C2

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

ALLINE ROBERTA PACHECO

"IMPLICAÇÃO DE GENES DA ZONA DE PLASTICIDADE E DA ILHA DE PATOGENICIDADE *cag* (PAI*cag*) DE *Helicobacter pylori* NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS GASTRODUODENAIS"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ALLINE ROBERTA
PACHECO
aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese (ou Dissertação) apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Campinas, 2007

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P115i

Pacheco, Alline Roberta
Implicação de genes da zona de plasticidade e da ilha de patogenicidade *cag* (PAI*cag*) de *Helicobacter pylori* no desenvolvimento de doenças gastroduodenais / Alline Roberta Pacheco. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Estômago - Doenças. 3. Úlcera péptica. I. Brocchi, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Implication of *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island (*cag*PAI) genes on the development of gastroduodenal diseases.
Palavras-chave em inglês: *Helicobacter pylori*; Stomach – Diseases; Peptic ulcer.
Área de concentração: Microbiologia.
Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Banca examinadora: Marcelo Brocchi, Ricardo Brandt de Oliveira, José Murilo Robilotta Zeitune.
Data da defesa: 27/07/2007.
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 27 de Julho de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi.
(Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

Titular

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Brandt
Titular

Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Suplente

Assinatura

Prof(a). Dr(a) .Cláudia Maria Leite Maffei

Suplente

Assinatura

200749711

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para a sua realização, nos foi concedida bolsa de mestrado pela CAPES. (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Seu Anhangará, pelos sábios conselhos e orientações.

Aos meus pais, Paulo e Odette, pelo apoio e por me incentivar a oferecer o melhor de mim na realização de tudo o que eu fizer.

Ao meu marido Tiago, por todo o carinho, apoio e paciência que me dedicou durante a realização deste trabalho.

Às minhas irmãs Rosana, Renata e Sandra, pelo carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pela oportunidade, confiança, incentivo e conhecimentos transmitidos sempre com dedicação e humanidade; por me fazer gostar de Biologia Molecular e por me ter me despertado a vontade de ser pesquisadora.

À Profa. Dra. Wirla Tamashiro, pelo incentivo e por me fazer acreditar que eu podia ir além.

Ao Prof. Dr. Murilo Zeitune, por valorizar meu trabalho e pela participação na Banca Examinadora de Tese.

Ao Prof. Dr. Ricardo Brandt, pela participação na Banca Examinadora de Tese.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pelos conselhos dados durante a participação na Banca Prévia Examinadora de Tese.

À Profa. Dra. Sílvia Gatti, pelos ensinamentos transmitidos e por ter me despertado a vontade de ser professora de Microbiologia.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, pelos ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos amigos que ficarão para sempre: Tatiana e Gerson.

Aos queridos colegas de laboratório: Dã, Bela, Luciane, Guilherme, Fernanda, André, Débora, Diego, Du, Michelle e Evandro, por toda ajuda, pela troca de idéias e por trazer alegria para o nosso ambiente de trabalho.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia, pela ajuda durante a tese.

À Lúcia e Lourdes, por toda ajuda, presteza e atenção.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, pela ajuda durante a tese.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1-RESUMO ix

2- ABSTRACT xi

3- INTRODUÇÃO 1

3.1. *H. pylori*: a descoberta 1

3.2. Patogênese da infecção por *H. pylori* 3

3. 3. Características Genômicas de *H. pylori* 8

3.3.1. Características gerais do genoma 8

3.3.2. Variabilidade genética: origens e implicações para o hospedeiro humano 11

3.3.3. Diversidade de *H. pylori* num mesmo hospedeiro 15

3.4. *H. pylori*: coevolução com o hospedeiro humano 16

3.5. Ilha de Patogenicidade *cag* (PAI *cag*) 17

3.5.1. Gene *cag*T 21

3.5.2. Gene *vir*B11 22

3.6. Zona de Plasticidade (ou Zona Plástica) de *H. pylori* 23

3.6.1. Locus *dup*A 24

4. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 25

5. ARTIGO 26

6. DISCUSSÃO 51

7. CONCLUSÕES 63

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

1. RESUMO

Helicobacter pylori é um bacilo Gram-negativo, espiralado, microaerófilo, e flagelado, incluído na família *Helicobacteraceae*. Essa bactéria infecta cronicamente a mucosa gastroduodenal de uma grande parcela da população mundial. A infecção por *H. pylori* está associada ao desenvolvimento de diversas doenças gastroduodenais em humanos, entre elas a gastrite, a úlcera péptica (PUD) e seus subtipos, úlcera gástrica (GU) e duodenal (DU), e o adenocarcinoma gástrico. Embora a porcentagem de infectados seja alta, podendo chegar a 90% nos países em desenvolvimento como o Brasil, somente uma pequena parcela dos indivíduos infectados desenvolve patologias graves. O desenvolvimento de doenças gástricas em indivíduos infectados por *H. pylori* parece ser o resultado da interação entre características do hospedeiro, influências ambientais e fatores de virulência produzidos pela bactéria.

Muitos fatores de virulência prováveis, que contribuem para a patogênese, tem sido identificados em *H. pylori*, dentre os quais temos os genes da Ilha de Patogenicidade *cag* (PAI*cag*), e genes da zona de plasticidade de *H. pylori*.

Embora sabe-se que muitos dos fatores de virulência descritos (*cag*A, *cag*E, *vac*A) estejam associados, universalmente, a um aumento no risco de desenvolvimento de quadros clínicos graves como úlcera péptica e câncer gástrico, nenhum deles pôde ser ligado a uma doença específica causada pela infecção persistente por *H. pylori*, e portanto ainda não foi descrito um gene marcador universal para uma doença resultante da infecção por essa bactéria.

Dados da literatura mostram uma associação entre o gene *cag*T da PAI*cag* e o desenvolvimento de PUD. Um trabalho recente descreveu o *locus dup*A e sua associação com o desenvolvimento de DU, e *dup*A foi sugerido como marcador universal para DU.

Neste trabalho, investigou-se a presença dos genes *vir*B11 e *cag*T, localizados na PAI*cag*, e dos genes *jhp*917 e *jhp*918, integrantes do *locus dup*A encontrado zona de plasticidade de *H.pylori*, em isolados brasileiros dessa bactéria. Além disso, investigou-se uma possível associação entre tais genes e algumas doenças decorrentes da infecção por *H. pylori*, tais como a gastrite, PUD, GU, DU e a doença do refluxo gastroesofágico (GERD), na tentativa de encontrar um gene marcador para alguma dessas doenças.

Nossos resultados mostram que o gene *cag*T foi associado com PUD; o gene *vir*B11 foi detectado em quase todas as amostras; o *locus dup*A não foi associado a DU ou nenhuma outra doença gastroduodenal. Dessa forma, nossos resultados sugerem que o gene *cag*T pode ser usado como marcador para o desenvolvimento de PUD no Estado de São Paulo, Brasil; o gene *vir*B11 pode representar um gene de virulência essencial para a patogênese da infecção causada por *H. pylori* no desenvolvimento de gastrite, PUD e GERD; o *locus dup*A não é um marcador universal para o desenvolvimento de DU.

2. ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram-negative, spiral-shaped, flagellated, micro-aerophilic bacterium, included in the *Helicobacteraceae* family, which infects the human stomach cronically. *H. pylori* infection has a worldwide distribution and is associated with the development of several gastroduodenal diseases, such as gastritis, peptic ulcer disease (PUD) and its subtypes, gastric ulcer (GU) and duodenal ulcer (DU), and gastric adenocarcinomas. The number of infected individuals are high but only a minority of them will develop serious gastroduodenal diseases. Disease outcome depends on many factors, including host physiology, environmental influences and bacterial genotype.

Although a number of putative virulence factors had been reported (*cag*A, *cag*E and *vac*A) for *H. pylori*, their presence has tipically been associated with an increased risk of both gastric cancer and peptic ulcer disease, and none can be clearly linked to one specific *H. pylori* related-disease. So the identification of a disease-specific *H. pylori* virulence factors predictive of the outcome of infection remains unachieved.

Several of the *H. pylori* putative virulence genes that may play a role in its pathogenicity have been identified, many of them located in the *cag* pathogenicity island (PAI*cag*) and in the plasticity zone of the *H. pylori* genome.

Data from the literature shows an association between *cag*T and PUD development, as well as *dup*A and DU. The latter has been suggested as an universal marker for the development of duodenal ulcers.

In this work, we investigated the presence of *vir*B11 and *cag*T, located in the left half of PAI*cag*, and the genes *jhp*917-*jhp*918, components of the *dup*A *locus*, which is located in the plasticity zone region of *H. pylori*, in brazilian isolates. In addition, we

investigated a possible association between these genes and some *H. pylori* related-diseases, such as gastritis, PUD, GU, DU and gastroesophageal-reflux (GERD), in an attempt to find a gene marker for a clinical outcome resulted from *H. pylori* infection.

The *cag*T gene was associated with PUD; *vir*B11 gene was detected in nearly all the samples; *dup*A locus was not associated with development of DU neither any gastroduodenal disease. In this way, our results suggest that *cag*T can be used as a marker for the developmentof PUD in State of São Paulo, Brazil; *vir*B11 can be an essential virulence gene for *H. pylori* pathogenesis on the development of gastritis, PUD and GERD; *dup*A locus is not an universal marker for the development of DU.

3. INTRODUÇÃO

3.1. *H. pylori*: a descoberta

Em 1982, os cientistas australianos Robin Warren e Barry Marshall isolaram bacilos em forma de espiral a partir de biópsias de estômago humano. Esses isolados foram inicialmente classificados como pertencentes ao gênero *Campylobacter* devido as seguintes características: morfologia em espiral, mobilidade, crescimento em meio microaerófilo, e isolamento a partir do trato alimentar; naquela época, foram denominados *Campylobacter pyloridis* (Warren e Marshall, 1983). Entretanto, devido ao rRNA dessa bactéria ser significantemente diferente dos demais membros desse gênero, em 1989 foi proposto a criação de um novo gênero para classificação desse microorganismo, denominado *Helicobacter* (Goodwin *et al*., 1989). Esse gênero incluía mais de quinze espécies gástricas e não gástricas, todas isoladas do trato gastrointestinal ou fígado de suas respectivas espécies hospedeiras, sendo incluído na família Campylobacteraceae (On, 1996). Atualmente, o gênero *Helicobacter* está incluso na família *Helicobacteraceae,* recentemente criada (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Helicobacter pylori é um bacilo Gram negativo, espiralado, microaerófilo, que possui de 4 a 6 flagelos unipolares envolvidos por bainha (*Dunn et al*., 1997), capaz de colonizar de forma persistente o ambiente hostil do estômago humano. Esta bactéria infecta cronicamente a mucosa gastroduodenal de mais de 50% da população mundial, o que faz de *H. pylori* o patógeno humano mais bem sucedido, e da infecção por essa bactéria a mais comum em humanos (Suerbaum e Josenhans, 2007). A relação entre *H. pylori* e o hospedeiro humano é considerada um modelo para interações entre microorganismos bem adaptados que causam infecções persistentes em seus hospedeiros (Blaser e Berg, 2001).

Embora a infecção por *H. pylori* ocorra a nível mundial, a incidência da infecção parece variar de acordo com o *status* socioeconômico de cada país. Nos países desenvolvidos, a porcentagem de indivíduos infectados oscila entre 25 a 50% e há indícios de que esteja diminuindo, enquanto que nos países subdesenvolvidos essa taxa é maior, podendo chegar a 90% (Covacci *et al*.,1999; Perez-Perez *et al.*, 2004). Entretanto, somente cerca 10 a 20% das pessoas infectadas torna-se doente, e as manifestações clínicas geralmente aparecem anos após a infecção (Blaser e Parsonnet, 1994; Hofman *et al.*, 2004).

