perfil de virulência das estirpes

Foi igualmente avaliada a distribuição do número de repetições dos motivos KP segundo a patologia associada e o perfil de virulência das estirpes.

No geral, verificou-se que existe uma correlação entre um menor número de repetições de motivos KP (≤ 4 KP) e a UP (66,7%) e o maior número de repetições

(≥ 7 KP) e a gastrite, mas sem significado estatístico (Figura 26). As repetições entre 5-6 KP foram igualmente frequentes nas estirpes isoladas de gastrites (41,5%) e nas isoladas de úlceras (53,7%). Em relação às estirpes isoladas de cancro gástrico, não é possível tirar conclusões devido ao pequeno número de estirpes na amostra em estudo, apesar de todas elas apresentarem o padrão 5-6 KP.

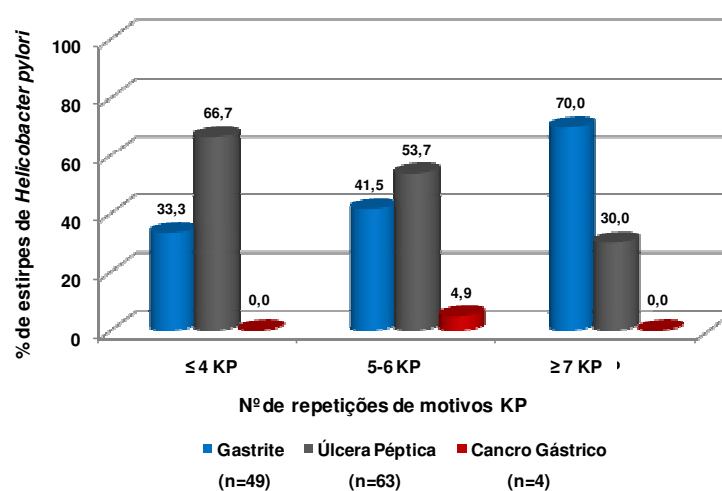


Figura 26: Distribuição do número de repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD em 116 estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori* de acordo com a patologia (gastrite, úlcera péptica e cancro gástrico).

Em relação ao genótipos de virulência, verifica-se que os padrões ≤ 4 KP e 5-6 KP são mais frequentes nas estirpes mais virulentas (82,4% e 74,6%, respectivamente), enquanto que todas as estirpes com o padrão ≥ 7 KP apresentam um perfil virulento (Figura 27).

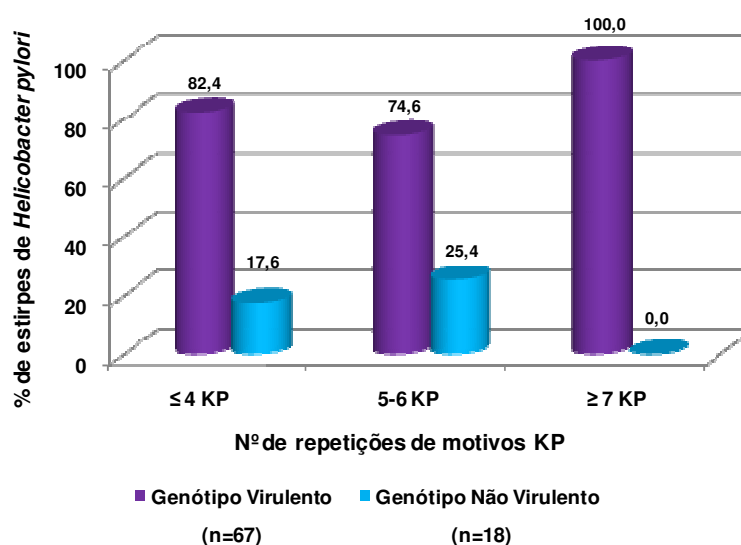


Figura 27: Distribuição do genótipo virulento e do genótipo não virulento de 85 estirpes clínicas de *Helicobacter pylori* de acordo com o intervalo das repetições dos motivos KP (2-9 KP) das proteínas HomD.

2.3. Cálculo dos parâmetros evolutivos dos genes *homC* e *homD*

Para compreender melhor a origem e a evolução destes genes, foram determinados alguns parâmetros evolutivos, a partir das sequências de nucleótidos e de aminoácidos dos genes *homC* e *homD*. Os parâmetros evolutivos foram determinados recorrendo ao programa MEGA 4, utilizando alinhamentos múltiplos gerados pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9, pelo método *ClustalW*¹⁶¹ e utilizando *Bootstrap Neighbor Joining Tree* com 1000 réplicas, tendo-se calculado: distância molecular entre nucleótidos e entre aminoácidos e frequência de substituições sinónimas/não-sinónimas.

As distâncias moleculares evolutivas foram estimadas através do número de substituições nucleotídicas *per site* entre duas sequências. São úteis para estimar o

tempo de divergência entre sequências, e são primariamente utilizadas como base na reconstrução filogenética. Este parâmetro foi calculado pelo método *Kimura 2-parameter*⁸³, que é idêntico ao método *Jukes-Cantor 1-parameter*⁷⁶ mas assumindo que a proporção de transições é maior que a de transversões.

As substituições sinónimas (Ks) são substituições nucleotídicas que não alteram a sequência de aminoácidos, enquanto que as substituições não-sinónimas (Ka) provocam alteração de aminoácidos. Assim, a “utilização” das substituições sinónimas está menos restringida do que as alterações não-sinónimas, e deverá reflectir, ainda que grosseiramente, a divergência entre sequências nucleotídicas. As diferenças não-sinónimas podem ser utilizadas como medida de constrangimentos funcionais das sequências, e a razão entre as substituições não-sinónimas e sinónimas (Ka/Ks) mede os constrangimentos funcionais corrigidos para o tempo de divergência entre as sequências. Estes parâmetros foram determinados pelo método *Nei and Gojobori*, que estima o número de substituições sinónimas e não-sinónimas para qualquer par de sequências¹¹¹. Utiliza a fórmula do método *Jukes-Cantor 1-parameter*⁷⁶ para corrigir os alvos múltiplos, estimando o número de substituições dividido pelo número de potenciais sítios sinónimos e não-sinónimos.

O tipo de selecção que está actuar ao nível dos aminoácidos pode ser detectado pela comparação entre a frequência das substituições sinónimas e não-sinónimas. A selecção positiva refere-se a uma selecção a favor das substituições não-sinónimas ao nível do DNA, onde a distância evolutiva baseada nas substituições não-sinónimas deverá ser maior do que a baseada nas sinónimas (Ka>Ks; Ka/Ks>1). A selecção purificadora refere-se a uma selecção a favor das substituições sinónimas, onde a distância evolutiva baseada nas substituições

sinónimas deverá ser maior do que a distância baseada nas substituições não-sinónimas ($K_a < K_s$; $K_a/K_s < 1$). Este parâmetro foi determinado pelo teste de selecção *codon-based Z-test* para avaliar a probabilidade de rejeição da hipótese nula de evolução ($K_a = K_s$) a favor da selecção positiva ou purificadora¹¹².

2.3.1. *gene homC*

Primeiramente, analisaram-se as sequências de nucleótidos e de aminoácidos correspondentes ao gene completo e aos segmentos 1, 2 e 3 do gene *homC*, incluindo todas as estirpes de *H. pylori*, e por grupo geográfico (Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano) (Tabela 7).

Em relação às distâncias moleculares, os valores obtidos para todas as estirpes mostram que existe uma menor distância molecular entre as sequências de nucleótidos ($0,110 \pm 0,004$) e de aminoácidos ($0,128 \pm 0,008$) quando se analisa o gene completo, comparativamente com a análise por segmento. Observando segmento a segmento, verifica-se que nos segmentos 1 e 2 as sequências apresentam uma maior distância molecular do que o segmento 3, sendo mais elevada ao nível dos aminoácidos no segmento 2, corroborando os resultados obtidos no ponto 2.2.1.1, que mostram a existência de variantes alélicas. A distância observada no segmento 1 traduz provavelmente a dispersão geográfica das estirpes. O segmento 3 é o mais conservado quer a nível de nucleótidos quer de aminoácidos ($0,072 \pm 0,005$ e $0,039 \pm 0,008$, respectivamente), corroborando os resultados anteriores (Figura 10).

Analisando as distâncias moleculares por origem geográfica, verifica-se que nos três grupos (Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano) a maior distância entre as sequências é observada apenas no segmento 2. Neste caso, o segmento 1 é mais conservado pois trata-se de uma análise em cada grupo geográfico. Comparando a distância molecular para o segmento 2 entre os três grupos geográficos, verifica-se que as sequências do grupo Ocidental apresentam uma maior distância molecular do que nos grupos Oriental/Ameríndio e Africano, o que está novamente de acordo com os resultados anteriores (ponto 2.2.1.1), que mostram que as estirpes do grupo Ocidental são as que apresentam maior diversidade alélica.

Tendo em conta as substituições sinónimas e não-sinónimas, observa-se no geral uma maior frequência das primeiras em relação às segundas. Os valores da razão Ka/Ks para todas as estirpes e para os grupos de acordo com a origem geográfica foram muito semelhantes mantendo-se todos inferiores a 1, sugerindo uma selecção purificadora a actuar neste gene. Esta hipótese foi testada pelo método *codon-based Z-test*¹¹² sendo suportada estatisticamente para todos os grupos ($p_{Z-test} < 0,001$).

Tabela 7: Análise das distâncias moleculares, substituições sinónimas e não-sinónimas para as sequências correspondentes ao gene completo e segmentos 1, 2 e 3 do gene *homC*.

Sequências <i>homC</i>	Distância molecular		Ks ^{&}	Ka ^{&}	Ka/Ks [#]
	nucleótidos	aminoácidos			
Todas as Estirpes (n=165)					
gene completo	0,110±0,004*	0,128±0,008	0,227±0,010	0,076±0,005	0,335±0,027
segmento1	0,131±0,005	0,138±0,010	0,264±0,011	0,093±0,006	0,352±0,027
segmento 2	0,168±0,010	0,197±0,021	0,273±0,016	0,138±0,016	0,505±0,066
segmento 3	0,072±0,005	0,039±0,008	0,226±0,039	0,027±0,005	0,119±0,030
Estirpes Grupo Ocidental (n=77)					
gene completo	0,056±0,003	0,059±0,005	0,147±0,009	0,031±0,003	0,211±0,024
segmento 1	0,067±0,003	0,050±0,006	0,187±0,010	0,033±0,004	0,176±0,023
segmento 2	0,106±0,007	0,113±0,013	0,209±0,017	0,076±0,009	0,364±0,052
segmento 3	0,062±0,005	0,037±0,008	0,184±0,031	0,025±0,005	0,136±0,036
Estirpes Grupo Oriental/Ameríndio (n=68)					
gene completo	0,027±0,002	0,025±0,002	0,074±0,006	0,013±0,001	0,176±0,020
segmento 1	0,068±0,003	0,022±0,003	0,227±0,009	0,021±0,003	0,093±0,014
segmento 2	0,079±0,006	0,041±0,007	0,240±0,040	0,033±0,006	0,138±0,034
segmento 3	0,066±0,005	0,020±0,005	0,232±0,053	0,018±0,004	0,078±0,025

Continuação Tabela 7.

Sequências <i>homC</i>	Distância molecular		Ks ^{&}	Ka ^{&}	Ka/Ks [#]
	nucleótidos	aminoácidos			
Estirpes Grupo Africano (n=20)					
gene completo	0,045±0,003	0,040±0,004	0,124±0,008	0,020±0,002	0,161±0,019
segmento 1	0,062±0,003	0,033±0,005	0,193±0,012	0,024±0,003	0,124±0,017
segmento 2	0,088±0,006	0,075±0,011	0,204±0,022	0,054±0,007	0,265±0,045
segmento 3	0,062±0,005	0,028±0,007	0,202±0,046	0,021±0,004	0,104±0,031

n, número de sequências analisadas.

[&] Ks, substituições sinónimas; Ka, substituições não-sinónimas.

* valor±erro.

[#] $p_{Z\text{-test}} < 0,001$ para hipótese purificadora ($Ka/Ks < 1$).

Procedeu-se também à determinação dos parâmetros evolutivos nas sequências de nucleótidos e de aminoácidos correspondentes para o gene completo e para os segmentos 1, 2 e 3 de *homC* para cada variante alélica (AI, AII, AIII e AIV), exceptuando os alelos raros (Tabela 8).

Comparando as distâncias moleculares, os valores obtidos para o gene completo das estirpes de cada alelo são muito semelhantes, e mostram que existe uma distância pequena entre as sequências. As sequências do alelo AIV são as que apresentam a distância molecular menor (0,028±0,002) e as sequências do alelo AII a distância maior (0,080±0,003). Nos segmentos 1, 2 e 3, verifica-se também que os valores das distâncias moleculares são muito semelhantes em todos os alelos, com a excepção do alelo AII que apresenta no segmento 1 uma distância molecular muito superior (0,107±0,004), o que era de esperar, pois este alelo está presente nos três

grupos de estirpes (Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano) e é no segmento 1 que existe a separação das estirpes segundo a origem geográfica.

Tendo em conta as substituições sinónimas e não-sinónimas, nota-se que existe uma maior frequência de substituições sinónimas do que não-sinónimas e os valores da razão Ka/Ks obtidos para todos os alelos são muito semelhantes mantendo-se todos inferiores a 1, sugerindo uma selecção purificadora. Foi testada novamente a hipótese de selecção purificadora, sendo suportada estatisticamente (Tabela 8).

Tabela 8: Análise das distâncias moleculares, substituições sinónimas e não-sinónimas para as sequências correspondentes ao gene completo e segmentos 1, 2 e 3 do gene *homC* dos alelos mais prevalentes.

Sequências <i>homC</i>	Distância molecular		$Ks^{\&}$	$Ka^{\&}$	$Ka/Ks^{\#}$
	nucleótidos	aminoácidos			
Estirpes Alelo I (n=51)					
gene completo	0,047±0,003*	0,046±0,004	0,135±0,009	0,022±0,002	0,163±0,018
segmento 1	0,069±0,003	0,050±0,006	0,197±0,010	0,033±0,004	0,168±0,022
segmento 2	0,067±0,005	0,048±0,010	0,190±0,025	0,031±0,006	0,163±0,038
segmento 3	0,064±0,004	0,035±0,008	0,192±0,035	0,024±0,005	0,125±0,035

Continuação Tabela 8.

Sequências <i>homC</i>	Distância molecular		Ks ^{&}	Ka ^{&}	Ka/Ks [#]
	nucleótidos	aminoácidos			
Estirpes Alelo II (n=26)					
gene completo	0,080±0,003	0,087±0,006	0,190±0,010	0,048±0,003	0,253±0,021
segmento 1	0,107±0,004	0,119±0,009	0,206±0,011	0,078±0,006	0,379±0,035
segmento 2	0,066±0,005	0,056±0,010	0,169±0,022	0,036±0,006	0,213±0,045
segmento 3	0,058±0,005	0,040±0,009	0,173±0,036	0,025±0,005	0,145±0,042
Estirpes Alelo III (n=15)					
gene completo	0,047±0,003	0,048±0,004	0,131±0,009	0,023±0,002	0,176±0,017
segmento 1	0,085±0,003	0,045±0,006	0,266±0,018	0,034±0,004	0,128±0,017
segmento 2	0,087±0,006	0,061±0,011	0,246±0,025	0,041±0,007	0,167±0,033
segmento 3	0,081±0,006	0,042±0,009	0,255±0,031	0,031±0,006	0,122±0,028
Estirpes Alelo IV (n=68)					
gene completo	0,028±0,002	0,024±0,003	0,085±0,005	0,011±0,001	0,129±0,014
segmento 1	0,070±0,003	0,021±0,003	0,241±0,010	0,020±0,003	0,083±0,013
segmento 2	0,078±0,006	0,032±0,007	0,250±0,040	0,028±0,006	0,112±0,030
segmento 3	0,072±0,005	0,023±0,005	0,249±0,056	0,021±0,004	0,084±0,025

n, número de sequências analisadas.

[&] Ks, substituições sinónimas; Ka, substituições não-sinónimas.^{*} valor±erro.[#] $p_{Z\text{-test}} < 0,001$ para hipótese purificadora (Ka/Ks < 1).

2.3.2. gene *homD*

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos do gene *homD* foram analisadas sendo determinados os parâmetros evolutivos que se encontram resumidos na Tabela 9.

Em relação às distâncias moleculares, os valores obtidos mostram que existe uma conservação a nível dos nucleótidos e dos aminoácidos, corroborando os resultados obtidos com as árvores filogenéticas (Figura 9) e a análise de similaridade (Figura 22).

A análise das substituições sinónimas e não-sinónimas, mostrou uma maior frequência para as substituições sinónimas do que para as não-sinónimas e o valor da razão Ka/Ks obtido foi inferior a 1, sugerindo novamente uma selecção purificadora. A hipótese de selecção purificadora foi testada, sendo suportada estatisticamente ($p_{Z\text{-test}} < 0,001$).

Tabela 9: Análise das distâncias moleculares, substituições sinónimas e não-sinónimas para as sequências correspondentes ao gene completo do gene *homD*.

Sequências <i>homD</i> (n=129)		
Distância molecular	nucleótidos	0,052±0,002*
	aminoácidos	0,043±0,004
	Ks ^{&}	0,167±0,010
	Ka ^{&}	0,023±0,003
	Ka/Ks [#]	0,138±0,020

n, número de sequências analisadas.

[&] Ks, substituições sinónimas; Ka, substituições não-sinónimas.

* valor±erro.

[#] $p_{Z\text{-test}} < 0,001$ para hipótese purificadora ($Ka/Ks < 1$).

3. ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA HomD

As sequências de proteínas HomD de *H. pylori* foram analisadas *in silico* prevendo-se a sua imunogenicidade baseada nos parâmetros: índice de antigenicidade, hidrofiliçidade e a probabilidade de exposição à superfície, utilizando o programa *Protean software, DNASTAR package* (Version 5.0).

Os índices de antigenicidade foram determinados pelo método de *Jameson-Wolf*⁷⁵ que prevê índices de antigenicidade combinando valores de hidrofiliçidade e probabilidade de exposição à superfície. A hidrofiliçidade foi determinada pelo método *Kyte-Doolittle*⁸⁹ que prevê as regiões hidrofílicas da proteína a partir das suas sequências de aminoácidos atribuindo valores a todos os aminoácidos. A probabilidade de exposição à superfície foi calculada pelo método

*Emini*⁴⁹ que prevê a probabilidade de uma determinada região encontrar-se à superfície com tendência ao longo de um intervalo de cinco aminoácidos.

Para tal, três sequências de proteínas foram analisadas tendo em conta o menor (2 KP), o intermédio (5 KP) e o maior (9 KP) número de repetições de motivos KP, baseadas em: uma estirpe para 2 KP, na sequência *consensus* de 69 estirpes para 5 KP e na sequência *consensus* de sete estirpes para 9 KP. A Figura 28 mostra os perfis de cada parâmetro obtido. Foram identificados vários motivos de aminoácidos potencialmente imunoreactivos em que os valores dos parâmetros em análise sobem em comparação com as regiões adjacentes (resultados não mostrados). No entanto, a região das repetições dos motivos KP foi a região que exibiu os valores mais elevados (índice de antigenicidade: 6,82; probabilidade de exposição à superfície: 2,95 e hidrofiliçidade: 2,71). E a extensão desta região é proporcional ao número de repetições. A título de exemplo, comparam-se estes valores com o valor médio obtido para a região da proteína antes e depois das repetições (Figura 28).

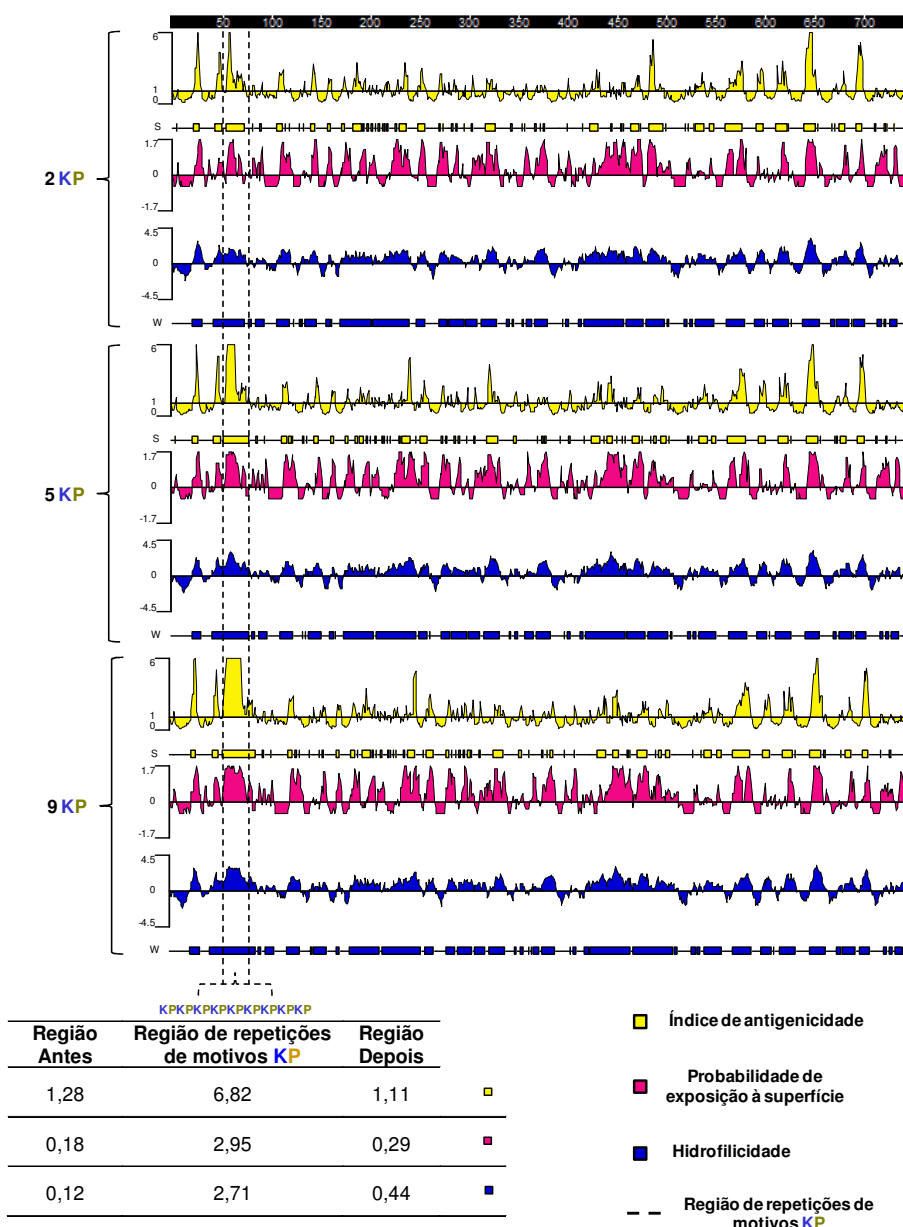


Figura 28: Representação gráfica dos perfis de índice de antigenicidade de probabilidade de exposição à superfície da bactéria e de hidrofiliidade e de seqüências de proteínas HomD exemplificativas do número menor (2 KP), número intermédio (5 KP) e maior (9 KP) número de repetições de motivos KP nas proteínas HomD. No quadro, estão representados os valores médios dos parâmetros avaliados na região com 9 repetições de motivos KP, e nas regiões antes e depois das repetições.

4. ENSAIOS *IN VITRO*

Para avaliar a contribuição das proteínas HomC e HomD para as características pro-inflamatórias de *H. pylori* e o papel destas proteínas na adesão de *H. pylori* à mucosa gástrica foram realizados ensaios de indução da secreção *in vitro* da citocina inflamatória IL-8 e ensaios de aderência *in vitro*. Para tal, utilizaram-se duas estirpes de referência de *H. pylori*, 26695 e J99, sete estirpes selvagens e as correspondentes sete estirpes mutantes para os genes *homC* e *homD* (Tabela 10).

Tabela 10: Características das estirpes de *Helicobacter pylori* e dos respectivos genes *homC* e *homD* utilizados para a construção dos mutantes.

Nº estirpe [#]	Patologia [*]	<i>cag</i> PAI	<i>homC</i>		<i>homD</i>	
			tamanho (pb)	alelo	tamanho (pb)	repetições de motivos KP
36/00	G	-	2118	AIII	2241	5
565/99	G	-	2118	AI	2235	5
351/99 ^{&}	UP	+	2091	AV	2247	6
417/02	UP	+	2109	AI	2241	5
559/02	UP	+	2118	AII	2247	6
771/99 ^{&}	UP	+	2118	AI	2247	6
1776/05	UP	+	2118	AI	2235	5

[#] Todas as estirpes foram isoladas de indivíduos de nacionalidade Portuguesa.

^{*} G, gastrite; UP, úlcera péptica.

[&] Para estas duas estirpes não foi possível obter mutantes para o gene *homD*.

A secreção de IL-8 pelas células epiteliais é dependente da presença do ilhéu de patogenicidade *cag* PAI funcional. Como esperado, a quantidade média de secreção de IL-8 foi mais alta para as estirpes positivas para o ilhéu *cag* PAI (656,0pg/ml) do que para as estirpes negativas (50,3pg/ml) (Figura 29A). Considerando as estirpes positivas para *cag* PAI, os níveis de secreção de IL-8 obtidos para as estirpes 351/99, 559/02 e 1776/05 mutantes para o gene *homC* foram significativamente mais baixos ($p < 0,05$) que os valores obtidos para as estirpes selvagens. A estirpe 417/02 mutante para o gene *homC* também mostrou níveis de secreção de IL-8 mais baixos, mas não significativos, quando comparada com a estirpe selvagem. O mesmo não foi observado para a estirpe 771/99. Em relação às estirpes negativas para *cag* PAI (36/00, 565/99), também foi observada uma redução significativa na secreção de IL-8 em ambas as estirpes. Tendo em conta as estirpes mutantes para o gene *homD*, apenas se verificou uma redução, mas não significativa, da secreção de IL-8 nas estirpes 417/02 e 36/00.

Nos ensaios de adesão, todas as estirpes de *H. pylori* estudadas mostraram capacidade de aderir às células epiteliais gástricas humanas (Figura 29B). A disrupção no gene *homC* nas estirpes 36/00, 351/99 e 417/02, levou a uma diminuição significativa na adesão às células epiteliais gástricas. No entanto, o mesmo não se verificou para a estirpe 565/99, que mostrou uma redução dos níveis de adesão mas não significativa, e nas estirpes 559/02, 771/99 e 1776/05, que não mostraram nenhuma redução. Relativamente ao gene *homD*, e considerando que a adesão da bactéria é essencial para a indução da IL-8, não foram realizados os ensaios de adesão pois não houve diferença estatisticamente significativa nos ensaios de indução de secreção de IL-8 para os mutantes *homD*.