H. pylori é responsável por inúmeras doenças gastroduodenais em humanos. Essa bactéria é reconhecida como agente etiológico de gastrites agudas e crônicas, e considerada um fator de predisposição para o desenvolvimento de úlceras pépticas (Dunn *et al*, 1997), adenocarcinoma gástrico e linfomas MALT ("*mucosal - associated lymphoid tissue*") do estômago (Blaser*, 1993*); ela é considerada carcinógeno do tipo 1 pela OMS (Prtichard and Crabtree*,* 2006).

O modo de transmissão dessa bactéria é ainda especulativo (revisado por Perez-Perez *et al.,* 2004).

Atualmente, sabe-se que a contaminação ocorre dentro da mesma família, de pais para filhos que a adquirem na infância, provavelmente antes dos dez anos de idade (Covacci *et al*., 1999; Perez-Perez *et al*., 2004). A infecção causa inicialmente uma gastrite aguda sintomática, mas como os sintomas são não-específicos e transitórios, dificilmente o diagnóstico é feito nesta etapa da infecção (Suerbuam e Josenhans, 2007). Em todos os indivíduos infectados, a colonização por *H. pylori* induz uma intensa resposta inflamatória na mucosa gástrica, denominado gastrite crônica. Na maioria dos indivíduos infectados, a colonização por *H. pylori* não causa sintomas, mas existe um alto risco de desenvolver doenças graves como a úlcera péptica (*odds ratio* -OR- de ~3 a 6), adenocarcinoma gástrico

(OR ~2 a 8). Por outro lado, tem sido sugerido que a infecção por *H. pylori* diminui o risco de desenvolvimento de doença do refluxo gastroesofágico (OR ~0,2-0,5). Se não for feito o tratamento com antibióticos, a bactéria persiste por toda a vida (Kang e Blaser,2006).

Dada a importância das implicações que a infecção por *H. pylori* acarreta em indivíduos do mundo todo, estando envolvida na gênese de diversas doenças graves, os descobridores desse patógeno, Robin Warren e Barry Marshall, conseguiram o mais alto grau de reconhecimento pela comunidade científica internacional, tendo sido laureados com o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 2005.

Antes da descoberta realizada por Warren e Marshall, a ocorrência de úlcera péptica era atribuída unicamente ao estresse e hábitos alimentares dos pacientes. No entanto, num célebre trabalho publicado em 1984, esses pesquisadores quebraram esse dogma, pois conseguiram demonstrar o papel de *H. pylori* no desenvolvimento da gastrite e da úlcera péptica, que então passou a ser tratada como uma doença infecciosa, tornando-se essencial para a cura do paciente a erradicação do microorganismo através do emprego de antibióticos (Ahmed, 2005).

3.2. Patogênese da infecção por *H. pylori*

Ao ser ingerida e chegar ao estômago, a bactéria atravessa o muco gástrico rapidamente, habilidade relacionada com sua forma em espiral e a presença de flagelos, até alcançar uma região com pH neutro, abaixo do muco e próximo às células da mucosa (Suerbaum *et al*., 1993). *H. pylori* produz urease que transforma a uréia em amônia e bicarbonato, que forma uma capa protetora ao redor da bactéria contra o pH ácido do estômago (Evans *et al*., 1998).

Ao atingir a camada abaixo do muco, *H. pylori* adere estreitamente às células subjacentes, com algumas exceções, pois algumas amostras podem não aderir (revisado por Suerbaum e Michetti, 2002). A adesina mais conhecida de *H. pylori* é a proteína BabA (Ilver *et al*., 1998). Outras adesinas têm sido descritas em *H. pylori*, sendo a maioria delas membros da família das *outer membrane proteins* (OMPs), tais como SabA (Mahdavi *et al*, 2002) e HopZ (Peck *et al*, 1999). Todas as adesinas descritas parecem utilizar como receptores nas células epiteliais gástricas estruturas como lipídios, gangliosídeos e carboidratos (Evans Jr e Evans, 2000).

Existem várias moléculas produzidas por *H. pylori* que agem no tecido circundante e que podem levar o hospedeiro a desenvolver inflamação de tecido gástrico, levando a formação de úlceras ou gastrites. Entre essas moléculas podemos destacar a citotoxina vacuolizante (VacA), de caráter multifuncional, capaz de causar várias alterações em diferentes tipos celulares (Cover e Blanke, 2005).

VacA é uma toxina oligomérica (Lupetti *et al*., 1996), que forma poros na membrana celular, permitindo a saída de ânions e uréia, o que leva a uma perda da homeostase e tonacidade celular, associada a um desmantelamento das *tigh junctions* e o conseqüente aumento da permeabilidade intercelular (Tômbola *et al*., 2001). Esse aumento de permeabilidade disponibiliza para *H. pylori* uma maior quantidade de nutrientes, que atravessam a barreira mucosa, enquanto que a uréia é importante na proteção da bactéria contra o pH ácido. A ligação de formas monoméricas de VacA a receptores na célula do hospedeiro pode desencadear alterações no citoesqueleto (Pai *et al*., 1999) e desprendimento celular (Fujikawa *et al*., 2003). Os oligômeros de VacA podem também ser endocitados via um receptor epidérmico para um fator de crescimento (Seto *et al*., 1998); a fusão desses oligômeros à membrana dos endossomos desencadeia a entrada de "solutos" e

conseqüentemente água para seu interior, levando a formação de "vacúolos" intracelulares, que se fundem entre si e com lisossomos levando ao fenômeno de vacuolização da célula epitelial, que culmina na morte celular (Cover *et al*, 1997). Adicionalmente, VacA também pode formar poros na membrana mitocondrial, permitindo a saída de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma levando à apoptose (Koike *et al*, 2001). Dados recentes mostram que VacA pode interferir na resposta imune, causando supressão, inibindo a ativação e proliferação de células T (Sundrud *et al*., 2004), a apresentação de antígenos (Molinari *et al*, 1998) e a maturação de fagossomos em macrófagos (Zheng e Jones, 2003).

Atherton e colaboradores (1995) demonstraram a existência de variantes da toxina *vac*A codificadas por diferentes alelos que estão associadas à diferenças na seqüência sinal, que define as variantes *s*1 e *s*2, e na porção central da toxina, definindo as variantes *m*1 e *m*2. Amostras de *H. pylori* contendo o alelo *s*1/*m*1 de vacA estão associadas aos casos mais graves da doença (Atherton *et al*., 1995). Atualmente, a sequência sinal *s*1 da toxina é subdividida em s1a, s1b (Atherton *et al*, 1995) e s1c (van Doorn *et al*, 1999). Vários relatos na literatura mostram que amostras de *H. pylori* cujo genótipo é *s*1a/*m*1 de vacA estão associadas aos casos mais graves da doença, particularmente úlcera péptica.

Praticamente todos os isolados de *H. pylori* produzem a proteína Nap (*Neutrophil activating protein*), que atua como fator quimiotático para neutrófilos e monócitos, recrutando-os para o sítio da infecção, e também ativa-os (Covacci *et al*., 1999). HP-Nap promove a adesão dos neutrófilos e monócitos à mucina e às células endoteliais bem como a produção de radicais livres de oxigênio (Montecucco e Rappuoli, 2001; Evans *et al*, 1995). Um estudo recente realizado por Polenghi e colaboradores (2007) demonstrou pela primeira vez *in vivo* que HP-Nap é capaz de atravessar o endotélio e promover a adesão de polimorfonucleares. Dessa forma, a produção de HP-Nap por *H. pylori* favorece a reação

inflamatória verificada em infecções por este microrganismo, provocando danos na mucosa gástrica (Covacci *et al*., 1999).

O principal fator de virulência de *H. pylori* é a presença da Ilha de Patogenicidade *cag,*(PAI*cag*) que compreende cerca de 28 genes organizados em um "cluster", alguns destes envolvidos com a expressão de um sistema de secreção do tipo IV, especializado na transferência de complexos multimoleculares através da membrana bacteriana ao espaço extracelular ou para o interior da célula hospedeira. Esses complexos multimoleculares estão envolvidos na transdução de sinais entre a célula bacteriana e a hospedeira, assim modificando a resposta do hospedeiro, incluindo a indução da produção de citocinas que recrutam e ativam células imunes, contribuindo com o desenvolvimento de gastrite ou outras manifestações clínicas (Covacci *et al*., 1999; Cascales e Christie, 2003).

Uma molécula importante para a patogenicidade de *H. pylori* é a proteína CagA, injetada por essa maquinaria de secreção (Odenbreit *et al*., 2000). Dentro da célula hospedeira, CagA é fosforilada por Src quinases (Selbach *et al*., 2002) e se torna ativa, provocando várias alterações nas células do hospedeiro: afeta a morfologia, crescimento, migração e adesão das células epiteliais, podendo levar as células à apoptose (Higashi *et al*., 2002); provoca um rearranjo do citoesqueleto que culmina no fenótipo extremamente alongado das células,denominado de fenótipo “hummingbird”, conforme observado para células AGS (Selbach, *et al*., 2003); pode interagir com Grb2 e ativar a via de Ras/Mek/ERK levando ao fenótipo da célula “esparramada”(*scattered cell*) e aumentando a proliferação celular (Mimuro *et al*., 2002). O conjunto de alterações provocados pela produção de CagA por *H. pylori* culmina na perda de integridade do epitélio gástrico, danificando a mucosa do estômago e levando ao desenvolvimento de diversas patologias

tais como gastrites e ulcerações. Alguns estudos sugerem que CagA está envolvida no desenvolvimento de carcinoma gástrico (revisto em Hatakeyama e Higashi, 2005).

A presença da PAI*cag* está relacionada à capacidade da bactéria induzir a produção de interleucina 8 pelas células epiteliais (Censini *et al*., 1996), sendo esta interleucina associada à resposta inflamatória (Telford *et al*., 1997). Amostras PAI*cag*+ estão geralmente associadas a casos mais graves da doença em humanos (Blaser e Atherton, 2004).

De acordo a expressão da toxina VacA e da presença da PAI*cag*, as linhagens de *H. pylori* podem ser divididas em dois grupos: linhagens tipo I, que expressam a toxina VacA funcional e carregam a PAI*cag*; e linhagens tipo II, que não compartilham nenhuma das duas características (Xiang *et al*, 1995). Estudos posteriores mostraram que as linhagens tipo I possuem um fator adicional, a presença do Sistema *com*B, responsável pela capacidade de transformação natural apresentada por *H. pylori* (Hofreuter *et al*, 2001).

Recentemente, foram identificados em *H. pylori* os genes *ice*A1 e *ice*A2. A expressão de *ice*A1 é induzida por contato com as células epiteliais (Peek *et al*., 1998) e em algumas populações (Peek *et al.,* 1998; van Doorn *et al*., 1998) observou-se uma associação entre o genótipo *ice*A1 e a presença de úlcera péptica. Segundo Xu e colaboradores (2002), *iceA1,* mas *não iceA2*, é um gene funcional de uma endonuclease de restrição, muito semelhante a *nlaIIIR* descrita para *Neisseria lactamica.* No entanto, nosso grupo não encontrou associação entre *ice*A1 e úlcera péptica em trabalho previamente realizado (Gatti *et al*,2006). Pelo contrário, nossos resultados indicaram uma associação negativa entre este gene e úlcera péptica, mas levando em consideração que a grande maioria dos isolados foi *ice*A1+, esta associação inversa deve ser tratada com muito cuidado.