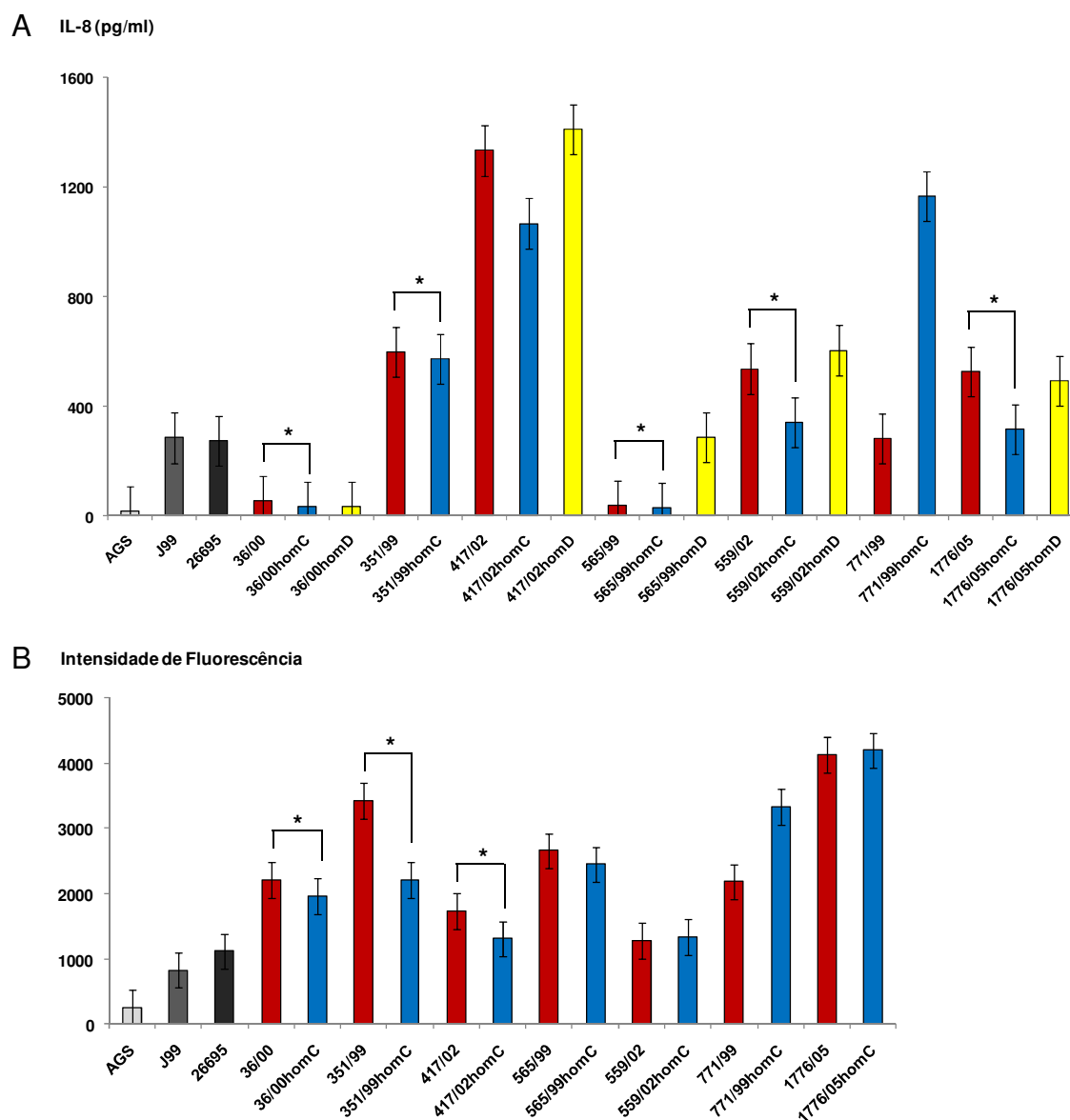


Figura 29: Ensaios *in vitro* da indução da secreção de IL-8 (A) e de adesão às células epiteliais gástricas (B), utilizando estirpes selvagens e mutantes de *Helicobacter pylori* para os genes *homC* e *homD*. Foram utilizadas duas estirpes de referência de *Helicobacter pylori*, J99 e 26695, e sete estirpes selvagens (vermelho) e as correspondentes estirpes mutantes para o gene *homC* (azul) e o gene *homD* (amarelo), das quais cinco são *cag* PAI-positivas (351/99, 417/02, 559/02, 771/99 e 1776/05) e duas *cag* PAI-negativas (36/00 e 565/99). Os valores correspondem à

média de triplicados (\pm erro). *Reduções significativas ($p < 0,05$) nos níveis de secreção de IL-8 e de adesão.

5. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIGÉNICAS DE HomC E HomD.

A antigenicidade das proteínas HomC e HomD foi avaliada através da construção de proteínas recombinantes e o seu carácter antigénico foi determinado por *Western blot* com soros de doentes.

As proteínas recombinantes HomC e HomD (rHpHomC e rHpHomD, respectivamente) foram preparadas utilizando o vector de fusão Glutathione-S-Transferase (GST) pGEX-4T-3 (GE Healthcare) e as ORFs correspondentes aos genes *homC* e *homD* da estirpe de referência 26695. Após várias tentativas, a etapa da clonagem do gene *homC* no vector de expressão não foi bem sucedida, pelo que os resultados mostrados são só referentes à proteína rHpHomD.

Os lisados proteicos da cultura não induzida e induzida com IPTG, correspondentes à proteína rHpHomD, foram separados por SDS-PAGE num gel a 10% e corados com solução de azul de Coomassie. Pela análise do gel de SDS-PAGE (Figura 30), verificou-se a produção da rHpHomD ao longo de um período de 3h de indução por IPTG. De seguida, os lisados proteicos da cultura não induzida e induzida ao fim de 3h com IPTG foram novamente separados por SDS-PAGE num gel a 10% e transferidos para uma membrana de PVDF, para incubação com diferentes soros, em ensaios de *Western blot*.

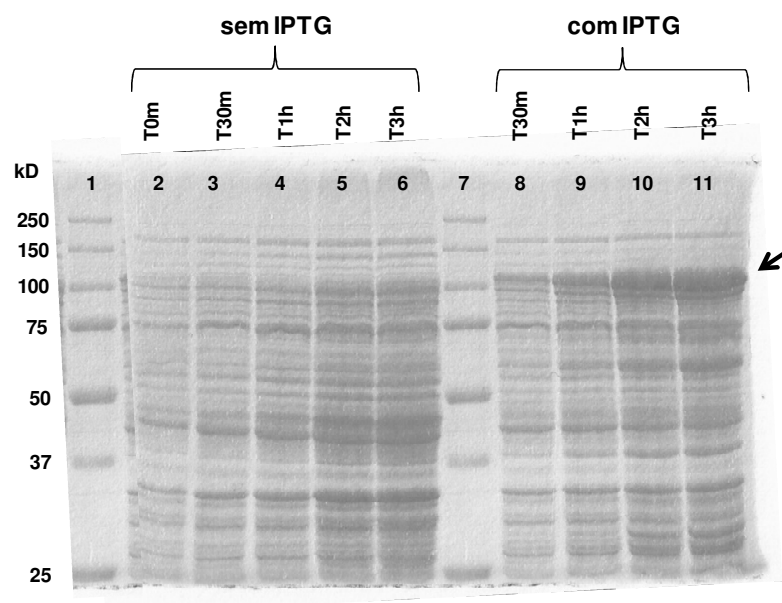


Figura 30: Lisados proteicos separados por SDS-PAGE e corados com solução de azul de Coomassie da cultura não induzida e induzida com IPTG, correspondentes à proteína rHpHomD. As linhas 1 e 7 representam o marcador de peso molecular *Precision Plus ProteinTM Standards* (com fragmentos de 10 kDa a 250 kDa) (Bio Rad Laboratories Ltd.); linhas 2-6 lisados proteicos da cultura não induzida nos tempos 0min, 30min, 1h, 2h e 3h; linhas 8-11 lisados proteicos da cultura induzida nos tempos 30min, 1h, 2h e 3h. A seta indica a banda correspondente à proteína rHpHomD.

A membrana foi incubada separadamente com uma *pool* de cinco soros de doentes com um título positivo de IgG anti-*H. pylori*, previamente determinado com um kit comercial *Pyloriset EIA-G III*, e uma *pool* de cinco soros de doentes com um título negativo de IgG anti-*H. pylori*, que foi utilizada como controlo negativo. Com a *pool* de soros positivos obtiveram-se perfis complexos, com ligação dos anticorpos a diversas proteínas. No entanto, comparando os lisados proteicos induzido e não

induzido, verificou-se uma forte reacção dos soros positivos com uma proteína presente no lisado induzido, de tamanho molecular aproximado de 100 kD, ausente no lisado não induzido. Esta ligação foi também observada com o anticorpo anti-GST na cultura induzida, confirmando que se trata da proteína rHpHomD. Com a *pool* de soros negativos, também se observou uma ligação mais fraca a algumas proteínas, mas sem reacção com a proteína rHpHomD (Figura 31).

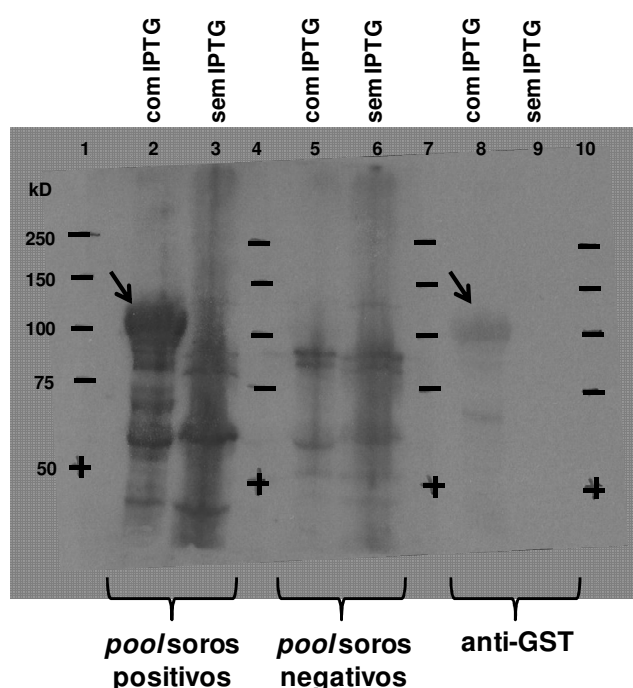


Figura 31: Análise da antigenicidade da proteína recombinante HomD em lisados proteicos separados por SDS-PAGE da cultura induzida e não induzida com IPTG durante 3h: as linhas 2 e 3 *pool* de soros humanos positivos para IgG anti-*Helicobacter pylori*; linhas 5 e 6 *pool* de soros humanos negativos para IgG anti-*Helicobacter pylori*; e linhas 8 e 9 soro anti-GST. As linhas 1, 4, 7 e 10 representam o marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Standards* (com fragmentos de 10 kDa a 250 kDa).

Capítulo V: Discussão e Conclusão

O presente trabalho teve como objectivo o estudo de dois membros das OMPs de *H. pylori*, *homC* e *homD*, nomeadamente o estudo da sua diversidade genética e evolução, e o esclarecimento do seu papel na virulência de *H. pylori*.

Primeiramente, foi avaliada a distribuição e diversidade genómica dos genes *homC* e *homD*, num painel de 189 estirpes de *H. pylori* isoladas de doentes de origem geográfica diferente e apresentando diversas gastropatologias, através de representações gráficas de similaridade, análise de filogenia e determinação de parâmetros evolutivos, nas sequências de nucleótidos e respectivas sequências de aminoácidos previstas.

A análise dos genes *homC* e *homD* revelou a presença de uma ORF completa em todas as estirpes de *H. pylori* analisadas, e conservação ao nível do número de cópias e localização genómica, independentemente da patologia ou da origem geográfica da estirpe. A presença de uma cópia de cada gene em todas as estirpes sugere que estes genes que codificam para OMPs estão sobre pressão selectiva para serem mantidos na bactéria, como já foi descrito para outros genes codificantes de OMPs, tais como *homA/homB*, *babA/babB*, *sabA* e *oipA*^{72,95,118,173}.

Em relação ao gene *homC*, a reconstrução filogenética sugere uma influência baseada na origem geográfica, com as estirpes de origem Ocidental, Oriental/Ameríndio e Africano a apresentarem uma maior divergência entre elas. Esta divergência foi também observada noutros genes de *H. pylori*, tais como, genes

de virulência (*cagA*, *vacA*), genes *housekeeping* e genes que codificam outras OMPs, nomeadamente *homA/homB* e *babA/babB*^{1,82,120,137}.

Os gráficos de similaridade também mostraram a segregação das estirpes por origem geográfica, expressa no segmento 1 do gene *homC*. Foi também observado no segmento 2 um maior nível de diversidade, que se traduz em diferentes variantes alélicas, sendo o segmento 3 o mais conservado. Estes resultados sugerem que a divergência no segmento 1 estará directamente relacionada com uma forte pressão selectiva do hospedeiro. Já o grau de variabilidade do segmento 2 do gene *homC*, suporta a hipótese de que este gene possa estar envolvido na geração de diversidade antigénica, no entanto, a hipótese de selecção por parte do hospedeiro também não pode ser descartada, já que são observados alelos específicos de região geográfica. A variação alélica também foi descrita para outros membros da família das OMPs, tais como genes *homA/homB*, *babA/babB*, *hopQ* e *hopZ*, que partilham um perfil genómico segmentado conservado, com a existência de pelo menos duas variantes alélicas altamente conservadas^{25,120,132,137}. Contrariamente aos segmentos 1 e 2, a conservação do segmento 3 do gene *homC* sugere que esta região possa codificar porções da proteína essenciais para a função ou integridade estrutural destas moléculas.

Para o gene *homC*, foram identificadas oito variantes alélicas diferentes (alelos AI a AVIII), bastante conservadas, sendo três delas predominantes, alelos AI, AII e AIV, e dependentes da origem geográfica da estirpe. O alelo AI é predominante e exclusivo das estirpes do grupo Ocidental, e o alelo AIV é predominante nas estirpes do grupo Oriental/Ameríndio e não foi observado nas estirpes do grupo Ocidental. Já o alelo AII é predominante nas estirpes do grupo Africano e é o único transversal aos

três grupos geográficos. A presença do alelo All nos três grupos de estirpes de origem geográfica diferente reflecte a evidência de que *H. pylori* já colonizava o Homem antes das migrações de África⁹¹, e sugere que as outras variantes alélicas possam ter resultado da adaptação ao hospedeiro visto haver especificidade geográfica de algumas variantes. O alelo AVIII foi apenas encontrado na estirpe de referência de *H. pylori* B8, que é uma estirpe adaptada ao Gerbil (Esquilo da Mongólia)⁵⁵, sugerindo também que as diferentes variantes alélicas do gene *homC* estão provavelmente envolvidas na adaptação da bactéria ao hospedeiro.

No geral, o alelo All foi significativamente associado à UP, no entanto, quando se considerou individualmente cada grupo geográfico, apenas foi observada uma tendência sem significado estatístico, provavelmente devido ao pequeno número de estirpes estudadas em cada caso. O alelo AI também mostrou ter uma associação com a gastrite nas estirpes do grupo Ocidental, mas sem significado estatístico, enquanto que o alelo IV não apresentou nenhuma correlação com a patologia. Os alelos AI e AIV mostraram uma correlação significativa com o perfil mais virulento. Estes resultados também sugerem que as variantes alélicas podem constituir marcadores da patologia gástrica e da virulência da estirpe. Tal como já foi reportado para o gene *hopQ*, em que os alelos podem ser indicadores úteis para identificar estirpes de *H. pylori* ulcerogénicas. De facto, foi demonstrado que o alelo *hopQ* tipo I é significativamente mais frequente nas estirpes *cag* PAI+/*vacAs1* isoladas de doentes com úlcera péptica do que nas estirpes *cag* PAI-/*vacAs2* isoladas de doentes sem doença ulcerosa²⁵.

Contrariamente ao gene *homC*, o gene *homD* mostra, no geral, uma maior conservação genómica independentemente da origem geográfica das estirpes

analisadas. No entanto, pela análise filogenética, é também possível observar segregação das estirpes por região geográfica, embora menos marcada que para o gene *homC*.

O elevado grau de similaridade entre as sequências do gene *homD* analisadas não sugere a existência de variantes alélicas. A diferença maioritária entre as sequências deste gene foi a presença de uma pequena região variável, que pode codificar para um péptido de 10 aminoácidos específico, perfil este mais prevalente nas estirpes de origem Ocidental do que nas estirpes de origem Oriental/Ameríndia e Africana. O facto de este péptido existir também em quatro alelos do gene *homC* (alelos AII, AIII, AIV e AVIII), sendo três deles os mais prevalentes, sugere a existência frequente de fenómenos de recombinação entre estes membros da família *hom*. Estes eventos de recombinação foram já descritos para outros genes desta família, *homA* e *homB*, tendo-se demonstrado que estão envolvidos no aumento da variabilidade alélica, onde as variantes alélicas mais prevalentes resultaram da recombinação entre os alelos mais raros. Globalmente, estes resultados sugerem que as novas combinações genéticas podem proporcionar uma vantagem biológica às estirpes de *H. pylori*¹¹⁹. A recombinação intergenómica em alguns genes parólogos que codificam para OMPs pode ocorrer durante a infecção, reflectindo a pressão selectiva, por exemplo, para a adesão, e diferir em diferentes hospedeiros, bem como no mesmo indivíduo ao longo do tempo de infecção^{3,151}.

No terminal-N das proteínas HomD foi observada uma zona de repetições de motivos de Lisina-Prolina (KP) que varia entre 2-9 KP, sendo 5 KP o número de motivos repetidos mais frequentemente observado. No geral, verificou-se uma correlação entre um menor número de repetições de motivos KP (≤ 4 KP) e a UP e o

maior número de repetições (≥ 7 KP) e a gastrite, no entanto, sem significado estatístico, provavelmente devido ao reduzido número de casos analisados. Estes resultados sugerem que o perfil de repetições KP possa constituir um marcador de doença gástrica, no entanto, será necessário avaliar um maior número de estirpes. Não foi observada nenhuma correlação entre o número de repetições KP e a virulência da estirpe.

A região com a repetição dos motivos KP foi também descrita noutra proteína de *H. pylori*, TonB, que está implicada no transporte do ferro em várias espécies de bactérias Gram negativas e que foi mostrada ser muito imunogénica, podendo constituir um candidato promissor como antigénio para uma vacina^{79,103}. Um destes estudos mostrou também que a antigenicidade estava relacionada com a região de motivos repetidos KP, pois esta região está acessível aos anticorpos e induz uma forte resposta imunitária no hospedeiro¹⁰³. A corroborar estes dados, a análise *in silico* da proteína HomD mostrou que a região com a repetição dos motivos KP é a que exhibe valores mais elevados de índice de antigenicidade, de probabilidade de exposição à superfície e de hidrofobicidade, sugerindo o seu carácter imunogénico. De facto, os ensaios de *Western blot* mostraram que a proteína recombinante HomD (rHpHomD) é bastante imunoreactiva à *pool* de soros de doentes com um título positivo de IgG anti-*H. pylori*. A antigenicidade de HomD também já tinha sido descrita anteriormente em estudos de análise de fracções de OMPs de *H. pylori* por electroforese bidimensional, espectrometria de massa e *Western blot*¹¹⁸. No geral, estes resultados sugerem que a proteína HomD é um potencial antigénio de *H. pylori* e poderá constituir um novo alvo vacinal ou terapêutico. Além disso, dado que a região de repetições de motivos KP é uma região variável de estirpe para estirpe,

pode especular-se que esta variação terá alguma importância biológica para a bactéria.

No que diz respeito aos parâmetros evolutivos, a determinação da distância molecular no gene *homC*, mostrou que as estirpes do grupo Ocidental apresentam uma maior distância molecular, enquanto que o grupo Oriental/Ameríndio apresenta uma menor variabilidade. O gene *homD* mostrou uma maior conservação a nível das sequências de nucleótidos e de aminoácidos. A análise das substituições sinónimas e não-sinónimas de ambos os genes *homC* e *homD*, mostrou uma maior frequência para as substituições sinónimas do que para as não-sinónimas e o valor da razão Ka/Ks obtido (<1) sugere uma selecção purificadora a actuar nestes genes, reflectindo uma pressão selectiva a favor da conservação destas OMPs na evolução da bactéria. A conservação destas OMPs sugere uma importância na adaptação e/ou sobrevivência da bactéria no hospedeiro.

De modo a esclarecer o papel destas proteínas na virulência de *H. pylori*, foram realizados estudos funcionais, avaliando a contribuição das proteínas HomC e HomD para as características pro-inflamatórias de *H. pylori* e o papel destas proteínas na adesão de *H. pylori* à mucosa gástrica, utilizando estirpes selvagens e as correspondentes estirpes mutantes para os genes *homC* e *homD* em ensaios *in vitro*.

A inactivação do gene *homC* causou uma redução significativa na produção de IL-8 na maior parte das estirpes positivas para o ilhéu *cag* PAI. Em relação às estirpes negativas para *cag* PAI, também se observou uma redução significativa na secreção de IL-8. No entanto, nas estirpes mutantes para o gene *homD*, verificou-se uma redução, mas não significativa, da secreção de IL-8 em apenas duas das

estirpes estudadas, uma positiva e outra negativa para *cag* PAI. Estes resultados sugerem que o gene *homC* é capaz de promover uma resposta pro-inflamatória pelas células epiteliais gástricas. O mesmo não se observa para o gene *homD*.

A activação das vias de sinalização nas células do hospedeiro, que levam à síntese da citocina IL-8, pressupõe a adesão da bactéria às células gástricas. É esse estado que permite à bactéria injectar, através dos sistemas de secreção, peptidoglicano e a proteína CagA¹⁶⁶. Assim, a adesão será sempre um mecanismo a montante da activação das vias de sinalização. Neste sentido seria de esperar um envolvimento do gene *homC* no mecanismo de adesão. Os ensaios *in vitro* de adesão mostraram que a disrupção do gene *homC* não levou a uma diminuição significativa na adesão às células epiteliais gástricas na maioria das estirpes. Assim, o facto de a disrupção do gene não ter impedido completamente a adesão sugere que HomC não será das principais OMPs envolvidas neste mecanismo. De facto, sabe-se que a aderência de *H. pylori* ao epitélio gástrico humano é mediada principalmente pelas adesinas BabA e SabA^{8,95}.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o gene *homC* estará implicado na interacção entre *H. pylori* e o hospedeiro, contribuindo para a virulência desta bactéria. O gene *homD* parece ser um importante antigénio de *H. pylori*, e devido à sua elevada conservação a nível mundial, poderá constituir um novo alvo vacinal ou terapêutico.

Capítulo VI: Bibliografia

1. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, Suerbaum S, Thompson SA, van der Ende A, van Doorn LJ. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Molecular Microbiology* 1999; 32: 459-470.
2. Akhter Y, Ahmed I, Devi SM, Ahmed N. The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. *Infectious Agents and Cancer* 2007; 2: 2.
3. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock REW, Trust TJ. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: Analysis of the outer membrane protein families. *Infection and Immunity* 2000; 68: 4155-4168.
4. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic–sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397:176-180.
5. Andersen LP, Wadstrom T. Basic Bacteriology and Culture. *In* Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, Ed. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington DC: ASM Press, 2001; 27-38.

6. Aras RA, Lee Y, Kim SK, Israel D, Peek RM, Blaser MJ. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. *Journal of Infectious Diseases* 2003; 188: 486-496.
7. Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 191:593–602.
8. Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vikstrom S, Sjostrom R, Linden S, Backstrom A, Lundberg C, Arnqvist A, Mahdavi J, Nilsson UJ, Velapatino B, Gilman RH, Gerhard M, Alarcon T, Lopez Brea M, Nakazawa T, Fox JG, Correa P, Dominguez Bello MG, Perez Perez GI, Blaser MJ, Normark S, Carlstedt I, Oscarson S, Teneberg S, Berg DE, Boren T. Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* 2004; 305: 519-522.
9. Atherton J, Blaser M. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119: 2475-2487.
10. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* - Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 17771-17777.

11. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99.
12. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology* 2006; 1: 63-96.
13. Audibert C, Burucoa C, Janvier B, Fauchere JL. Implication of the structure of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. *Infection and Immunity* 2001; 69: 1625-1629.
14. Backstrom A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg DE, Boren T, Arnqvist A. Metastability of *Helicobacter pylori bab* adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 16923-16928.
15. Baltrus DA, Amieva MR, Covacci A, Lowe TM, Merrell DS, Ottemann KM, Stein M, Salama NR, Guillemin K. The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27. *Journal of Bacteriology* 2009; 191:447-448.
16. Bardhan PK. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 25: 973-978.
17. Bellack NR, Koehoorn MW, MacNab YC, Morshed MG. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiology and Infection* 2006; 134: 439-449.
18. Benson JA, Fode-Vaughan KA, Collins MLP. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. *Letters in Applied Microbiology* 2004; 39: 221-225.

19. Bina JE, Alm RA, UriaNickelsen M, Thomas SR, Trust TJ, Hancock REW. *Helicobacter pylori* uptake and efflux: Basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44: 248-254.
20. Bizzozero G. Ueber die schlauchförmigen drüsen des Magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie* 1893; 42: 82-152.
21. Bodger K, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *British Medical Bulletin* 1998; 54: 139-150.
22. Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262: 1892-1895.
23. Brown LM. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews* 2000; 22: 283-297.
24. Bunn JEG, Mackay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Letters in Applied Microbiology* 2002; 34: 450-454.
25. Cao P, Cover TL. Two different families of *hopQ* alleles in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 4504-451.
26. Cavalier-Smith T. The neomuran origin of Archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; 52: 7-76.
27. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type

- I-specific and disease-associated virulence factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996; 93: 14648-14653.
28. Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends in Microbiology 2000; 8:354–360.
29. Clyne M, Dolan B, Reeves E. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiology Letters 2007; 268: 135–143.
30. Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. Journal of Bacteriology 2004;. 186: 3124-3132.
31. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993; 90:5791–5795.
32. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nature Reviews Microbiology 2005; 3: 320–332.
33. Cover TL, Cao P, Lind DL, Tham KT, Blaser MJ. Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates *in vitro* and *in vivo*. Infection and Immunity 1993; 61: 5008-5012.

34. Cover TL, Hanson PI, Heuser JE. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *Journal of Cell Biology* 1997; 138: 759–769.
35. Cover TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology* 1996; 20: 241-246.
36. Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JL, Heatley RV, Shallcross TM, Tompkins DS, Rathbone BJ. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991; 338: 332-335.
37. Crabtree JE. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement* 1996; 215: 3-10.
38. Datta S, Chattopadhyay S, Chowdhury A, Santra A, Saha DR, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Berg DE, Nair GB, Mukhopadhyay AK. Diagnosis and genotyping of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction of bacterial DNA from gastric juice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2005; 20: 1253-1259.
39. de Bernard M, Burrioni D, Papini E, Rappuoli R, Telford J, Montecucco C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infection and Immunity* 1998; 66: 6014-6016.
40. de Jonge R, Pot RGJ, Loffeld R, van Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG. The functional status of the *Helicobacter pylori* *sabB* adhesin gene as a putative marker for disease outcome. *Helicobacter* 2004; 9: 158-164.