Vale a pena enfatizar que o desenvolvimento das doenças decorrentes da infecção por *H. pylori* resulta de uma complexa e dinâmica interação bactéria-hospedeiro, na qual fatores como características da bactéria, a influência do ambiente sobre o hospedeiro e o genótipo do mesmo, interagem levando ao desenvolvimento da doença (revisto por Chiba *et al,* 2006; Lu *et al*, 2005).

3. 3. Características Genômicas de *H. pylori*

3.3.1. Características gerais do genoma

Com o intuito de descobrir os mecanismos patogênicos de *H. pylori*, os genomas de 2 linhagens de *H. pylori* foram completamente sequenciados e puderam ser comparados (Alm *et al*., 1999).

H. pylori, assim como as demais bactérias especializadas na colonização de poucos nichos ecológicos, possui um pequeno genoma, que contém um mínimo de genes para a regulação de seu metabolismo. (Tomb *et al*., 1997). O tamanho de seu genoma estende-se de 1,6 à 1,73 Mb, com uma média de 1,67 Mb. A composição G+C do genoma é em média 39% (Beji et al., 1988).

Aproximadamente 40% dos isolados de *H. pylori* possuem plasmídios, mas em nenhum caso foram reconhecidos fatores de virulência associados a estes (Kleanthous et al., 1991).

As linhagens de *H. pylori* que tiveram seus genomas sequenciados foram a 26695 e a J99. A linhagem J99 foi isolada em 1994, nos Estados Unidos da América, de um paciente que sofria de úlcera duodenal, enquanto a linhagem 26695 foi isolada na década de 80, no Reino Unido, de um paciente com gastrite (Alm e Trust, 1999).

O seqüenciamento do genoma dessa bactéria poderia facilitar a compreensão acerca da sua biologia e evolução, bem como fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra *H. pylori*, uma vez que a resistência à antibióticos tem aumentado nos países em desenvolvimento, onde a taxa de infecção é mais alta.(Tomb *et al*, 1997).

Algumas características da organização genômica desta bactéria observadas nos trabalhos de sequenciamento (Tomb *et al*., 1997 e Alm et al., 1999) são intrigantes e únicas, dentre as quais citamos a seguir.

Aproximadamente 1% do genoma codifica uma família de 32 proteínas que se localizam na membrana externa e são conservadas nas duas linhagens. Alguns membros dessa família, chamados de porinas, podem ter um importante papel na susceptibilidade desse microrganismo a antibióticos (Tomb *et al*., 1997).

O genoma desta bactéria contém mais de 20 genes homólogos associados com a codificação de enzimas envolvidas na restrição do DNA e sistemas de modificação, incluindo os sistemas do tipo I, tipo II e tipo III. O papel dessas enzimas não é claro até o momento, mas sugere-se que estas estejam envolvidas na quebra de DNA intra e intercelular e que são necessárias para a estimulação da formação de fragmentos de DNA recombinantes (Berg et al., 1997). De fato, muitas bactérias que apresentam genomaa de tamanho reduzido são ricas em sistemas de restrição/modificação, como é o caso de várias espécies de *Mycoplasma* (Brocchi *et al*, 2007).

O genoma de *H. pylori* apresenta zonas de plasticidade com 46 a 48% de seqüências linhagem específica, mas ainda é desconhecido seu papel na biologia de *H. pylori*. Alguns autores defendem que não esteja relacionada com a patogenicidade desta bactéria (Alm *et al.*, 1999) enquanto outros sugerem que estas regiões estariam associadas com a

adaptação ao hospedeiro (Ge e Taylor, 1999). A zona plástica é discutida à parte, com mais detalhes num item mais adiante.

E por fim, tratos homopoliméricos e repetições de dinucleotídeos são, freqüentemente, presentes em genes que codificam proteínas e enzimas presentes na superfície celular e envolvidas na biosíntese de lipopolissacarídeos (LPS) e/ou associado com sistemas de restrição/modificação do DNA. Vinte e seis genes de ambas as linhagens contêm esses tratos e repetições (Alm *et al*, 1999), característica esta também compartilhada com *Mycoplasma* (Brocchi *et al*, 2007). Essas seqüências podem regular a ativação dos respectivos genes (Appelmelk *et al*, 1998). Como visto em outras bactérias, a variação da expressão de proteínas de superfície, tal como flagelinas, sistemas de transporte ABC e outros podem afetar a motilidade, a colonização e a interação patógeno-hospedeiro (Saunders *et al*., 1998; Brocchi *et al*, 2007).

A análise do genoma das linhagens 26695 e J99 revelaram a existência de uma extensa diversidade na seqüência de nucleotídeos, verificada tanto em genes individuais como no genoma como um todo. Uma comparação geral dos genomas das linhagens J99 e 26695 pode ser visualizada na Tabela I.

Tabela I. Comparação geral entre o genoma das linhagens J99 e 26695 de *H. pylori.*

Características do genoma	**Linhagem J99**	**Linhagem 26695**
Tamanho	1,643,831 pb	1,667,867 pb
(G+C)%	39%	39%
"Regiões" transcritas (ORFs)	1495	1590
Com função determinada	875	895
Com função desconhecida	275	290
Específico para *H. pylori*	345	367
OFRs comuns as duas linhagens	1406	1406
Específicos das linhagens	89	117

3.3.2. Variabilidade genética: origens e implicações para o hospedeiro humano

Uma das características mais notáveis de *H. pylori* é apresentar um alto grau de diversidade genética, evidenciado por técnicas de tipagem molecular, como RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), MLST (*multilocus sequence typing*) e PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) (revisto por Kang e Blaser, 2006).

Estudos acerca da diversidade genética dessa bactéria e a possível relação com o desenvolvimento de doenças gástricas levaram a importantes descobertas, tais como a coevolução desse patógeno com o hospedeiro humano (Covacci e Rappuoli, 1999; Linz *et al*, 2007), microevolução durante a infecção (revisto em Suerbaum e Josenhans, 2007; Carrol et al, 2004; Marshall, DG *et al*, 1998) e a geração de quasiespécies (Kuipers *et al*, 1999). A colonização persistente de *H. pylori* no estômago humano tem sucitado debates a respeito de uma possível relação simbiótica entre os dois organimos, mas os resultados são ainda muito contraditórios (Ahmed, 2005).

A grande variabilidade genética de *H. pylori* é reflexo de sua (1) alta taxa de mutação endógena (Wang *et al*, 1999), que ocorre devido (2) à falta de um sistema de correção de pareamento de bases durante a replicação do DNA (Tomb *et al.*, 1997); (3) da sua alta competência para a aquisição de DNA exógeno, tanto de outras linhagens de *H. pylori* como de outras espécies bacterianas (Suerbaum *et al*., 1998 e Falush *et al*., 2001). Além disso, *H. pylori* possui uma (4) alta taxa de recombinação intragenômica devido basicamente à presença de um grande número de seqüências repetitivas de DNA (Aras *et al*., 2003).

H. pylori apresenta uma alta taxa de mutação endógena quando comparada à outras bactérias, tais como espécies da família Enterobacteraceae (Bjorkholm et al, 2001; revisto

em Kraft e Suerbaum, 2005). A mutação é o principal mecanismo responsável pela alta variabilidade genética apresentada por essa bactéria. Além disso, o genoma de *H. pylori* não apresenta um sistema de correção de pareamento de bases, como o Sistema *mut*HLS de *E. coli*. (Wang *et al*, 1999). Esses mecanismos operando em conjunto contribuem para a geração e manutenção da diversidade genética apresentada por *H. pylori*.

H. pylori é um microorganismo naturalmente competente, capaz de captar, internalizar e incorporar DNA exógeno no seu genoma, através de processos de recombinação homóloga (Suerbaum *et al*, 1998). Sabe-se que a competência natural nessa bactéria é dependente da fase de crescimento (Baltrus *et al*, 2006).

O processo de competência natural em *H. pylori* é mediado por um aparato de secreção especializado, pertencente ao grupo dos sistemas de secreção do tipo IV (Kang e Blaser, 2006).

Em 2001, Hoftreuer e colaboradores (Hofreuter *et al*, 2001) descreveram pela primeira vez em *H. pylori* o sistema *com*B, responsável pela captação de DNA exógeno, e conseqüentemente pelo caráter de transformação natural apresentado por essa bactéria. Esse sistema é constituído pelas proteínas ComB4, ComB7, ComB8, ComB9, ComB10, que são componentes de uma maquinaria de secreção tipo IV, e possuem homologia com as proteínas VirB (VirB4, VirB7-10), do sistema VirD4/B de *Agrobacterium tumefaciens*.

A competência natural permite que as várias amostras de *H. pylori* que coexistem no estômago de um mesmo indivíduo possam recombinar, e como resultado, tem-se o aumento na diversidade genética intraespécie dentro do hospedeiro. Os múltiplos eventos de recombinação que *H. pylori* tem sofrido ao longo da sua evolução contribuíram para o caráter panmítico da estrutura das populações de *H. pylori* (revisto em Kang e Blaser, 2006).

Enquanto a mutação é essencial para introduzir a diversidade genética na espécie, não é suficientemente alta para gerar a diversidade alélica apresentada por *H. pylori*. Portanto, os mecanismos de recombinação após a incorporação de DNA exógeno por transformação desempenha um papel importante na geração da variabilidade genética nessa bactéria (Kraft e Suerbaum, 2005).

Além da recombinação decorrente da aquisição de DNA exógeno, as células de *H. pylori* podem sofrer recombinação intragenômica, que pode ocorrer através de *slip-strand mispairing* em regiões de homonucleotídeos, dinucleotídeos ou longos pedaços de DNA repetitivo adjacentes (revisto em Kang e Blaser, 2006; Aras et al 2003)

Essa diversidade genômica é importantíssima para a colonização e conseqüente patogenicidade de *H. pylori,* pois gera diversidade na população dessa bactéria, tanto no geral como em um único hospedeiro, conforme revisado por Blaser e Atherton (2004). Essa enorme diversidade possibilita a esse microrganismo colonizar quase todos os seres humanos presentes no planeta, a despeito da heterogenicidade do hospedeiro. Além disso, o fato de que uma parcela considerável de hospedeiros humanos serem colonizados por mais de um clone de *H. pylori* (revisado por Blaser e Atherton 2004), permite que esse microrganismo possa colonizar um único hospedeiro de maneira persistente, adaptando-se aos mais diferentes nichos gástricos e às mudanças que possam ocorrer devido ao desenvolvimento, reposta imune e mudanças do hábito de vida desse hospedeiro em particular (Kang e Blaser, 2006).

A extrema variabilidade genética apresentada por esse patógeno, evidenciada após a análise genética dos 2 genomas completamente sequenciados, originou uma discussão a respeito do envolvimento de tal heterogeneidade com a habilidade de *H. pylori* causar diferentes quadros clínicos e com a cronicidade da infecção (Alm, 1999).

A presença de genes linhagem-específicos representa uma das medidas da diversidade genética. Essa alta diversidade genética pode contribuir para uma alta diversidade fenotípica, que por sua vez seria responsável pelo desenvolvimento de diferentes patologias como resultado da infeção pelo mesmo microorganismo (Alm, 1999).

A figura 1 ilustra as causas da enorme variabilidade genética apresentada por *H. pylori*, que pode estar envolvida na persistência desse patógeno no estômago do hospedeiro humano por toda a vida do indivíduo infectado.