41. Devi S, Taylor T, Avasthi T, Kondo S, Suzuki Y, Megraud F, Ahmed N. Genome of *Helicobacter pylori* Strain 908. *Journal of Bacteriology* 2010; 192: 6488–6489.
42. Disotell T. Discovering human history from stomach bacteria. *Genome Biology* 2003; 4: 4:213.
43. Dixon MF. Pathology of gastritis and peptic ulceration. *In* Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, Ed. *Helicobacter pylori: Physiology and genetics*. Washington DC: ASM Press, 2001; 459-470.
44. Doenges JL. Spirochaetes in gastric glands of *macacus rhesus* and humans without definite history of related disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1938; 38: 536-538.
45. Dore MP, Sepulveda AR, El Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep - Implications for transmission to humans. *American Journal of Gastroenterology* 2001; 96: 1396-1401.
46. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, Reindl W, Backert S, Saur D, Schmid RM, Rad R. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomics analysis of *hopH* gene polymorphisms. *Journal of Infectious Diseases* 2006; 194: 1346-1355.
47. Dubois A, Boren T. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cellular Microbiology* 2007; 9: 1108-1116.
48. Eaton KA. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology* 1992; 37: 123-127.

49. Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *Journal of Virology* 1985; 55:836-9.
50. Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2162-2165.
51. Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 1995; 63: 1567-1572.
52. Falk P, Roth K, Borén T, Westblom T, Gordon J, Normark S. An *in vitro* adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 2035-2039.
53. Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 15056-15061.
54. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang XY, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003; 299: 1582-1585.

-
55. Farnbacher M, Jahns T, Willrodt D, Daniel R, Haas R, Goesmann A, Kurtz S, Rieder G. Sequencing, annotation, and comparative genome analysis of the gerbil-adapted *Helicobacter pylori* strain B8. *BMC Genomics* 2010; 11:335.
 56. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology* 2001; 42:1337–1348.
 57. Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, Hoffmann R, Zimmer R, Haas R. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Research* 2010; 38: 6089–6101.
 58. Fox JG. The non-*H. pylori* *Helicobacters*: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 2002; 50: 273-283.
 59. Freeberg AS, Barron LE. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *American Journal of Digestive Diseases* 1940; 7: 443-445.
 60. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehle S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 12778-12783.
 61. Ghose C, Perez Perez GI, Dominguez Bello MG, Pride DT, Bravi CM, Blaser MJ. East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 15107-15111.

62. Goodman KJ, Correa P. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet* 2000; 355: 358-362.
63. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1989; 39: 397-405.
64. Goodwin SC, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America* 1993; 22: 5-19.
65. Greiner A, Knorr C, Qin YF, Sebald W, Schimpl A, Banchereau J, MullerHermelink HK. Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for in vitro growth and differentiation. *American Journal of Pathology* 1997; 150: 1583-1593.
66. Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner KP, Schlapbach R, Yamaoka Y, Kraft C, Suerbaum S, Meyer TF, Achtman M: Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genetics* 2005, 1:e43.
67. Gunn MC, Stephens JC, Stewart JAD, Rathbone BJ, West KP. The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *Journal of Clinical Pathology* 1998; 51: 761-764.

68. Handt L, Fox J, Dewhirst F, Fraser G, Paster B, Yan L, Rozmiarek H, Rufo R, Stalis I. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications. *Infection and Immunity* 1994; 62: 2367-2374.
69. Henderson RI, Owen P, Nataro JP. Molecular switches - the *ON* and *OFF* of bacterial phase variation. *Molecular Microbiology* 1999; 33: 919-932.
70. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99:14428–14433.
71. Houghton J, Fox JG, Wang TC. Gastric cancer: Laboratory bench to clinic. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 17: 495-502.
72. Ilver D, Arnqvist A, Ögren J, Frick I-M, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373-377.
73. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth H-P, Tham KT, Camorlinga M, Blaser MJ, Falkow S, Peek RM, Jr. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107: 611-620.
74. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RM. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human

- host. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001; 98: 14625-14630.
75. Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Computer Applications in the Biosciences* 1988; 4: 181-186.
76. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. *In* Munro HN, Ed. *Mammalian Protein Metabolism*: Academic Press, 1969; 21-132.
77. Jung SW, Sugimoto M, Graham DY, Yamaoka Y. *homB* status of *Helicobacter pylori* as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 3241–3245.
78. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* 2004; 9: 115-123.
79. Kalbina I, Engstrand L, Andersson S, Strid A. Expression of *Helicobacter pylori* TonB protein in transgenic *Arabidopsis thaliana*: toward production of vaccine antigens in plants. *Helicobacter*. 2010;15:430-7.
80. Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. *Molecular Microbiology* 1999; 31: 31-43.
81. Kersulyte D, Kalia A, Gilman RH, Mendez M, Herrera P, Cabrera L, Velapatiño B, Balqui J, Paredes Puente de la Vega F, Rodriguez Ulloa CA, Cok J, Hooper CC, Dailide G, Tamma S, Berg DE. *Helicobacter pylori* from Peruvian amerindians: traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. *PLoS One* 2010; 5: e15076.

82. Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B, Su WW, Pan ZJ, Garcia C, Hernandez V, Valdez Y, Mistry RS, Gilman RH, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Lopez Brea M, Nair GB, Chowdhury A, Datta S, Shirai M, Nakazawa T, Ally R, Segal I, Wong BCY, Lam SK, Olfat FO, Boren T, Engstrand L, Torres O, Schneider R, Thomas JE, Czinn S, Berg DE. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *Journal of Bacteriology* 2000; 182: 3210-3218.
83. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980; 16: 111-120.
84. Konno M, Fujii N, Yokota S, Sato K, Takahashi M, Mino E, Sugiyama T. Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 2246-2250.
85. Kraft C, Stack A, Josenhans C, Niehus E, Dietrich G, Correa P, Fox JG, Falush D, Suerbaum S. Genomic changes during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Bacteriology* 2006; 188: 249-254.
86. Kraft C, Suerbaum S. Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: Mechanisms and role in generating strain diversity. *International Journal of Medical Microbiology* 2005; 295: 299-305.
87. Krienitz W. Ueber das auftreten von spirochaetne verschiegener form im magen nhalt bei carcinima ventriculi. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1906; 32: 872.

88. Kusters J, van Vliet A, Kuipers E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 449-490.
89. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 1982; 157:105-32.
90. Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 26734-26741.
91. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007; 445: 915-918.
92. Madinier IM, Fosse TM, Monteil RA. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: A review. *Journal of Periodontology* 1997; 68: 2-6.
93. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, Shiratori Y, Omata M. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* 1998; 42: 338-343.
94. 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* 1999; 44: 336-341.
95. Mahdavi J, Sonden B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraia S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB,

- Arnqvist A, Hammarstrom L, Boren T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 2002; 297: 573-578.
96. Mane S, Dominguez-Bello M, Blaser M, Sobral B, Hontecillas R, Skoneczka J, Mohapatra S, Crasta O, Evans C, Modise T, Shallom S, Shukla M, Varon C, Megraud F, Maldonado-Contreras A, Williams K, Bassaganya-Riera J. Host-interactive genes in Amerindian *Helicobacter pylori* diverge from their old world homologs and mediate inflammatory responses. *Journal of Bacteriology* 2010; 192: 3078-3092.
97. Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1274-1275.
98. Marshall BJ GC. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1987; 37: 68.
99. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempts to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Medical Journal of Australia* 1985; 142: 436-439.
100. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315.
101. McColl KEL, El Omar E, Gillen D. Interactions between *H. pylori* infection, gastric acid secretion and anti-secretory therapy. *British Medical Bulletin* 1998; 54: 121-138.
102. Megraud F. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: prevalence, mechanism, detection. What's new? *Canadian Journal of Gastroenterology* 2003; 17: 49B-52B.

103. Meinke A, Storm M, Henics T, Gelbmann D, Prustomersky S, Kovács Z, Minh DB, Noiges B, Stierschneider U, Berger M, von Gabain A, Engstrand L, Nagy E. Composition of the ANTIGENome of *Helicobacter pylori* defined by human serum antibodies. *Vaccine*. 2009 27:3251-9.
104. Mitchell H, Megraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002; 1: 8-16.
105. Moese S, Selbach M, Kwok T, Brinkmann V, König W, Meyer TF, Backert S. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infection and Immunity* 2004; 72:3646–3649.
106. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001; 2: 457-466.
107. Monteiro L, Oleastro M, Pelerito A, Falcão M, Rabiais S, Baptista I, Barros I, Cordeiro M, Cabral J, Lopes AI, Ramalho P. Study of prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a paediatric population in Lisbon. *Helicobacter* 2003; 8: A06.13.
108. Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor H, Breurec S, Wu JY, Maady A, Bernhöft S, Thiberge JM, Phuanukoonnon S, Jobb G, Siba P, Graham D, Marshall B, Achtman M. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science* 2009; 323: 527-530.
109. Naumann M, Wessler S, Bartsch C, Wieland B, Covacci A, Haas R, Meyer TF. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells

- colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island. Journal of Biological Chemistry 1999; 274:31655–31662.
110. Nayak AK, Rose JB. Detection of *Helicobacter pylori* in sewage and water using a new quantitative PCR method with SYBR green. Journal of Applied Microbiology 2007; 103: 1931-1941.
111. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Molecular Biology and Evolution 1986; 3:418-426.
112. Nei M, Kumar S. Synonymous substitutions and non synonymous nucleotide substitutions. *In* Molecular Evolution and Phylogenetics Volume 1. Ed. Nei M. New York: Oxford University Press; 2000:52-61.
113. Nomura AMY, Perez Perez GI, Lee J, Stemmermann G, Blaser MJ. Relation between *Helicobacter pylori cagA* status and risk of peptic ulcer disease. American Journal of Epidemiology 2002; 155: 1054-1059.
114. Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R, Megraud F. 2000. 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. Infection and Immunity. 68:6240–6249.
115. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science 2000; 287: 1497-1500.
116. Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of

- Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Molecular Microbiology* 1999; 31: 1537-1548.
117. Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, Cordum HS, Wang C, Elliott G, Edwards J, Mardis ER, Engstrand LG, Gordon JI. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 9999-10004.
118. Oleastro M, Cordeiro R, Ferrand J, Nunes B, Lehours P, Carvalho-Oliveira I, Mendes AI, Penque D, Monteiro L, Megraud F, Menard A. Evaluation of the clinical significance of *homB*, a novel candidate marker of *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer disease. *Journal of Infectious Diseases* 2008; 198: 1379-87.
119. Oleastro M, Cordeiro R, Menard A, Gomes JP. Allelic diversity among *Helicobacter pylori* outer membrane protein genes *homB* and *homA* generated by recombination. *Journal of Bacteriology* 2010; 192: 3961-3968.
120. Oleastro M, Cordeiro R, Menard A, Yamaoka Y, Queiroz D, Megraud F, Monteiro L. Allelic diversity and phylogeny of *homB*, a novel co-virulence marker of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiology* 2009; 9: 248.
121. Oleastro M, Cordeiro R, Yamaoka Y, Queiroz D, Megraud F, Monteiro L, Menard A. Disease association with two *Helicobacter pylori* duplicate outer membrane protein genes, *homB* and *homA*. *Gut Pathogens* 2009; 1: 12.
122. Oleastro M, Gerhard M, Lopes AI, Ramalho P, Cabral J, Guerreiro AS, Monteiro L. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults

- with gastroduodenal pathology. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2003; 22: 85-91.
123. Oleastro M, Monteiro L, Lehours P, Megraud F, Menard A. Identification of markers for *Helicobacter pylori* strains isolated from children with peptic ulcer disease by suppressive subtractive hybridization. *Infection and Immunity* 2006; 74: 4064-74.
124. Oleastro M, Pelerito A, Nogueira P, Benoliel J, Santos A, Cabral J, Lopes AI, Ramalho P, Monteiro M. Prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in a healthy pediatric population in the Lisbon area. *Helicobacter* 2011; *In press*.
125. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, Voland P, Boren T, Karttunen R, Engstrand L, Rad R, Prinz C, Gerhard M. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005; 44: 151-156.
126. Oliveira AG, Santos A, Guerra JB, Rocha GG, Rocha AMC, Oliveira CA, Cabral M, Nogueira A, Queiroz DMM. *babA2* and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 3964-3966.
127. On SLW. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 90: 1S-15S.

128. Ota H, Nakayama J, Momose M, Hayama M, Akamatsu T, Katsuyama T, Graham DY, Genta RM. *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Archiv* 1998; 433: 419-426.
129. Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burroni D, Cover TL, Papini E, Rappuoli R, Telford JL, Reyrat JM. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95: 10212-10217.
130. Palli D, Masala G, Del Giudice G, Plebani M, Basso D, Berti D, M EN, Ceroti M, Peeters PH, de Mesquita HB, Buchner FL, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Krogh V, Saieva C, Vineis P, Panico S, Tumino R, Nyren O, Siman H, Berglund G, Hallmans G, Sanchez MJ, Larranaga N, Barricarte A, Navarro C, Quiros JR, Key T, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Boeing H, Weikert C, Linseisen J, Nagel G, Overvad K, Thomsen RW, Tjonneland A, Olsen A, Trichoupoulou A, Trichopoulos D, Arvaniti A, Pera G, Kaaks R, Jenab M, Ferrari P, Nesi G, Carneiro F, Riboli E, Gonzalez CA. CagA+ *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk in the EPIC-EURGAST study. *International Journal of Cancer* 2007; 120: 859-867.
131. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40: 297-301.
132. Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, Hundt E, Knapp B. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 3325-3333.

133. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-perez GI, Zhao XM, Atherton JC, Blaser M. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA(+)* *Helicobacter pylori* strains. *Laboratory Investigation* 1995; 71: 760-770.
134. Polk D, Peek R. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10: 403-414.
135. Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical Science* 2006; 110: 305-314.
136. Pride DT, Blaser MJ. Concerted evolution between duplicated genetic elements in *Helicobacter pylori*. *Journal of Molecular Biology* 2002; 316: 629-642.
137. Pride DT, Meinersmann RJ, Blaser MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori* *babA* and *babB*. *Infection and Immunity* 2001; 69: 1160-1171.
138. Quina MG, G.E.H.P. *Helicobacter pylori*: the Portuguese scene. Grupo de Estudo Português do *Helicobacter pylori* (GEPHP). *European Journal of Cancer Prevention* 1994; 3 (Suppl. 2): 65-67.
139. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *Journal of Immunology* 2002; 168: 3033-3041.
140. Rathbone BJ, Wyatt JI, Worsley BW, Shires SE, Trejdosiewicz LK, Heatley RV, Losowsky MS. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 1986; 27: 642-647.

141. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 926-936.
142. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2007; 21(2): 237-59.
143. Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Molecular Microbiology* 2003; 49: 219-234.
144. Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2006; 130: 65-72.
145. Sakamoto S, Watanabe T, Tokumaru T, Takagi H, Nakazato H, Lloyd KO. Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Research* 1989; 49: 745-752.
146. Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 14668-14673.
147. Salomon H. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1896; 19: 433-442.

148. Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 5024-5029.
149. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96:14559–14564.
150. Selbach M, Moese S, Backert S, Jungblut PR, Meyer TF. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics* 2004; 4:2961–2968.
151. Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, Syvanen M. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 2106-2111.
152. Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14: 59-97.
153. Stark RM, Gerwig GJ, Pitman RS, Potts LF, Williams NA, Greenman J, Weinzweig IP, Hirst TR, Millar MR. Biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Letters in Applied Microbiology* 1999; 28: 121-126.
154. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after *cag*-driven host cell translocation.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000; 97: 1263-1268.
155. Suerbaum S, Achtman M. Evolution of *Helicobacter pylori*: the role of recombination. Trends in Microbiology 1999; 7: 182-184.
156. Suerbaum S, Achtman M. *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. International Journal of Medical Microbiology 2004; 294: 133-139.
157. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. Nature Reviews Microbiology 2007; 5: 441–452.
158. Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. EMBO Journal 1999; 18: 5517–5527.
159. Telford JL, Ghiara P, Dell’Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce M, Censini S, Covacci A, Xiang Z, Papini E, Montecucco C, Parente L, Rappuoli R. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. Journal of Experimental Medicine 1994; 179: 1653–1658.
160. Thiberge JM, Boursaux-Eude C, Lehours P, Dillies MA, Creno S, Coppée JY, Rouy Z, Lajus A, Ma L, Burucoa C, Ruskoné-Foumestreaux A, Courillon-Mallet A, De Reuse H, Boneca I, Lamarque D, Megraud F, Delchier JC, Médigue C, Bouchier C, Labigne A, Raymond J. From array-based hybridization of

- Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. BMC Genomics 2010; 11:368.
161. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 1994; 22: 4673-80.
162. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997; 388: 539-47.
163. Tummala S, Keates S, Kelly CP. Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. Current Opinion in Gastroenterology 2004; 20: 592-597.
164. van der Woude MW, Baumler AJ. Phase and antigenic variation in bacteria. Clinical Microbiology Reviews 2004; 17: 581-611.
165. van Doorn L, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, De Boer W, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998; 115: 58-66.

166. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nature Immunology* 2004; 5: 1166-1174.
167. Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273.
168. Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, Nichols G. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 97: 690-698.
169. Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters* 2009; 282: 1-8.
170. Weyermann M, Adler G, Brenner H, Rothenbacher D. The mother as source of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiology* 2006; 17: 332-334.
171. Whitfield J. The ulcer bug: Gut reaction. *Nature* 2003; 423: 583-584.
172. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1 beta and 8 production, and *cagA* status. *Gut* 1999; 45: 804-811.
173. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (OipA) of *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 111-133.

174. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HM, Reddy R, Arnqvist A, Graham DY. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006; 55: 775-781.
175. Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 15:829-34.
176. Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y, Ohtani M, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *Journal of Infectious Diseases* 2003; 187:334–337.

Anexos

Anexo I: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE ESTIRPES DE *Helicobacter pylori*

Reagentes e Material:

- Meio HP selectivo (Agar *Wilkins Chalgrin* suplementado com Vancomicina (10mg/ml), Trimetoprim (5mg/ml), Fungizona (1ml), Cefsulodina (2mg/ml) e com 10% de sangue de cavalo) (Biogerm)
- Meio HP não selectivo (Agar *Wilkins Chalgrin* suplementado com 10% de sangue de cavalo) (Biogerm)
- Meio TSB (*Trypticase Soya Broth*) com 15% de Glicerol
- Jarras de anaerobiose *Mart® Microbiology* (Mart Microbiology B.V., Drachten, Holanda)

Equipamento:

- Sistema gerador de gás *Anoxomat™* (Mart Microbiology B.V.)

Procedimento:

Isolamento:

Descongelou-se um tubo contendo a estirpe conservada a -80°C em TBS com 15% de glicerol, e semeou-se o homogeneizado em meio selectivo (HP selectivo) e em meio não selectivo (HP não selectivo). De seguida, as placas foram incubadas a

37°C, em atmosfera de microaerofilia (5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂). A atmosfera foi obtida por um sistema gerador de gás *Anoxomat*TM. Prolongou-se a incubação durante dois dias, com renovação da atmosfera e observação diária das placas.

Identificação presuntiva:

Foi observada a morfologia típica das colónias de *H. pylori* (pequenas, brilhantes, convexas e translúcidas). Foi realizada coloração de Gram de forma a confirmar a morfologia espiralada e a percentagem de células cocóides.

Conservação:

Após 48h, recuperou-se a cultura bacteriana, tendo-se preparado uma suspensão bacteriana em 0,5ml de meio TBS com 15% de glicerol, e distribuiu-se em dois tubos de congelação, que foram guardados a -80°C.

Anexo II: EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO

A extracção de DNA genómico foi realizada pelo kit *QIAamp® DNA Mini* (Qiagen GmbH), segundo as instruções do fabricante.

Reagentes e Material:

- Kit *QIAamp® DNA Mini* (Qiagen GmbH), contendo os seguintes reagentes:
 - Tampão ATL
 - Proteinase K
 - Tampão AL
 - Tampão AW1
 - Tampão AW2
 - Tampão AE
 - Colunas e tubos colectores
- Etanol a 96% v/v (Panreac Química S.A.U., Barcelona, Espanha)

Equipamento:

- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Banho *Thermomixer compact* (Eppendorf, Madrid, Espanha)
- Micropipetas (Eppendorf)

Procedimento:

A extracção de DNA genómico de cada estirpe foi realizada a partir da cultura de uma placa de meio HP não Selectivo. As células foram ressuspensas em 180µl de tampão ATL, de seguida adicionou-se 20µl de Proteinase K e incubou-se a 56°C até lise completa (1-3h). Após a lise celular, adicionou-se 200µl de tampão AL, homogeneizou-se no vórtex e incubou-se a 70°C por 10min. Depois foram adicionados 200µl de Etanol 96-100% à amostra, homogeneizou-se no vórtex, aplicou-se toda a mistura numa coluna *QIAamp Mini Column* com um tubo colector de 2ml e centrifugou-se a 8000rpm durante 1min. Descartou-se o tubo com o sobrenadante, colocou-se a coluna num tubo colector limpo e adicionou-se 500µl de tampão AW1. Centrifugou-se seguindo o mesmo procedimento. Adicionou-se 500µl de tampão AW2 e centrifugou-se a velocidade máxima durante 3min. Descartou-se o tubo com o sobrenadante, colocou-se a coluna num tubo colector limpo e voltou-se a centrifugar nas mesmas condições. Para a etapa da eluição, colocou-se a coluna num tubo “*Eppendorf*” de 1,5ml e adicionou-se 50µl de tampão AE. Deixou-se incubar à temperatura ambiente durante 1min e centrifugou-se a 8000rpm durante 1min. O DNA extraído foi guardado a -20°C.

Anexo III: DETECÇÃO DE PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Reagentes:

- Agarose *UltraPure*TM (Invitrogen S.A)
- Tampão TBE 0,5X (0,045M Tris; 0,045M Ácido bórico; 0,01M EDTA)
- *GelRed*TM (10,000x) (Biotium Inc)
- Solução de aplicação (0,25% Azul bromofenol; 0,25% Xileno cianol; 15% Ficoll; 120mM EDTA)
- Marcador de peso molecular *1Kb DNA Ladder* (Invitrogen S.A)

Equipamento:

- Tina de electroforese de mini geis horizontal *i Mupid* (Eurogentec S.A, Seraing, Bélgica)
- Transluminador *Gel Doc 2000* (Bio Rad Laboratories Ltd.)
- Aparelho fotográfico P93 (Mitsubishi Electric Europe B.V., Barcelona, Espanha)
- Micropipetas (Eppendorf)

Procedimento:

A agarose foi pesada (1,2g para gel de 1%) e dissolvida, por meio de calor, em tampão TBE 0,5X (120ml). Após o arrefecimento da agarose, adicionou-se o *GelRed*TM (1,5µl) e distribui-se o preparado pelo tabuleiro, colocando o pente apropriado

para a aplicação das amostras. Estes volumes permitem preparar dois géis de 25ml e quatro de 15ml.

Depois de o gel ter solidificado, colocou-se na tina de electroforese e encheu-se a tina com tampão TBE 0,5X, de modo a que o gel fique completamente imerso. De seguida, colocaram-se as amostras (5µl produto de amplificação + 2µl solução de aplicação) e o marcador de peso molecular nos poços e procedeu-se à corrida com uma voltagem constante de 100V, durante 30min. No fim, monitorizou-se o gel no transiluminador e tirou-se uma fotografia.

Anexo IV: MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1Kb DNA Ladder

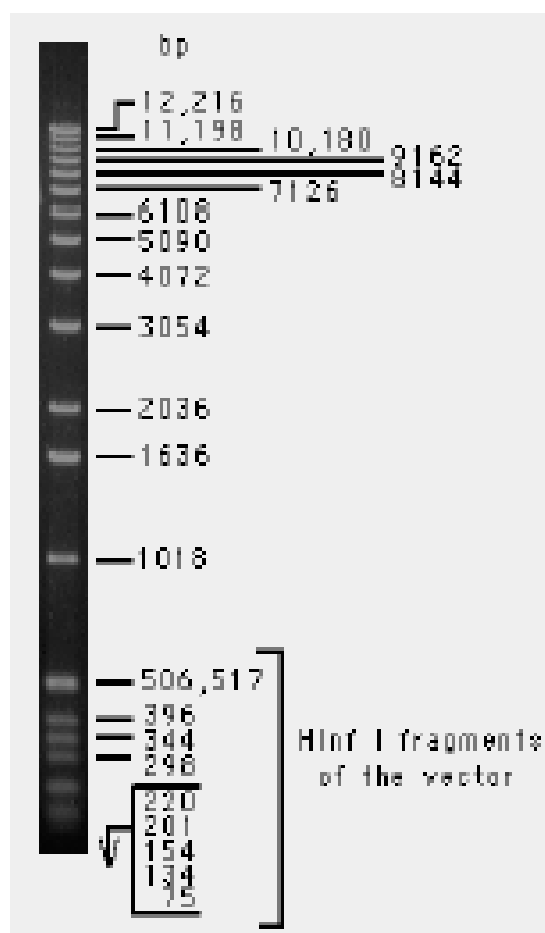


Figura 32: Representação do marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder com fragmentos de DNA de 500 pb a 12 Kb (Adaptado de <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10787017.pdf>).

Anexo V: PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

A purificação dos produtos de amplificação foi realizada com o kit *JETQUICK PCR Purification Spin* (Genomed GmbH), segundo as instruções do fabricante.

Reagentes e Material:

- Kit *JETQUICK PCR Purification Spin* (Genomed GmbH), contendo os seguintes reagentes e material:
 - Tampão H1 (Ligação: Hidrocloro de guanidina e Isopropanol)
 - Tampão H2 (Lavagem: Etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl)
 - Tampão TE (Eluição: 10mM Tris-HCl pH=8)
 - Colunas e tubos colectores
- Etanol a 96% v/v (Panreac Química S.A.U., Barcelona, Espanha)

Equipamento:

- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Micropipetas (Eppendorf)

Procedimento:

Primeiramente, procedeu-se a uma centrifugação rápida do produto amplificado para que todo o conteúdo se deposite completamente no fundo do tubo, de seguida adicionou-se tampão H1 (tampão de ligação à coluna) numa proporção 4:1. Colocou-se uma coluna num tubo colector e transferiu-se todo volume para a coluna. Depois centrifugou-se a 14000rpm durante 1min, rejeitou-se o eluído e colocou-se a

coluna no mesmo tubo colector. De seguida, adicionou-se 500µl de tampão H2 (tampão de lavagem), reconstituído previamente com Etanol, e centrifugou-se a 14000rpm durante 1min, rejeitou-se o eluído e voltou-se a colocar a coluna no mesmo tubo colector. Centrifugou-se novamente a 14000rpm durante 1min, para retirar os resíduos do tampão H2, rejeitou-se o tubo colector e colocou-se a coluna num tubo limpo de 1,5ml. O produto foi eluído com 30µl de tampão TE (tampão de eluição), colocados na coluna, e centrifugou-se a 14000rpm durante 2min. O produto purificado foi guardado a -20°C.

Anexo VI: CONSTRUÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *Helicobacter pylori* PARA OS GENES *homC* E *homD***Reagentes e Material:**

- Meio HP não selectivo (Agar *Wilkins Chalgrin* suplementado com 10% de sangue de cavalo) (Biogerm)
- Meio *Mueller Hinton* suplementado com 10% de sangue de cavalo
- Meio *Mueller Hinton* suplementado com 10% de sangue de cavalo e com 20µg/ml de Canamicina
- Caldo *Brucella*
- Meio TSB (*Trypticase Soya Broth*) com 15% de Glicerol
- Jarras de anaerobiose *Mart[®] Microbiology* (Mart Microbiology B.V.)

Equipamento:

- Sistema gerador de gás *AnoxomatTM* (Mart Microbiology B.V.)