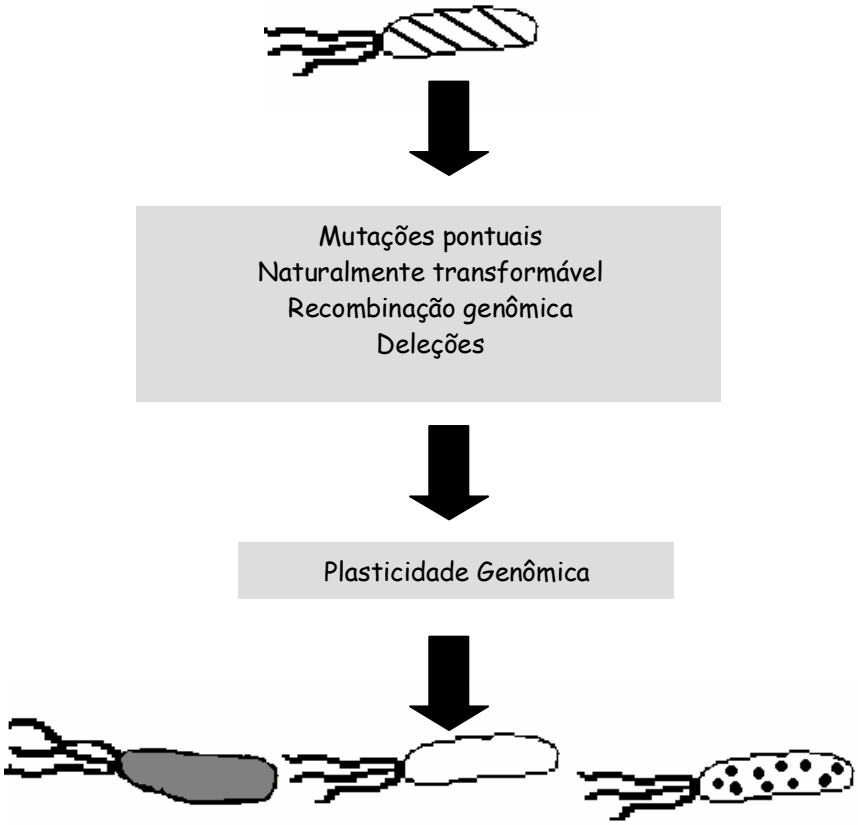


Figura 1. Mecanismos envolvidos na origem da variabilidade genética apresentada por *H. pylori* e suas implicações para a colonização persistente no estômago do hospedeiro humano. Baseado em Kang e Blaser (2006).

As populações de *H. pylori* num hospedeiro humano individual mostra grande diversidade (Israel *et al*, 2001). Primeiramente, múltiplas linhagens diferentes podem estar presentes. (Ghose *et al,* 2005). Segundo, dentro de linhagens individuais, variação pode originar devido a mutações pontuais, deleções ou expansões envolvendo DNA repetitivo, em adição a rearranjos. Terceiro, como linhagens individuais e seus numerosos variantes podem trocar DNA uns com os outros, o número de variantes em potencial é grande e indefinido (revisto em Kang e Blaser, 2006).

Este poder de gerar variantes genéticos permite que *H. pylori* se adapte a nichos particulares nos hospedeiros individuais, que podem mudar com o tempo. Diferentes linhagens podem produzir níveis variaveis de inflamação, que é patológica e leva a consequências clinicas. (revisto em Kang e Blaser, 2006).

A população adquirida no início da infecção seria constituída de muitas diferentes subpopulações. De acordo com as mudanças e pressões seletivas exercidas por parte do hospedeiro, a subpopulação com maior *fitness* seria expandida, permitindo que *H. pylori* estabeleça uma infecção persistente no estômago humano (Suerbaum e Josenhans, 2007). Essa característica de apresentar um *pool* de variantes genéticos dentro de um único hospedeiro, capaz de adaptar às mudanças ao longo do tempo, confere à *H. pylori* um caráter de quasispécie. Neste contexto, nosso grupo recentemente verificou que a infecção de um mesmo paciente por amostras PAI*cag*+ e PAI*cag*- é um evento comum em nosso meio (Proença-Módena *et al*, 2007).

Mesmo possuindo uma variabilidade genética notável, *H. pylori* apresenta uma estrutura clonal, sendo que a distribuição dos poucos clones segue um padrão geográfico Alguns dos grupos clonais podem ser encontrados nas Américas, África, Ásia e Europa. (Falush *et al*, 2001; Linz et al, 2007).

3.4. *H. pylori*: coevolução com o hospedeiro humano

A relação bactéria-hospedeiro entre *H. pylori* e o ser humano é consideravelmente antiga, remontando ao período pré-colombiano. *H. pylori* tem sido detectada em amostras de fezes originárias de múmias do período pré-colombiano, de mais de 1700 anos de idade. (Alm, 1999).

Estudos acerca da variabilidade genética de *H. pylori* e sua distribuição geográfica pelo globo apontam uma relação entre a estrutura clonal dessa bactéria e a dispersão das populações humanas, sugerindo que os polimorfismos bacterianos refletem as migrações históricas realizadas pelo homem (Covacci *et al*, 1999; Falush *et al*, 2003; Linz *et al*, 2007).

Um trabalho realizado recentemente (Linz *et al*, 2007) mostra que *H. pylori* parece ter espalhado do leste da África em torno de 58.000 anos atrás, assim como acompanhou o homem moderno durante suas migrações a partir da África por volta de 50.000-70.000 anos atrás. Isso implica que os humanos modernos já tinham sido infectados com *H. pylori* antes de iniciar as migrações a partir da África e fica demonstrado que *H. pylori* esteve associada com a população humana desde então. Sendo assim, concluiu-se que *H. pylori* estava presente na África antes dessas migrações, sugerindo que a África é o berço de origem tanto de *H. pylori* como dos humanos modernos.

A compreensão do padrão de distribuição das subpopulações de *H. pylori* é importante não somente para os estudos evolutivos mas também têm relevância médica. Diferentes regiões geográficas apresentam diferentes resultados a respeito da associação de fatores de virulência e doenças, o que pode ser um reflexo das diferenças na prevalência local de subpopulações de *H. pylori.* De modo similar, no desenvolvimento de testes diagnósticos, antibióticos e vacinas, deve-se levar em conta a diversidade global, que deve levar em conta os isolados representativos de determinadas regiões (Falush *et al*, 2003).

Uma vez que a variabilidade genética de *H. pylori* segue o mesmo padrão da variabilidade genética humana, tem sido proposto o uso de *H. pylori* como marcador para a a migração humana.

3.5. Ilha de Patogenicidade *cag* (PAI *cag*)

Um dos mais importantes fatores de virulência de *H. pylori* é a presença de uma ilha de patogenicidade, *cag* (***c****ytotoxin* ***a****ssociated* ***g****ene pathogenicity island*, *cag*-PAI), que recebeu essa denominação devido ao primeiro gene identificado nesta região (*cagA*). Essa ilha de patogenicidade é um *locus* de aproximadamente 40 Kb, contendo cerca de 28 genes organizados em um "cluster", que pode ser transmitido de uma bactéria a outra, como uma só unidade, por transferência gênica horizontal (*Covacci et al*., 1999). O conteúdo GC da ilha de patogenicidade *cag* é menor do que o presente no genoma de *H.pylori*, o que sugere uma origem exógena. Um elemento de inserção presente no genoma de algumas linhagens divide a ilha *cag* em duas partes, *cag*I e *cag*II, sendo que *cag*I se localiza após IS605 e *cag*II, antes esse elemento de inserção (*Censini et al.*, 1996). A figura 2 ilustra a estrutura geral da PAI*cag*. A figura 3 mostra com detalhes a composição gênica das regiões cagI e cagII.

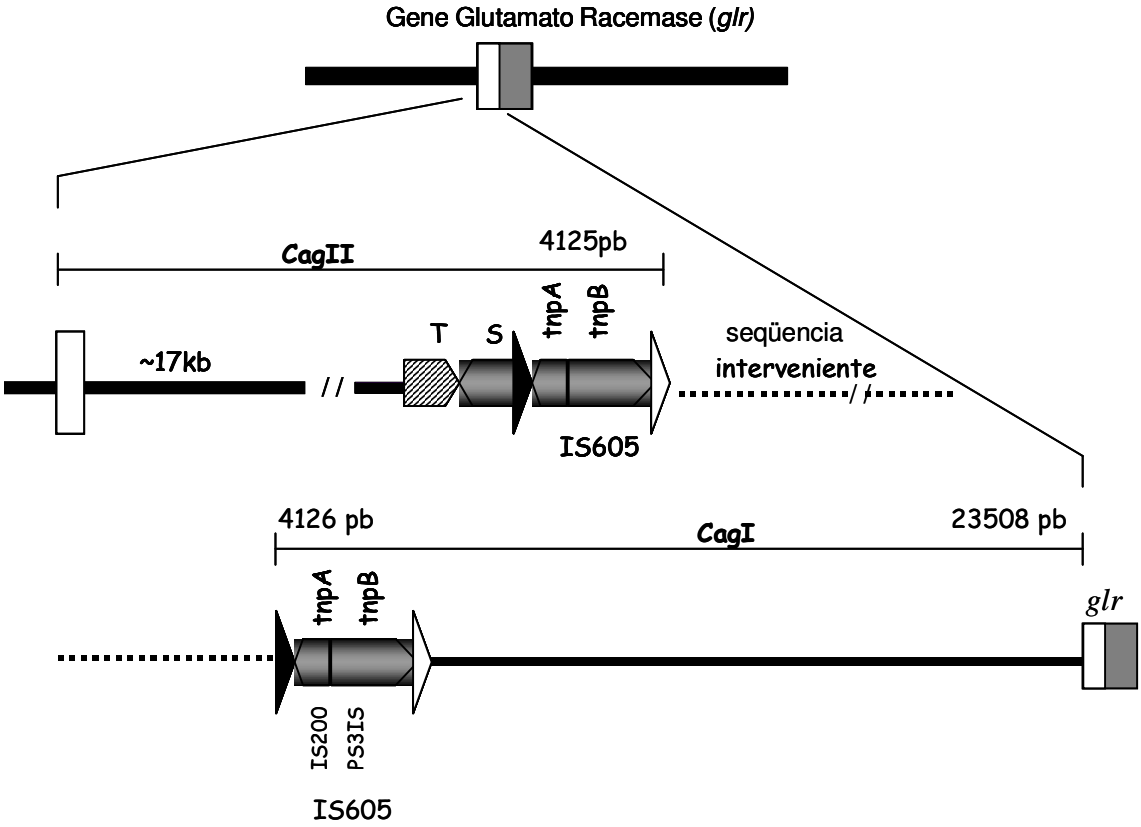


Figura 2. Estrutura geral básica da PAI*cag* de *H. pylori.* Baseado em Censini *et al* (1996).