Procedimento:

Primeiramente, foi preparada uma suspensão da cultura de uma placa de meio HP não selectivo, com crescimento de 24h, em 200µl de caldo *Brucella*. A suspensão foi semeada “em gota” numa nova placa de meio HP não selectivo e incubada durante 5h, até atingir a fase logarítmica de crescimento. Após este tempo foi adicionada uma solução aquosa contendo aproximadamente 50ng de DNA plasmídico, e a incubação continuou por mais 18h. Após crescimento recuperou-se toda a cultura e realizou-se uma suspensão que foi semeada “em gota” numa nova

placa de HP não selectivo e incubada durante 24h nas mesmas condições. No dia seguinte, a cultura foi repicada para uma placa de meio *Mueller Hinton* suplementado com 10% de sangue de cavalo e com 20µg/ml de Canamicina para seleccionar os clones resistentes, e em paralelo para uma placa de meio *Mueller Hinton* suplementado com 10% de sangue de cavalo sem antibiótico para controlar a viabilidade da bactéria. As placas com antibiótico foram incubadas em microaerofilia, a 37°C, até 12 dias, com controlo diário do aparecimento de clones resistentes.

Anexo VII: QUANTIFICAÇÃO DA CITOCINA IL-8 EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS

A quantificação da secreção da citocina IL-8 por ELISA foi realizada utilizando o kit *Quantikine Human IL-8 Immunoassays* (R&D Systems Europe Ltd), segundo as instruções do fabricante.

Reagentes e Material:

- Kit *Quantikine Human IL-8 Immunoassays* (R&D Systems Europe Ltd), contendo os seguintes reagentes e material:

- Tampão de lavagem
- Reagente de cor A (Peróxido de hidrogénio)
- Reagente de cor B (Tetrametilbenzidina)
- Diluente de calibrador RD5P 1X
- IL-8 *Standard* (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,2pg/ml)
- Diluente de ensaio RD1-85
- Conjugado de IL-8
- Solução STOP (Ácido sulfúrico 2N)
- *Stips*

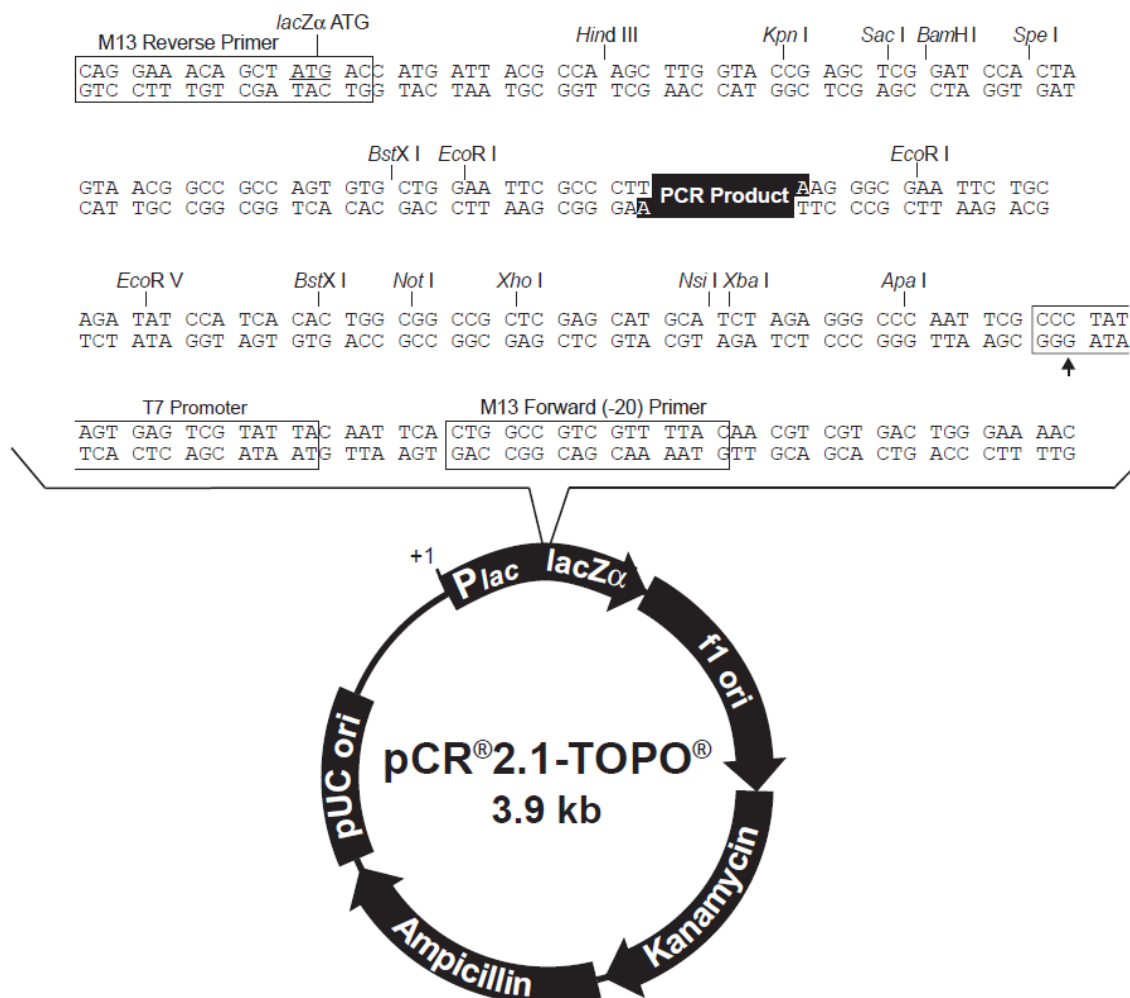
Equipamento:

- Leitor automático de placas *SLT Spectra II Labinstruments A-5082* (Labinstruments, Salzburg, Austria)
- Agitador automático *Certomat® TC3* (B. Braun Biotech International, Pennsylvania, EUA)

Procedimento:

Após a centrifugação do sobrenadante da co-cultura de células AGS com *H. pylori*, para retirar todas as partículas, diluiu-se cada amostra 1/100 em Diluente de calibrador RD5P 1X. Colocou-se 100µl de Diluente de ensaio RD1-85 em cada poço, e adicionou-se 50µl de standard, controlo ou amostra. Incubou-se à temperatura ambiente, com agitação, durante 2h. Depois, lavou-se quatro vezes cada poço com Tampão de lavagem (aproximadamente 400µl). Juntou-se 100µl de Conjugado de IL-8 a todos os poços e incubou-se à temperatura ambiente, com agitação, durante 1h. De seguida, repetiu-se a lavagem como referido anteriormente. Adicionou-se 200µl de Solução de substrato a cada poço, e voltou-se a incubar à temperatura ambiente, com agitação, durante 30min (protegendo-se da luz). Por fim, juntou-se 50µl de Solução STOP a cada poço, ocorrendo a mudança de cor do substrato de azul para amarelo. Determinou-se a densidade óptica em cada poço a 450nm, num máximo de 30min. Foi realizada a correcção dos valores da leitura a 540nm.

Anexo VIII: VECTOR pCR[®]2.1-TOPO[®]



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547

M13 reverse priming site: bases 205-221

Multiple cloning site: bases 234-357

T7 promoter/priming site: bases 364-383

M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406

f1 origin: bases 548-985

Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113

Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991

pUC origin: bases 3136-3809

Figura 33: Mapa do vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Adaptado de

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf).

Anexo IX: CLONAGEM DE PRODUTO DE PCR NO VECTOR pCR[®]2.1-TOPO[®]

A clonagem dos produtos de PCR no vector pCR[®]2.1-TOPO[®] foi realizada utilizando o kit *TOPO TA Cloning[®]* (Invitrogen S.A), segundo as instruções do fabricante.

Reagentes e Material:

- Kit *TOPO TA Cloning[®]* (Invitrogen S.A), contendo os seguintes reagentes:
 - Solução salina (NaCl 1,2M, MgCl₂ 0,06M)
 - Vector pCR[®]2.1-TOPO[®]
 - Células competentes de *E. coli*
 - Água esterilizada
- X-gal (50mg/ml) (Invitrogen S.A)
- Ampicilina (Sigma-Aldrich)
- Placas de meio LB
- Meio LB líquido

Equipamento:

- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Banho *Thermomixer compact* (Eppendorf)
- Micropipetas (Eppendorf)

Procedimento:

Preparou-se uma mistura reaccional num volume final de 5 μ l, segundo a Tabela 11, e deixou-se incubar durante 30min à temperatura ambiente. De seguida, colocou-se a mistura reaccional em gelo, adicionou-se 5 μ l a 50 μ l de células competentes e incubou-se em gelo durante 15min. Procedeu-se depois ao choque térmico, incubando-se primeiramente a 42°C durante 40s e depois em gelo durante 2min. Depois adicionou-se 250 μ l de meio LB e incubou-se a 37°C com agitação durante uma 1h. No fim, plaqueou-se primeiro 40 μ l de X-gal e depois 50 μ l da cultura numa placa de meio LB suplementado com 50 μ g/ml de Ampicilina e incubou-se a 37°C durante a noite. As colónias foram seleccionadas pela cor, apresentando os clones de interesse uma cor branca.

Tabela 11: Mistura reaccional utilizada na clonagem dos produtos de PCR com os locais de restrição no vector pCR[®]2.1-TOPO[®].

Reagente	Volume (μ l)
Solução salina	1
Água esterilizada	1
Vector pCR [®] 2.1-TOPO [®] .	1
Produto de PCR	2

Anexo X: EXTRACÇÃO DE DNA PLASMÍDICO

A extracção de DNA plasmídico foi realizada pelo kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin* (Genomed GmbH), segundo as instruções do fabricante.

Reagentes e Material:

- Kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin* (Genomed GmbH), contendo os seguintes reagentes e material:

- Solução G1 (Suspensão celular: Tris-HCl 50mM pH=8, EDTA 10mM, RNase A 100µg/ml)
- Solução G2 (Lise celular: NaOH 200mM, SDS 1% p/v)
- Solução G3 (Neutralização/Ligação: Acetato e Hidroclorato de guanidina)
- Tampão GX (Lavagem opcional: Hidroclorato de guanidina, Etanol)
- Tampão G4 (Lavagem: Etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl)
- Tampão TE (Eluição: 10mM Tris-HCl pH=8)
- Colunas e tubos colectores

- Etanol a 96% v/v (Panreac Química S.A.U., Barcelona, Espanha)
- Ampicilina (Sigma-Aldrich)
- Meio LB líquido

Equipamento:

- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Banho *Thermomixer compact* (Eppendorf)
- Micropipetas (Eppendorf)

Procedimento:

A partir de uma colónia resultante da transformação foi crescida uma cultura com 5ml de LB líquido suplementado com 50µg/ml de Ampicilina a 37°C com agitação durante a noite. A extracção de DNA plasmídico foi realizada a partir da cultura obtida.

Primeiramente, recolheram-se as células bacterianas de 5ml de cultura por centrifugação a 8000rpm durante 15min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 250µl de solução G1 e homogeneizou-se bem a mistura com a ajuda do vórtex. Depois, procedeu-se à lise celular com a adição de 250µl de solução G2 e homogeneizou-se invertendo o tubo várias vezes. Incubou-se durante 5min à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se 350µl de solução G3, homogeneizou-se invertendo o tubo várias vezes e centrifugou-se a mistura a 14000rpm durante 10min à temperatura ambiente.

Aplicou-se toda a mistura numa coluna *JETQUICK spin* com o respectivo tubo colector de 2ml e centrifugou-se a 14000rpm durante 1min. Depois de descartar o sobrenadante, adicionou-se 500µl de tampão GX e centrifugou-se seguindo o mesmo procedimento. De seguida, adicionou-se 500µl de tampão G4, centrifugou-se a 14000rpm durante 1min, descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente a 14000rpm durante 1min. Por fim, colocou-se a coluna num tubo "*Eppendorf*" de 1,5ml, adicionou-se 50µl de tampão TE e centrifugou-se a 14000rpm durante 2min. O DNA extraído foi guardado a -20°C.

Anexo XII: CLONAGEM DE PRODUTO DE PCR COM OS LOCAIS DE RESTRIÇÃO NO VECTOR pGEX-4T-3

Reagentes e Material:

- Kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin* (Genomed GmbH)
- Kit *JETQUICK PCR Purification Spin* (Genomed GmbH)
- Kit *JETQUICK Gel Extraction Spin* (Genomed GmbH)
- Kit *Rapid DNA Ligation* (Roche Diagnostics), contendo os seguintes reagentes:
 - Solução 1
 - Solução 2
 - T4 DNA Ligase (5U/μl)
- Vector pGEX-4T-3 (GE Healthcare)
- Enzima de restrição *SalI* (100,000U/ml) (New England BioLabs Inc.)
- Enzima de restrição *NotI* (50,000 U/ml) (New England BioLabs Inc.)
- NEBuffer 3 10X (NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM pH 7,9) (New England BioLabs Inc., Hertfordshire, Reino Unido)
- BSA (Albumina do Soro Bovino) 100mg/ml (New England BioLabs Inc.)
- Células competentes de *E. coli* DH5α (Invitrogen S.A)
- Células competentes de *E. coli* BL21 (Invitrogen S.A)
- Ampicilina (Sigma-Aldrich)
- Placas de meio LB
- Meio LB líquido

Equipamento:

- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Banho *Thermomixer compact* (Eppendorf)
- Micropipetas (Eppendorf)

Procedimento:Digestão dos plasmídeos:

Após a extracção do DNA plasmídico com o kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin* procedeu-se à sua quantificação por espectrofotometria a 260nm. De seguida, realizaram-se as digestões de ambos os plasmídeos (3500ng de DNA inserto e 3000ng de DNA vector) com as enzimas de restrição *SalI* e *NotI*, separadamente, num volume final de 50µl durante 1h a 37°C, utilizando as misturas reaccionais segundo as Tabelas 12 e 13.

Tabela 12: Mistura reaccional utilizada na digestão do TOPO com os genes *homC* e *homD* clonados e do vector pGEX-4T-3 com a enzima de restrição *SalI*.

Reagente	Volume na mistura reaccional (μ l)		
	TOPO clonado com o gene		Vector
	<i>homC</i>	<i>homD</i>	pGEX-4T-3
NEBuffer 3 10X	5	5	5
BSA	0,5	0,5	0,5
Enzima <i>SalI</i>	0,5	0,5	0,4
DNA	(3500ng)	(3500ng)	(3000ng)
Água esterilizada	até 50 μ l	até 50 μ l	até 50 μ l

A digestão foi sendo controlada por electroforese em gel de agarose a 0,8%, e quando terminada purificou-se cada digestão com o kit *JETQUICK PCR Purification Spin*, segundo as instruções do fabricante, eluindo com o volume necessário para a próxima digestão (volume final de 50 μ l).

Tabela 13: Mistura reaccional utilizada na digestão do DNA de TOPO com os genes *homC* e *homD* clonados e vector com a enzima de restrição *NotI*.

Reagente	Volume na mistura reaccional (µl)		
	TOPO clonado com o gene		Vector
	<i>homC</i>	<i>homD</i>	pGEX-4T-3
NEBuffer 3 10X	5	5	5
BSA	0,5	0,5	0,5
Enzima <i>NotI</i>	0,5	0,5	0,4
DNA purificado (volume total de eluição)	44	44	44,1

No fim de os plasmídeos estarem digeridos, o volume total da digestão foi corrido num gel de agarose a 0,8%, excisaram-se as bandas de interesse do gel e procedeu-se à extracção do DNA a partir do kit *JETQUICK Gel Extraction Spin*, segundo as instruções do fabricante.

Ligação:

O fragmento de DNA do inserto purificado de cada gene foi ligado ao vector purificado com a enzima T4 DNA Ligase utilizando o kit *Rapid DNA Ligation*, segundo as instruções do fabricante. Preparou-se a mistura reaccional de acordo com a tabela 14 e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 1h.

Tabela 14: Mistura reaccional utilizada na ligação.

Reagente	Volume (μ l)
Solução 1	10
Solução 2	2
Enzima T4 DNA Ligase	1
DNA TOPO com o gene clonado digerido	7
DNA vector pGEX 4T-3 digerido	1

Transformação em células competentes de *E. coli* DH5 α :

O plasmídeo resultante da ligação foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5 α . Inicialmente, adicionou-se 10 μ l da mistura reaccional da ligação de cada gene a 100 μ l de células competentes e deixou-se incubar durante 30min em gelo. De seguida procedeu-se ao choque térmico, incubando-se primeiramente a 42°C durante 45s e depois em gelo durante 2min. Depois adicionou-se 500 μ l de meio LB e incubou-se a 37°C com agitação durante uma 1h. No fim plaqueou-se todo o volume da cultura numa placa de meio LB suplementado com 50 μ g/ml de Ampicilina e incubou-se a 37°C durante a noite. A partir de cada colónia resultante da transformação realizou-se uma minicultura em 5ml de meio LB líquido suplementado com 50 μ g/ml de Ampicilina, que cresceu durante a noite a 37°C com agitação, e extraiu-se o DNA plasmídico da cultura de cada clone a partir do kit *JETQUICK Plasmid Miniprep Spin*, segundo as instruções do fabricante.

Transformação em células competentes de *E. coli* BL-21:

Os vectores de expressão com o respectivo fragmento clonado foram transformados em células de *E. coli* BL-21. Inicialmente, adicionou-se 2,5µl do DNA plasmídico a 25µl de células competentes e deixou-se incubar durante 30min em gelo. De seguida procedeu-se ao choque térmico, incubando-se primeiramente a 42°C durante 45s e depois em gelo durante 2min. Depois adicionou-se 100µl de meio LB e incubou-se a 37°C com agitação durante uma 1h. No fim plaqueou-se todo o volume da cultura numa placa de meio LB suplementado com 50µg/ml de Ampicilina e incubou-se a 37°C durante a noite.

Anexo XIII: EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE

A extracção de DNA a partir de gel de agarose foi realizada pelo kit *JETQUICK Gel Extraction Spin* (Genomed GmbH), segundo as instruções do fabricante.

Reagentes e Material:

- Kit *JETQUICK Gel Extraction Spin* (Genomed GmbH), contendo os seguintes reagentes e material:

- Solução L1 (Solubilização do gel: NaClO₄, Acetato de sódio e TBE)
- Solução L2 (Lavagem: Etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl)
- Tampão TE (Eluição: 10mM Tris-HCl pH=8)
- Colunas e tubos colectores

- Etanol a 96% v/v (Panreac Química S.A.U., Barcelona, Espanha)

Equipamento:

- Centrífuga 5415R (Eppendorf)
- Banho *Thermomixer compact* (Eppendorf)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Balança *Sartorius Basic BP 8100* (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha)
- Vórtex *Heidolph REAX 2000* (Comecta S.A., Barcelona, Espanha)

Procedimento:

Primeiramente, excisou-se a banda de interesse, transferiu-se para um tubo “*Eppendorf*” de 1,5ml e pesou-se. Depois foi adicionada a solução L1 numa proporção de 1:3 (cada 100mg de gel juntar 300µl de solução) e incubou-se a 50°C durante 15min com agitação. Aplicou-se toda a mistura numa coluna *JETQUICK spin* com o respectivo tubo colector de 2ml e centrifugou-se a 14000rpm durante 1min. Depois de descartar o sobrenadante, adicionou-se 500µl de solução L2 e centrifugou-se seguindo o mesmo procedimento. Descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente a 14000rpm durante 1min. Por fim, eluiu-se o DNA com 50µl de tampão TE e centrifugação a 14000rpm durante 2min. A solução de DNA foi guardado a -20°C.

Anexo XIV: ELECTROFORESE EM GEL SDS-PAGE**Reagentes e Material:**

- Acrilamida/bis-acrilamida 40% (37,5:1) (Bio Rad Laboratories Ltd.)
- Tampão de corrida SDS-PAGE 1X (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 0,1% SDS; pH 8,3)
- Tampão do gel de separação (Tris-HCl 1,5M pH 8,8)
- Tampão do gel *stacking* (Tris-HCl 0,5M pH 6,8)
- SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) 10% (p/v)
- PSA (Persulfato de amónio) 10% (p/v)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilinediamina) (AppliChem, Gatersleben, Alemanha)

Equipamento:

- *Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis System* (Bio Rad Laboratories Ltd.)
- Micropipetas (Eppendorf)

Procedimento:

Os géis foram preparados seguindo as instruções do fabricante e foi utilizado o aparelho *Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell*. Primeiro, foi feita a montagem do suporte para o gel em placa com espaçadores de 0,75 mm, e depois seguiu-se a sua preparação. O gel é constituído por um gel de separação e um *stacking* gel. O gel de separação foi preparado com 10% de acrilamida/bis-acrilamida 40%, segundo a Tabela 15.

Tabela 15: Solução para a preparação do gel de separação com 10% de acrilamida/bis-acrilamida 40%.

Componentes da solução	Volume (μ l)
Água destilada (q.b. 5ml)	2450
Acrilamida/bis-acrilamida 40%	1250
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1250
SDS 10% (p/v)	50
PSA 10% (p/v)	50
TEMED	2,5

A polimerização do gel começa assim que o PSA e o TEMED estão em solução, por isso foram os últimos a ser adicionados. Sem demora, a mistura foi colocada no suporte, na posição vertical, e deixou-se a polimerizar à temperatura ambiente. Após a polimerização, que demora aproximadamente 30min, lavou-se muito bem o topo do gel, de modo a retirar toda a acrilamida não polimerizada. De seguida, foi preparado o gel *stacking* com 4% de acrilamida/bis-acrilamida 40%, segundo a tabela 16.

Tabela 16: Solução para a preparação do gel *stacking* com 4% de acrilamida/bis-acrilamida.

Componentes da solução	Volume (μ l)
Água destilada (q.b. 2ml)	1500
Acrilamida/bis-acrilamida 40%	250
0,5M Tris-HCl pH 6,8	200
SDS 10% (p/v)	20
PSA 10% (p/v)	40
TEMED	2

A mistura foi colocada em cima do gel de separação polimerizado, tendo-se colocado um molde para formar os poços. Deixou-se polimerizar nas mesmas condições acima referidas. No final, o gel foi colocado na tina de electroforese seguindo as instruções do fabricante, e colocou-se o tampão de corrida SDS-PAGE para depositar as amostras.

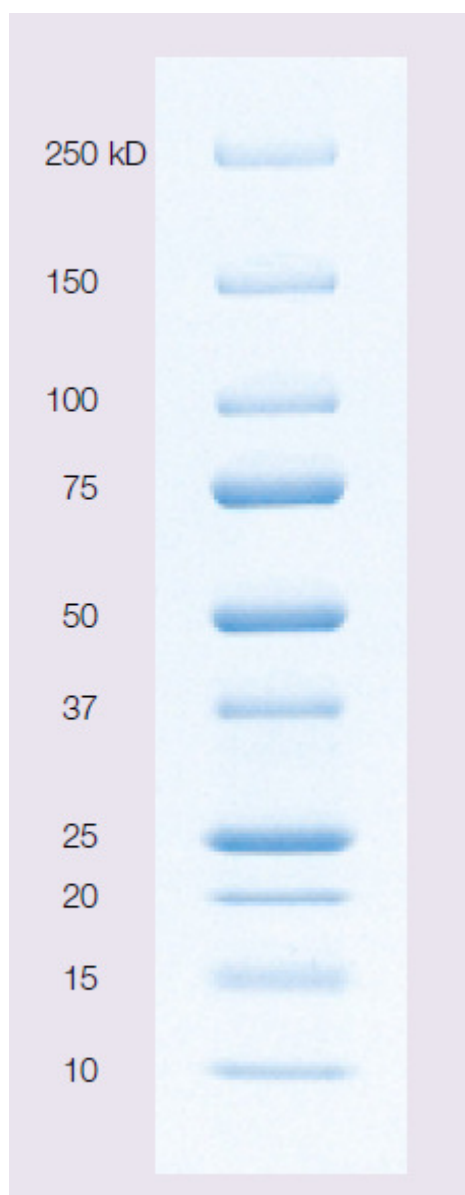
Anexo XV: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *Precision Plus Protein™ Standards*

Figura 35: Representação do marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Standards* com padrões de 250 a 10 kDa (Adaptado de http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_4110024.pdf).

Anexo XVI: TAMPÕES E SOLUÇÕES DE TRABALHO**Tabela 17:** Preparação de tampões e soluções de trabalho.

Electroforese em gel de agarose	
Tampão TBE 10X	Dissolver 108g Tris, 55g de Ácido bórico em 960ml de água destilada e adicionar 40ml de 0,01M EDTA pH 8.
Solução de Aplicação	Dissolver 250mg de Azul bromofenol, 250mg de Xileno de cianol e 4,47g de EDTA em 985ml de água destilada, e adicionar 15ml de Ficoll.
Electroforese em gel SDS-PAGE	
Tampão da Amostra 5X	Misturar 4ml de Tris-HCl 0,5M pH 6,8 e 3,1ml de Glicerol 80%. Depois dissolver 1,125g de SDS e 0,5g de DTT (2%) e adicionar 10ml de azul de bromofenol.
Tampão SDS-PAGE 10X	Dissolver 360g de Glicina, 76g de Tris e 25g de SDS em água destilada, perfazendo o volume de 1l.
Tampão do Gel de Separação (Tris-HCl 1,5M pH 8,8)	Dissolver 18,15g de Tris em água destilada. Ajustar o pH 8,8 com HCl 6N e perfazer o volume de 100ml com água destilada.
Tampão do Gel <i>Stacking</i> (Tris-HCl 0,5M pH 6,8)	Dissolver 6g de Tris em água destilada. Ajustar o pH 6,8 com HCl 6N e perfazer o volume de 100ml com água destilada.
SDS 10% (p/v)	Dissolver 1g de SDS em 10ml de água destilada.
PSA 10% (p/v)	Dissolver 1g de Persulfato de Amónio em 10ml de água destilada.
Solução de Azul de Coomassie	Dissolver 1,25g de Azul de Coomassie num pouco de água destilada. Juntar 225ml de Metanol e 50ml de Ácido Acético, e perfazer o volume de 1l com água destilada.
Solução <i>Destain</i>	Juntar 450ml de Metanol e 100ml de Ácido Acético e perfazer o volume de 1l com água destilada.

Continuação da Tabela 17.

Western blot	
Tampão de Transferência 25X	Dissolver 145g de Tris, 72,5g de Glicina e 9,3g de SDS em água destilada até perfazer o volume de 1l.
Tampão de Transferência 1X	Juntar 200ml de Metanol com 40ml de tampão de transferência 25X e perfazer o volume de 1l com água destilada
Tampão TBS 10X	Dissolver 151g de Tris e 219g de NaCl em água destilada. Ajustar o pH 7,6 com HCl 1M e perfazer o volume de 1l com água destilada.
Solução TTBS 1X	Misturar 100ml de TBS 10X e 500 μ l de Triton X-100 e perfazer o volume de 1l com água destilada.
5% (p/v) de Leite Magro em TTBS 1X	Dissolver 5g de Leite magro em 100 ml de TTBS 1X.
Tampão ECL (Tris-HCl 100mM pH 8,8)	Diluir 3ml de Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8 em 45ml de água destilada.
Solução de Revelação 1	Juntar 5 μ l de Ácido Cumárico e 15 μ l de luminol a 980 μ l de tampão ECL.
Solução de Revelação 2	Adicionar 1 μ l de Água oxigenada a 1000 μ l de tampão ECL.
Solução de ECL	Juntar 1ml da solução de revelação 1 e 1ml da solução de revelação 2.