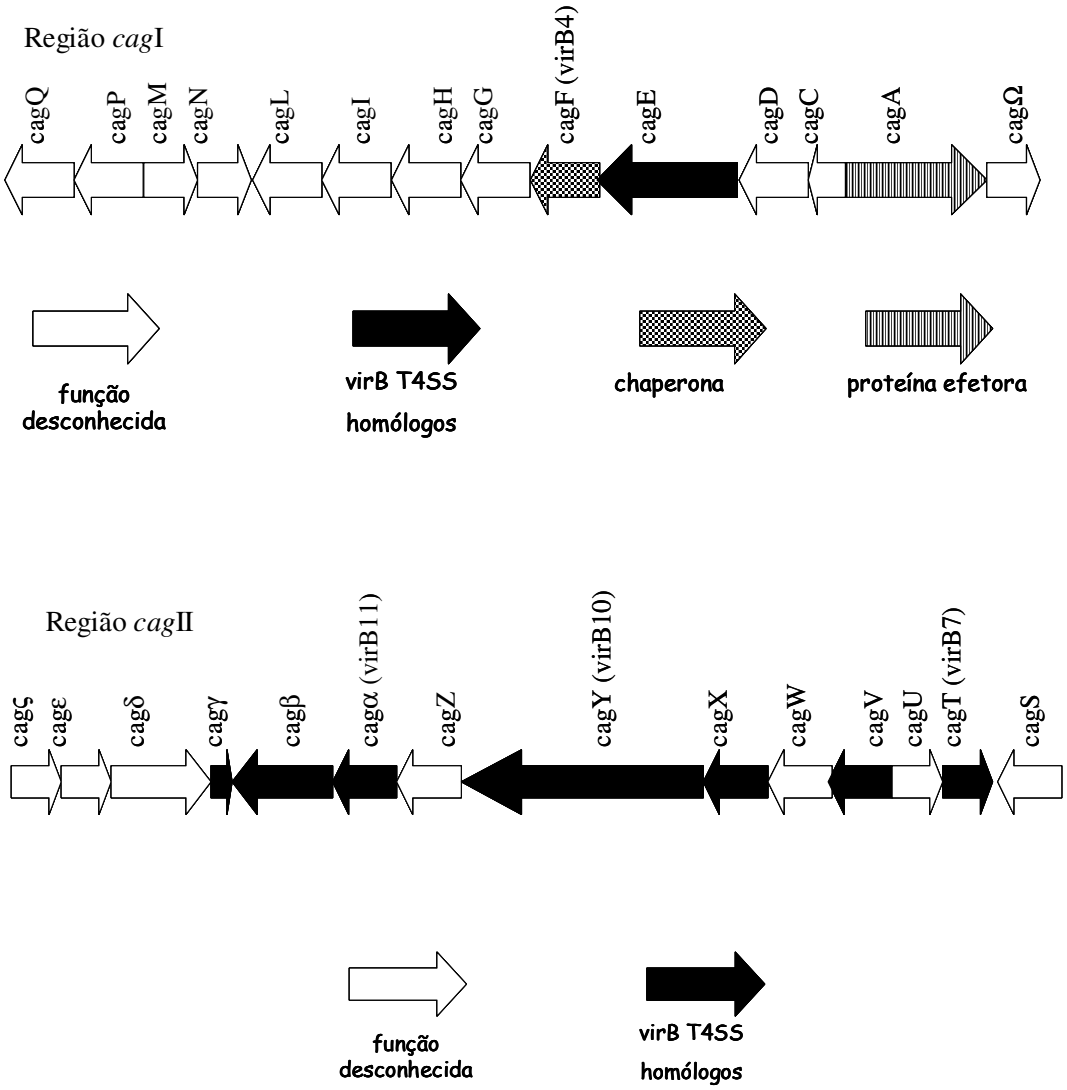


Figura 3. Composição gênica das regiões *cag*I e *cag*II da PAI*cag* de *H. pylori*. Baseado em Gal-Mor e Finlay (2006).

A presença da PAI *cag* está relacionada com a capacidade da bactéria em induzir a produção de interleucina 8 pelas células epiteliais (Censini *et al*., 1996), contribuindo para uma resposta inflamatória (Telford *et al*., 1997). Dentro da região *cag*, o gene *cag*E (ou *picB*) é um elemento requerido para a indução de IL-8 (*Tummuru et al*., 1995). Amostras PAI*cag*+ estão geralmente associadas a casos mais graves da doença em humanos (*Blaser e Atherton*, 2004).

Há relatos na literatura de pacientes infectados com linhagens que apresentam alta similaridade genética, mas composição heterogênea da PAI *cag*, o que indica a presença de uma mesma linhagem apresentando diferentes status da PAI *cag*, no estômago de um mesmo paciente (*Proença-Módena et al*., 2007). Uma explicação para essa observação clínica é a instabilidade da PAI *cag*, que pode ser completamente deletada de uma linhagem ou sofrer deleções parciais (Kersulyte *et al*, 1999). Em um estudo recente realizado no Brasil, *Proença-Módena et al.* (2007) sugerem que a infecção mista, por amostras de *H. pylori* PAI*cag*+ e PAI*cag*- pode contribuir para a persistência dessa bactéria no hospedeiro, visto que os genes *cag* afetam a fisiologia do estômago, modulando a resposta imune à infecção e influenciando o desenvolvimento de diferentes patologias gástricas. Que seja de nosso conhecimento, este trabalho foi o primeiro a investigar o fenômeno de infecção simultânea por amostras PAI*cag*+ e PAI*cag*- no Brasil.

A PAI*cag* contém 7 genes homólogos aos genes da maquinaria de secreção tipo IV de *A.tumefaciens* (complexo VirB/D) (Covacci *et al*, 1999; Lu *et al*, 2005), especializada na transferência de complexos multimoleculares através da membrana bacteriana ao espaço extracelular ou para o interior da célula hospedeira. Esses complexos multimoleculares estão envolvidos na transdução de sinais entre a célula bacteriana e a hospedeira, assim modificando a resposta do hospedeiro, incluindo a indução da produção de citocinas que

recrutam e ativam células imunes, contribuindo com o desenvolvimento de gastrite ou outras manifestações clínicas (*Covacci et al*., 1999). Covacci e colaboradores sugerem que os produtos dos genes *cag* homólogos ao *vir*B4 (*cag*E), *vir*B7 (*cag*T), *vir*B9 (*cag*ORF528), *vir*B10 (*cag*ORF527), *vir*B11 (*cag*ORF525/cagα) e *vir*D4 (*cag*ORF 524) se reúnem num complexo que forma o *core* para a montagem da maquinaria de secreção (Covacci *et al.*, 1998).

Um exemplo de uma molécula que é injetada por essa maquinaria de secreção e causa profundas mudanças no fenótipo de células gástricas epiteliais, podendo, portanto, ser importante para a patogenicidade de *H. pylori* é a proteína CagA. Através desse sistema de secreção, a proteína CagA é injetada para dentro da célula epitelial hospedeira (Odenbreit *et al*., 2000), onde é capaz de: aumentar a proliferação celular (Mimuro *et al*., 2002); promover apoptose das células epiteliais (Higashi *et al*., 2002); promover um rearranjo do citoesqueleto levando a um fenótipo extremamente alongados das células (fenótipo "*hummingbird*") (Selbach*, et al*., 2003); e provocar alterações que levem ao fenótipo da célula esparramada (Blaser e Atherton, 2004).

O gene *cag*A tem sido considerado um marcador para a presença da PAI cag em amostras de *H. pylori* (Censini *et al*, 1996) e também para úlcera péptica (Rudi *et al*, 1998).

3.5.1. Gene *cag*T

O gene *cag*T é homólogo do gene *vir*B7 de *A. tumefaciens* (*Covacci et al.*, 1998) e codifica uma proteína de membrana externa (*Cascales e Christie,* 2003), encontrada na base do pilus do aparato de secreção tipo IV (Rohde et al, 2003). Uma das funções

propostas para VirB7 é a formação de um dímero com VirB9, que estabilizaria outras proteínas VirB.

Em um trabalho recente realizado no Brasil, Mattar e colaboradores (2007) detectaram o gene *cag*T em 86% das amostras de *H. pylori*, sendo que essa porcentagem sobe para 98% para isolados obtidos de casos de úlcera péptica . Análises estatísticas mostraram uma relação entre a presença do gene *cag*T e aumento de 27 vezes no risco de desenvolvimento de úlcera péptica.

3.5.2. Gene *vir*B11

O gene *vir*B11 (ou $HP025_{Cag}$) de *H.pylori*, localizado na metade esquerda da PAI*cag* (Christie *et al*, 2005), codifica a proteína VirB11, que é um membro de uma grande família de ATPases associadas com sistemas dedicados a secreção de macromoléculas.

Particularmente, as VirB11 ATPases fazem parte da estrutura do sistema de secreção tipo IV (T4SS), utilizado por patógenos para injetar macromoléculas diretamente no interior das células hospedeiras eucarióticas, através do contato direto com as últimas. (Cascales e Christie, 2003).

Através de sua função como ATPase, VirB11 fornece energia para secreção de substrato e também para biogênese do *pilus*, sendo portanto um componente de suma importância para o funcionamento do T4SS de *H. pylori.* Análises cristalográficas pressupõem que as proteínas da família VirB11 de ATPases funcionem como poros de arranjo hexaméricos, cuja abertura e fechamento seria regulada pela ligação e liberação de ATP, respectivamente. Estudos estruturais fortalecem a hipótese de que as VirB11 ATPases direcionam a montagem da maquinaria de secreção tipo IV e dirigem a passagem de

substratos através do envelope bacteriano por meio de mudanças conformacionais mediadas pela ligação e liberação de ATP (Cascales e Christie, 2003).

Não existe nenhum estudo investigando a presença do gene *vir*B11 em isolados brasileiros de *H. pylori*. Dada a importância da proteína VirB11 na maquinaria de secreção, e da proteína efetora CagA no desenvolvimento doenças gástricas, estudos sobre a presença do gene *vir*B11 e sua possível associação com patologias decorrentes da infecção por *H. pylori* poderia fornecer informações importantes a respeito da relação bactéria-hospedeiro entre esse patógeno e o homem.

3.6. Zona de Plasticidade (ou Zona Plástica) de *H. pylori*

O seqüenciamento dos genomas das linhagens J99 e 26695 mostrou que *H. pylori* apresenta 6 a 7 % de genes linhagem-específicos, sendo que aproximadamente metade desses genes, entre 46 e 48%, se localiza numa única região hipervariável denominada "zona plástica" (Alm, 1999). Uma análise da homologia mostra que a maioria dos genes linhagem-específicos são também específicos de *H. pylori*, uma vez que não são encontrados homólogos nos bancos de dados públicos. Embora poucos desses genes tenham uma função atribuída, a maioria (cerca de 60%) codifica enzimas de restrição/modificação do DNA (Alm, 1999).

Assim como outras regiões do genomas de *H. pylori*, a zona de plasticidade apresenta um conteúdo G+C menor do que o resto do genoma, sugerindo uma origem exógena. Regiões no genoma com conteúdo G+C similar tem sido encontradas também em plasmídios, sugerindo que tanto os eventos de transferência gênica horizontal a partir de outras espécies, quanto a integração de plasmídios no genoma, podem ter sido responsáveis pela diversidade linhagem-específica detectada nessa região (Alm, 1999).

Após investigação da diversidade da zona plástica em 43 linhagens de *H. pylori*, Occhialini e colaboradores (2000) mostraram que essa região apresentava uma estrutura de mosaico.

Alguns genes localizados na zona plástica de *H. pylori* tem sido sugeridos como marcadores potenciais para o desenvolvimento de doenças decorrentes da infecção por esse patógeno (Occhialini et al, 2000), embora os relatos sejam contraditórios.

3.6.1. Locus *dup*A

Uma investigação recente da relação entre a presença de genes homólogos a *vir* e distúrbios gástricos revelou a associação dos genes *jhp917* e *jhp918* (homólogos ao gene *vir*B4) ao desenvolvimento de úlcera duoduenal em pacientes da América do Sul e Leste da Ásia. Esses genes encontram-se na região de plasticidade do genoma de *H.pylori* e formam um *locus* contíguo, *dupA* (*duodenal ulcer promoting gene*), que foi sugerido como marcador para o desenvolvimento de úlcera duodenal e proteção contra atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico (*Lu et al*, 2005). Como esse padrão foi similar nas regiões geográficas examinadas, tal observação não refletia a circulação regional de um genótipo particular. A presença do gene *dup*A foi associada também a um aumento na produção de IL-8 verificado na região do antro da mucosa gástrica *in vivo* e também a partir de células epiteliais *in vitro*, devido a ativação de fatores de transcrição de IL-8 (Lu *et al,* 2005); esses dados justificam a intensa infiltração neutrofílica observada.

O locus *dupA* codifica proteínas homólogas a VirB4 de *A. tumefaciens*, que tem atividade de ATPase. Essas ATPases fornecem a energia necessária para a montagem correta do complexo de secreção ou transporte das moléculas efetoras (revisto por *Lu et al*, 2005).

4. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Embora seja reconhecida a importância dos fatores de virulência já descritos no desencadeamento de distúrbios gástricos, não existe ainda um gene marcador universal ligado a uma doença específica decorrente da infecção por *H. pylori* (*Lu et al*, 2005). Algumas características genéticas dessa bactéria parecem contribuir para a dificuldade de estabelecer tais genes. As altas taxas de mutação, combinadas à alta competência para adquirir DNA heterólogo, resultam numa alta freqüência de recombinação genética, que pode levar ao aparecimento de populações bacterianas regionais com características particulares, o que dificulta o estabelecimento de marcadores genéticos universais para as doenças resultantes da infecção por *H.pylori*.

Os objetivos deste trabalho são: investigar a presença dos genes *jhp*917, *jhp*918, *cag*T e *vir*B11, em amostras de *H. pylori* de pacientes brasileiros, permitindo assim caracterizar melhor a região *cag*-II da PAI *cag*; Não há nenhum estudo sobre a associação do locus *dup*A e úlcera duodenal no Brasil, nem investigação da presença do gene *vir*B11.

5. ARTIGO (a ser submetido)

Implication of *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island (*cag*PAI) genes on the development of gastroduodenal diseases

Alline Roberta Pacheco[a], José Luiz Proença-Módena[b], Ana Isabela Lopes Sales[b], Yara Fukuhara[c], Wanderley Dias da Silveira[a], José Luiz Pimenta-Módena[d], Ricardo Brandt de Oliveira[c] and Marcelo Brocchi[a *]

[a]Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

[b]Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, [c]Departamento de Clínica Médica, and [d]Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: **Marcelo Brocchi**

Correspondence address: Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-861 Campinas, SP, Brazil

FAX: +55-19-3521-6276

Phone: +55-19-3521-6223

E-mail:mbrocchi@unicamp.br

Abstract

H. pylori infection has a worldwide distribution and is associated with the development of several gastroduodenal diseases, such as gastritis (G), peptic ulcer disease (PUD) and its subtypes, gastric ulcer (GU) and duodenal ulcer (DU), and gastric adenocarcinoma. Although a number of putative virulence factors had been reported for *H. pylori*, there are conflicting results regarding their association with specific *H. pylori* related-disease. In this work, we investigated the presence of *vir*B11 and *cag*T, located in the left half of PAI*cag*, and the genes *jhp*917-*jhp*918, components of the *dup*A *locus*, which is located in the plasticity zone region of *H. pylori*, in Brazilian isolates of *H. pylori*. We also searched for association of these genes with some *H. pylori* related-diseases, such as gastritis, PUD, GU, DU and gastroesophageal-reflux (GERD), in an attempt to find a gene marker for a clinical outcome resulted from *H. pylori* infection. The *cag*T gene was associated with PUD and GU; *vir*B11 gene was detected in nearly all the samples; *dup*A locus was not associated with development of DU neither any gastroduodenal disease. In this way, our results suggest that *cag*T can be used as a marker for the developmentof PUD in State of São Paulo, Brazil; *vir*B11 can be an essential virulence gene for *H. pylori* pathogenesis on the development of gastritis and PUD; *dup*A locus is not an universal marker for the development of DU.

Keywords: ***H. pylori* genotypes, gastric disorders, *cag*PAI, plasticity region, *vir*B11, *dup*A, *cag*T**

Introduction

H. pylori is a Gram-negative, spiral-shaped, microaerophilic bacterium that colonizes the human gastric mucosa, where it could persists for the lifetime. This pathogen infects the stomach of approximately half of the humankind, being responsible for several upper gastroduodenal diseases in the host, such as gastritis (G), peptic ulcer disease (PUD), gastric adenocarcinoma and MALT lymphomas. Its ubiquitous character makes *H. pylori* one of the most successful bacterial pathogens (Suerbaum and Josenhans, 2007). Although infection occurs worldwide, there are significant differences in the prevalence of the infection both within and between countries. In general, the overall prevalence of *H. pylori* infection in developing countries like Brazil is high, and the percentage of infected people can be 80% (Covacci *et al.*, 1999). However, only a small proportion of infected people (~10-20%) become sick (Blaser e Atherton, 2004). Taken together, these data suggest that the disease development in *H. pylori* infected individuals is the result of a dynamic interaction between this bacterium, the host and environmental factors.

The *cag* Pathogenicity Island (*cag*PAI) is a 40kb region, which could be interrupted by one or more insertion elements *IS*605, which splits the island in two regions, named *cag*I and *cag*II. The *cag*II half is located before the *IS*605, while *cag*I is located after *IS*605. The *cag*PAI comprise approximately 28 genes, some of which are homologs to Type IV secretion systems (T4SS) (Censini *et al*, 1996; Covacci *et al*, 1999). Using its T4SS, *H. pylori* injects CagA (Odenbreit *et al*., 2000; Fisher *et al*, 2001), a major virulence factor encoded by *cag*A gene, into gastric epithelial cells, which undergo several functional alterations (Selbach, *et al*., 2003; Mimuro *et al*., 2002). Also, CagA is responsible for impairment of the function of immune cells such as macrophages (Ramarao *et al*., 2000).

Both *cag*A and the *cag*E genes, the later also playing a role in generating the gastric inflammation besides the *cag*A gene, are located on the *cag*I-half of *cag*PAI. The importance of these genes in diseases outcomes was investigated in previous works of our group (Gatti *et al*., 2006; Proença-Módena *et al*., 2007). However, most of the *vir* homolog genes are located in the *cag*II-half region of *cag*PAI, such as *cag*T and *vir*B11, whose function on the pathogenesis are not fully understood. Recently, a work performed by Mattar *et al* (2007) with *H. pylori* strains isolated in Brazil showed a strong association between *cag*T and PUD development. On the other hand, the association of *virB*11 gene with clinical outcomes was not investigated in our country.

Genes located in the plasticity region of *H. pylori*, such as *jhp*947 and *jhp*986 have been cited as virulence markers of *H. pylori* infection (Santos *et al*., 2003; de Jonge *et al*., 2004), but the data in the literature are conflicting (Proença-Modena *et al*., 2007). Recently, Lu *et al* (2005) showed *dup*A (**d**uodenal **u**lcer **p**romoting gene) locus as a novel virulence marker for the development of duodenal ulcer. These authors proposed *dup*A as a universal marker for DU. The *dup*A is a locus comprising two genes, *jhp*917 and *jhp*918.

The aim of this work was to investigate association of *dupA*, *cag*T and *vir*B11 and clinical outcomes. We also associated the presence of these genes with markers previously analyzed (Proença-Modena *et al*., 2007). It is important to emphasize that there is no study concerning the association between *dupA* locus and duodenal ulcer performed in our country, neither the relationship between *vir*B11 and clinical outcomes such as gastritis and peptic ulcer disease.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of biopsy samples from patients

This study was done with *H. pylori* isolates from 79 patients (31 males and 48 females; mean age ± SD, 44.1 ± 13.3 years) who attended the Endoscopy Service of the Medical School Hospital (HCRP) of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP), University of São Paulo (USP) and the Santa Casa Hospital (SCH), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. The study protocol was approved by the ethics committee of the HCRP.

The patients were clinically evaluated and the gastrointestinal signs and symptoms were recorded. Upper gastrointestinal endoscopy was done as described previously (Proença-Modena *et al.*, 2007). Biopsies from the corpus and from the antrum of the stomach were taken from each patient using a flexible biopsy forceps (5 mm cups - Endo-flex® GmbH, Voerde, Germany).

2.2. Patient disease classification

Patient diseases were classified as gastritis (G), peptic ulcer disease (PUD) and gastroesophageal reflux disease (GERD). PUD was diagnosed based on endoscopy findings and was further classified as gastric (GU) or duodenal (DU) ulcer. GERD was diagnosed using the criteria described by Heading and Castell (2004). Gastritis was diagnosed on the basis of positive histological findings and the absence of peptic ulcer disease. In this study, 29 patients had gastritis (G), 44 had PUD (24 with GU and 20 with DU), and six had a normal gastric mucosa (N), despite having symptoms of gastric disturbance. In addition to the clinical manifestations cited above, 10 patients had GERD in addition to gastritis.

2.3. The urease test (CLOtest®)

One biopsy from the antrum and another from the corpus of the stomach were used to detect *H. pylori* by the urease test (Glupczynski, 1996).

2.4. Histological examination

For histological examination and diagnosis of the disease, the second pair of biopsies was immediately fixed in 10% formalin and taken to the Pathological Anatomy Service of the HCRP, where the tissues were embedded in paraffin blocks, sectioned, stained with hematoxylin and eosin (HE) and examined under light microscopy (magnification 1000 x). The same histological specimens were used for conventional histological examination, diagnosis of the disease, and the detection of bacteria that resembled *H. pylori*.

2.5. H. pylori culture

The procedures concerning *H. pylori* culture are the same as described previously (Proença-Modena *et al*., 2007). Briefly, bacterial suspensions were placed on 3.9% Columbia agar medium (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) enriched with 5% horse blood, 0.2% β-cyclodextrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 100 µg of cycloheximide/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 5 µg of vancomycin/mL (Ariston, São Paulo, São Paulo, Brazil), and 8 µg of amphotericin B/mL (Bristol-Myers Squibb, New York, New York, USA). The cultures were incubated for five days under microaerophilic conditions (5-6% O_2, 8-10% CO_2, 80-85% N_2, and a relative humidity of at least 95%). Bacterial growth was confirmed as being *H. pylori* by microscopic examination

of slides after Gram staining, and by the urease, catalase, and oxidase tests (Glupczynski, 1996).

The bacterial strains were stored at -70ºC in Brain Heart Infusion medium (BHI 37g/L, Oxoid) enriched with 20% glycerol, 10% fetal bovine serum, and 0.2% cyclodextrin.

2.6. Genomic DNA extraction

A pool of bacterial colonies obtained from each culture and representing one patient was transferred to a microcentrifuge tube containing 500 µL of sterile BHI (37 g/L) solution. After 5 min of centrifugation at 6,000 *g*, the supernatant was discarded and the pellet stored at -20º C for DNA extraction. DNA was extracted by the phenol/chloroform method as previously described (Brocchi *et al*., 1999). The amount and purity of the DNA were determined as described elsewhere (Sambrook and Russell, 2001), and the integrity was assessed by electrophoresis in a 0.8% agarose gel.

2.7. PCR detection of DNA gene-related sequences

DNA sequences were detected in the genome of *H. pylori* strains by the polymerase chain reaction (PCR). For each reaction, a mixture containing 20 pmol of the forward and reverse primers, 20-30 ng of genomic DNA, each deoxynucleoside triphosphate (Invitrogen-Life Technologies, Carisbad, California, USA) at a concentration of 100 µM, 2,5 U of *Taq* DNA polymerase (LGC, Cotia, São Paulo, Brazil) and $MgCl_2$ at the concentration of 3mM in appropriate buffer provided with the enzyme, in a final volume of 50 uL, was used.

The reactions were done in an automated MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc, Waltham, Massachusetts, USA). The *Escherichia coli* strain DH5α (Hanahan et al., 1991) was used as the genotype negative control. Deionized water was used as the negative control for the reaction. *H. pylori* strains 26695 (ATCC700392: American Type Culture Collection, Rockeville, MD) was used as positive control for *cag*T and *vir*B11, while and J99 (ATCC700824) was used as positive control for *dup*A.

All amplified PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis as described previously (Proença-Modena *et al*., 2007). Standards 1 kb and 100bp DNA ladders (Fermentas Life Sciences, Hanover, Maryland, USA) were used as molecular size markers.

*2.8. Detection of the ure*A gene

The presence of the *ureA* gene was used as an additional molecular marker to confirm the identification of *H. pylori* at the species level and to corroborate its identification by phenotypic methods. Detection of the *ure*A gene was also used to monitor the purity of the DNA samples, thereby validating all subsequent analyses. The genomic DNA of the bacterial samples was amplified with the synthetic oligonucleotide primers HPU1 and HPU2 (Table 1) as described by Clayton *et al*. (1992).

*2.9. PCR detection of the dup*A *locus, virB11 and cagT*

The recently described *dup*A locus formed by two contiguous genes, *jhp*917 and *jhp*918, was detected by PCR using the primers described by Lu *et al.* (2005). The *vir*B11 gene was identified by PCR using a specific pair of primers (Table 1) described by Lu *et al*

(2005) as well as the *cag*T gene using the pair of primers described by Ali *et al* (2005). All the primers are depicted in Table 1.

2.10. Sequence analysis

At least ten PCR products corresponding to *jhp*917, *jhp*918, *vir*B11 and *cag*T were purified using EXOSAP (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) according to the manufacture´s instructions.

The purified amplicons were then sequenced using the ET terminator kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) with a MegaBace automated sequencer, as previously described (Brocchi *et al.*, 2007).

2.11. Statistical analysis

The correlation between the *H. pylori* genotypes and clinical disease was assessed using either the chi-squared test with Yates' correlation or Fisher´s exact test. Only cases containing single genotypes were included in these analyses. The analyses were run in the BioEstat 3.0 program (CNPq, Brasilia, DF, Brazil). Logistic regression was used to examine the relationship between the *H. pylori* genotypes and the clinical outcomes adjusted for the age and gender of the patients. These analyses were done using the Epi Info program (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). A value of $P \leq 0.05$ indicated significance.

3. RESULTS

The aim of this work was to examine the presence of *H. pylori* virulence markers in 79 clinical isolates as well as to investigate possible associations between these markers with clinical outcomes. We characterized the strains for the presence of *dupA*, *virB11* and *cagT* genes. The *H. pylori* strains were selected from our collection in order to not contain multiple infection samples determined previously by means of *vac*A subtyping (Proença-Modena *et al*., 2007).

The *ure*A gene was detected in all samples (results not showed) confirming the phenotypic techniques used for *H. pylori* identification as well as the quality and purity of the DNA samples.

3.1. *Amplification of plasticity zone genes*

The *jhp*917 gene was detected in most of the strains (92.4%) tested (Figure 1A, Figure 3 and Table 2). On the other hand, a lower percentage of the strains were positive for *jhp*918 gene. This gene was detected in 67.0% of the strains (Figure 1B, Figure 3 and Table 2). Statistical analysis indicated no association of *jhp*917 with any specific clinical outcome. The *P* values obtained by the chi-squared tests showed no association between *jhp*917 gene and gastritis ($P = 1.0000$), neither with PUD ($P = 0.6882$), GU ($P = 0.6614$), DU ($P = 0.3283$) or GERD ($P = 0.5957$). Similar results were obtained for *jhp*918 with *P* values for gastritis ($P = 0.9824$), PUD ($P = 0.9927$), DU ($P = 0.9639$) and GU ($P = 0,7543$) all higher than 0.05.

3.2. *Amplification of cagPAI genes*

The *vir*B11 gene was detected in 89.9% of the strains (Figure 2A, Figure 3 and Table 2) in spite of the different clinical outcomes presented by the patients. Statistical analysis indicated no correlation between *vir*B11 presence and gastritis (P = 0.7032), neither with PUD (P = 0.7275), GU (P = 0.6926), DU (P = 1.0000) or GERD (P = 1.0000). Therefore, *vir*B11 presence could not be correlated to any gastric disorders associated with *H. pylori* infection.

The *cag*T gene was detected in 65.8% of the strains (Figure 2B, Figure 3 and Table 2). Statistical analysis showed association between *cag*T and PUD (P = 0.0302) as well as with GU (P = 0.05).

3.3. *Association of cagT with other virulence markers*

Statistical analysis were performed in order to find association between *cag*T and other virulence genes investigated in a previous work (Proença-Módena *et al*., 2007), including *cag*A, *vac*A and its subtypes, *vacAs1*, *vacAs2*, *vacAm1* and *vacAm2*. The P values obtained by the chi-squared tests showed correlation between *cag*T and *cag*A (P = 0.008), *cag*E (P = 0.0169), *vacAs1* (P = 0.0009), *vacAm*1 (P = 0.0145) and *vacAs1m1* (P = 0,0145). On the other hand, an inverse association was found between the presence of *cag*T and *vacAs2* (P = 0.0009), *vacAm2* (P = 0.0145) and *vacAs2m2* (P = 0.0009). No association was found between *cag*T and the *vacAs1m2* genotype (P = 0.4890). On the other hand, *vir*B11 was not associated with any of the markers tested. Interestingly, 12 (16.9%), 7 (9.8%) and 23 (32.4%) of the *vir*B11-positive strains were negative for *cag*A, *cag*E and *cag*T (data not shown) indicating that the *cag*PAI has a mosaic structure in these strains.

3.3. *Logistic regression*

Logistic regression analysis to assess the relationship between virulence markers and disease, showed correlation between *cag*T and PUD (*P* = 0.0189, OR 3.21, CI 1.23 a 8.45) and GU (*P*= 0.0366, OR 3.59, CI 1.10 a 11.92), even after adjusting for patient age and gender.

4. DISCUSSION

Although a number of studies concerning *H. pylori* virulence genes had been conducted, an invariable virulence marker for a *H. pylori*-related disease is missing (Lu *et al.*, 2005). The identification of a disease-specific *H. pylori* virulence factor predictive of the outcome of the infection could be useful in practical clinics, because would help to identify patients who are at high risk to develop a serious disease related to *H. pylori* infection, such as peptic ulcer disease.

In a previous work performed by our group, Proença-Módena *et al.* (2007) examined the genes *cag*A and *cag*E (a *vir*B4 homolog) located in the *cag*I region and we showed that *cag*A was associated with development of PUD, while *cag*E was considered a more reliable gene for the presence of the *cag*PAI. To increase our knowledge regarding the *cag*II region of *cag*PAI in this *H.pylori* samples, in this work we investigated the presence of *vir*B11 and *cag*T.

We detected *vir*B11 in virtually all samples analyzed (89.9%). Statistical analysis showed no association between *vir*B11 and any of the diseases investigated. Therefore, we concluded that this gene could not be used as a marker for a disease outcome in our area. Our results suggest that this gene could be an essential virulence factor, involved in the

pathogenesis of gastritis and PUD. It should be highlighted that this is the first work which investigated the *vir*B11 gene in Brazil.

There are only a few works in the literature regarding *vir*B11 detection. In a work aiming to analyze *cag*PAI composition of *H. pylori* strains in Italy, Tomasini *et al.* (2002) detected *vir*B11 in 90% of the samples. In addition, they found a correlation between *vir*B11 deletion and *cag*A and/or *cag*E deletion. Therefore, our results corroborate in part the findings of Tomasini *et al.* (2002), since we detected *vir*B11 gene in 89.9% of the isolates, but we did not find association between *vir*B11 and *cag*A and *cag*E.

The *vir*B11 gene encodes a protein homolog to the VirB4 ATPases from the T4SS of *A. tumefaciens*. Theses ATPases are important components of the type IV secretion apparatus, being responsible for the translocation of the effectors proteins into eukaryotic host cells. VirB11 assembles as a homomultimer at the inner-membrane, and supplies energy for substrate export and pilus biogenesis. VirB11-ATPases direct the assembly of the T4SS apparatus and/or drive the passage of CagA and possibly other unidentified virulence factors across the envelope into gastric mucosal host cells, thereby functioning as pores whose closure and opening involves dynamic conformational changes mediated by ATP binding and release (Cascales and Christie, 2003). This way, VirB11 plays a crucial role to the function of the secretion system machinery (Segal *et al.*, 1999; Blaser and Atherton, 2004). The importance of VirB11-ATPases as an essential virulence factor of *H. pylori* highlighted its potential use as a target for new antibacterial compounds (Hilleringmann *et al*, 2006).

The other gene located in the *cag*II region which was investigated in this work was *cag*T. This gene is homolog to the *vir*B7 of *A. tumefaciens*, which encodes a lipoprotein located at the periplasmic channel of the type 4SS machinery. CagT protein helps to

stabilize the other Vir proteins through formation of a disulfide bridge with VirB9, so playing a crucial role in the pilus biogenesis (Cascales e Christie, 2003; Christie *et al.*, 2005).

The *cag*T gene was detected in 65.8% of the samples. Statistical analysis did not demonstrated association between this gene and gastritis or GERD but showed association with PUD and GU. Logistic regressions analysis indicated that *cag*T increases in three folds the risk for the development of these diseases in the patients here analyzed. Our results corroborate those obtained by Mattar *et al.* (2007) whose work was also conducted in Brazil. Those authors reported the presence of *cag*T in 98% of PUD cases, and statistical analysis showed a significant association between *cag*T and PUD.

Some works conducted in different regions of the world also support our findings. In a work performed in England, Kauser *et al* (2005) also found association between *cag*T and ulcer development. Similar results were observed in Japan by Ikenowe *et al.* (2001), upon analysis of deletions in the *cag*PAI. They documented that isolates lacking the *cag*T and *cag*E genes were more frequently obtained from cases of chronic gastritis than from cases of PUD or gastric cancer.

The *cag*T gene was significant associated with other virulence genes of *H. pylori* such as *cag*A, *cag*E, *vacAs1*, *vacAm*1 and *vacAs1m1*. On the other hand, an inverse association was found between the presence of *cag*T and *vacAs2*, *vacAm2* and *vacAs2m2*. Studies based on mutagenesis of T4SS genes of *H. pylori* could help to explain the correlation found between *cag*T and the other genes of the *cag*PAI. Rohde *et al.* (2003) reported that *H. pylori* strains which lack the *cag*T gene showed impairment on the type IV secretion machinery, which became unable to translocate CagA protein into AGS cell *in vitro*. The link between the *vacAs1* genotype and the presence of *cag*PAI was previously

described (Blaser and Atherton, 2004). Indeed, Yokoyama *et al.* (2005) demonstrated that CagA activates the nuclear factor of activated T cells (NFAT) which in turn activates a number of genes, including p21, a cell-cycle inhibitor. Conversely, it was demonstrated that VacA counteracts this activation. Therefore, the modulation of the NFAT activity by CagA and VacA may contribute to the various disease outcomes caused by *H. pylori* that may explain the selection for the simultaneous presence of *cag*PAI genes such as *cag*A and *cag*T, and the more virulent *vac*A genotype (*vacAs1m1*).

In addition, *H. pylori* strains that exhibit both the *cag*PAI and the *vacAs1m1* genotypes are involved on the development of severe gastroduodenal diseases, such as PUD (Atherton *et al*., 1997). The simultaneous expression of the T4SS machinery, CagA injection and VacA release could elicit a strong inflammatory response in the human gastroduodenal mucosa associated with tissue damage, leading to ulcerations.

The observation that many *vir*B11-positive strains are negative for other *cag* genes indicates that the *cag*PAI in some strains here analyzed present a mosaic structure corroborating other works (Akopyants *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 1999; Blomstergren *et al.*, 2004).

Since the so-called plasticity zone of *H. pylori* was described by Alm *et al* (1999), many studies have been conducted in order to find association between genes from this region and disease outcomes. The plasticity zone is a hypervariable region where are clustered almost half of the strain-specific genes of *H. pylori*. Although most of the genes clustered there encode putative proteins with unknown function, these genes could be important to the virulence of *H. pylori*, by encoding factors that are involved in a different disease outcome (Chanto *et al*, 2002). However, data regarding the role of these genes on

the development of gastroduodenal disordes are confliting, either in the same country (Santos *et al.*, 2004; Proença-Módena *et al.*, 2007).

In this work, we investigated the presence of the *dupA* locus in *H. pylori* samples isolated in Brazil. Our results contrast that obtained by Lu *et al.* (2005) since we was not able to find an association between *jhp*917 and *jhp*918 genes with any clinical outcome, including DU. We also did not find and association between *jhp*917 and *jhp*918 genes, a result that is also in contrast with that described by Lu *et al* (2005) in strains isolated from Dutch patients. In our *H. pylori* strains, while *jhp*917 was detected in most of the samples (92,4%), the frequency of the *jhp*918 was lower (67,1%). Therefore, our results suggest that *dup*A could not be considered a universal marker for DU, as proposed by Lu *et al.* (2005). We believe that as the plasticity zone is high variable (Alm *et al*., 1999; Occhialini *et al*., 2000; Salama *et al*., 2000) and very prone to suffer recombination events, it is very unstable to contain virulence markers that are invariably conserved.

In conclusion, our findings corroborate results described recently by Mattar *et al.* (2007) suggesting *cag*T as a gene marker for PUD development in Brazil. However, considering the characteristic of quasi-species exhibited by *H. pylori*, further studies are needed particularly in other States of Brazil, for a definitive answer to this question. We also concluded that *vir*B11 is not associated with any disease outcome and that *dup*A is not an universal marker for the development of DU.

References

Akopyants, NS; Clifton, SW; Kersulyte, D; Crabtree, JE; Youree, BE; Reece, CA; Bukanov, NO; Drazek, ES; Roe, BA; Berg, DE. 1998. Analysis of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 28: 37-53.

Ali, M; Khan, AA; Tiwari, SK; Ahmed, N; Rao, LV; Habibullah, CM. 2005. Association between *cag*-pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspesia subjects with histological changes. World J. Gastroenterol. 21; 11 (43): 6815-22.

Alm, R & Trust, T. 1999. Analysis of the genetic diversity of of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. J. Mol. Med. 77: 834-846.

Atherton, JC; Peek, RM; Tharn, KT; Cover, TL; Blaser, MJ. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vac*A, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol. 112: 92-99.

Blaser, MJ & Atherton, JC. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J. Clin. Invest. 113: 321-333.

Blomstergren, A; Lundin, A; Nilsson, C; Engstrand, L; Lundeberg, J. 2004. Comparative analysis of the complete cag pathogenicity island sequence in four *Helicobacter pylori* isolates. Gene. 328: 85-93.

Brocchi, M; Vasconcellos, ATR; Zaha, A. (2003). Restriction-modification systems in Mycoplasma spp. Gen Mol Biol. 30: 236-244.

Brocchi, M; Covone, MG; Palla, E; Galeotti, CL. (1999). Integration of minitransposon for expression of the *Escherichia coli elt* gene at a preferred site in *Salmonella typhimurium* identifies a novel putative fimbrial locus. Arch Microbiol. 171: 122-126.

Cascales, E & Christie, PJ. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. Nat Rev Microbiol. Nov 1; 137-148.

Censini, S; Lange, C; xiang, Z; Crabtree, JE; Ghiara, P; Borodovski, M; Rappuoli, R; Covacci, A. 1996. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc. Natl. Acd. Sci. USA. 93: 14648-14653.

Chanto, G; Occhialini, A; Gras, N; Alm, RA; Mégraud, F; Marais, A. 2002. Identification of strain-specific genes located outside of the plasticity zone in nine clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Microbiology. 148: 3671-3680.

Christie, PJ; Atmakuri, K; Krishnamoorthy, V; Jakubowski, S; Cascales, E. 2005. Biogenesis, Architecture and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. Annu. Rev. Microbiol. 59: 451-485.

Clayton, CL; Kleanthous, H; Coates, PJ; Morgan, DD; Tabaqchali, S. (1992). Sensitive diction of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 30: 192-200.

Covacci, A; Telford, JL; Del Giudice, G; Parsonnet, J; Rappuoli, R. 1999. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. Science. 284: 1328-1333.

de Jonge, R; Kuipers, EJ; Langeveld, SC; Loffeld, RJ; Stoof, J; van Vliet, AH; Kusters, JG. 2004. The *Helicobacter pylori* plasticity region locus *jhp*0947-*jhp*0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. FEMS Immunol Med Microbiol . 41:161-167.

Fisher, W; Püls, J; Buhrdorf, R; Gebert, B; Odenbreit, S; Haas, R. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. Mol. Microbiol. 42(5): 1337-1348.

Gatti, LL; Fagundes e Souza, EK; Leite, KR; Bastos, EL; Vicentini, LR; Silva, LC; Smith, M de A; Payao, SL. 2005. *cag*A *vacA* alelles and *babA*2 genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 51: 231-235.

Gatti, LL; Modena, Jl; Payao SL; Smith, M de A; Fukuhara, Y; Modena, JL; de Oliveira, RB; Brocchi, M. 2006. Prevalence of *Helicobacter pylori cag*A, *ice*A and *bab*A2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. Acta Trop. Dec; 100(3):232-40.

Glupczynski, Y. 1996. Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing (p. 17-32). In: Lee A, editor. *Helicobacter pylori:* Techniques for Clinical Diagnosis. London: W. B. Saunders Company Ltd.

Hanahan, D; Jessee, J; Bloom, FR. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Methods Enzymol. 204:63-113.

Heading, RC; Castell, DO. 2004. Clinical spectrum and diagnosis of gastroesophageal reflux disease. In *The Esophagus*. Eds, DO Castell and J.E. Richter. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkings, pp 381-388.

Hilleringmann, M; Pansegrau, W; Doyle, M; Kaufman, S; MacKichan, ML; Gianfaldoni, C; Ruggiero, P; Covacci, A. 2006. Inhibitors of *Helicobacter pylori* ATPase Cag-α block CagA transport and cag virulence. Microbiology. 152: 2919–2930

Ikenoue, T; Maeda, S; Ogura, K; Akanuma, M; Mitsuno, Y; Imai, Y; Yoshidam H; Shiratori, Y; Omata, M. 2001. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. Clin Diagn Lab Immunol. 8: 181-186.

Kauser, F; Hussain, MA; Ahmed, I; Srinivas, S; Devi, SM; Majeed, AA; Rao, KR; Khan, AA; Sechi, LA; Ahmed, N. 2005. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. BMC Microbiol. 5 (32).

Lu, H; Hsu, PI; Graham, DY; Yamaoka, Y. 2005. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 128(4):833-48.

Maeda, S; Yoshida, H; Ikenoue, T; Ogura, K; Kanai, F; Kato, N; Shiratori Y; Omata, M. 1999. Structure of cag pathogenocity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. Gut. 44: 336-341.

Mattar, R; Marques, SB; Monteiro, MS; Santos, AF; Iriya, K; Carrilho, FJ. 2007. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. J Med Microbiol. 56: 9-14.

Mimuro, H, Suzuki, T, Tanaka, J, Asahi, M, Haas, R, Sasakawa, C. 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. Mol. Cell. 10: 745-755.

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. Infect Immun. 68: 6240-6249.

Odenbreit, S; Puls, J; Sedlmaier, B; Gerland, E; Fischer, W; Haas, R. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science**.** 287: 1497-1500.

Proença-Módena, JL; Sales, IL; Acrani, GO; Russo, R; Ribeiro, MAV; Fukuhara, Y; Silveira, WD; Pimenta-Módena, JL; Oliveira, RB; Brocchi, M. 2007. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the *cag* pathogenicity island (*cag*PAI)**.** Diagn Microbiol Infect Dis.

Ramarao, B; Gray-Owen, SD; Backert, S; Meyer, TF.2000. *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. Mol. Microbiol. 37(6): 1389-1404.

Rohde, M; Püls, J; Buhrdorf, R; Fischer, W; Hass, R. 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. Mol. Microbiol. 49: 219-234.

Salama, N; Guillemin, K; McDaniel, TK; Sherlock, G; Tompkins, L; Falkow, S. 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. Proc Natl Acad Sci USA. 97(26): 14668-14673.

Santos, A; Queiroz, DMM; Ménard, A; Marais, A; Rocha, GA; Oliveira, CA; Nogueira, AMMF; Uzeda, M; Mégraud, F. 2003. New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. J Clin Microbiol. 41: 1651-1655.

Segal, ED; Cha, J; Lo, J; Falkow, S; Tompkins, LS. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 14559-14564.

Selbach, M; Moese, S; Hurwitz, R; Hauck, CR; Meyer, TF; Backert, S. 2003. *The Helicobacter pylor*i CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. EMBO J. 22 (3): 515-528.

Suerbaum, S & Josenhans, C. 2007. *Helicobacter pylori* evoution and phenotyic diversification in a changing host. Nat. Rev. Microbiol. 5: 441-452.

Tomasini, ML; Zanussi, S; Sozzi, M; Tedeschi, R; Basaglia, G; De Paoli, P. 2002. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. J. Clin. Microbiol. Mar: 976-980.

Yokoyama, K; Higashi, H; Ishikawa, S; Fujii, Y; Kondo, S; Kato, H; Azuma, T; Wada, A; Hirayama, T; Aburatani, H; Hatakeyama, M. 2005. Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA. 102: 9661-9666.

Table 1. PCR primers for Amplification of the *H. pylori* genes

Gene	Primer sequence (5´→3´)	PCR product	Annealing temperature	Reference
ureA	HPU1 (f) GCC AAT GGT AAA TTA GTT HPU2 (r) CTC CTT AAT TGT TTT TAC	411 bp	46ºC	Clayton *et al*, 1992
jhp917	JHP917 (f) TGGTTTCTACTGACAGAGCGC JHP917 (r) AACACGCTGACAGGACAATCTCCC	307 bp	58ºC	Lu *et al*, 2005
jhp918	JHP918 (f) CCTATATCGCTAACGCGCGCTC JHP918 (r) AAGCTGAAGCGTTTGTAACG	276 bp	64ºC	Lu *et al*, 2005
cagT	CagT (f) CCATGTTTATACGCCTGTGT CagT (r) CATCACCACACCCTTTTGAT	301 bp	51ºC	Ali *et al*, 2005
virB11	VIRB11 (f) TTAAATCCTCTAAGGCATGTAC VIRB11 (r) GATATAAGTCGTTTTACCGTTC	491 bp	56ºC	Tomasini *et al*, 2003

Table 2. Distribution of genotypes (*virB11, jhp917, jhp918 and cagT)* in *H. pylori* strains isolated from 79 patients and their association with gastric disorders.

Genotype	Clinical Outcome[a]						Total
	Gastritis n (%)		Peptic Ulcer Disease n (%)			Normal	n (%)
	+ GERD	Total	DU	GU	Total	n (%)	
***virB11* +**	9 (90.0)	27 (86.2)	18 (85.0)	21 (87.5)	39 (86.4)	5 (83.3)	71 (89.9)
***jhp917* +**	10 (100.0)	27 (93.1)	17 (85.0)	23 (95.8)	40 (90.9)	6 (100.0)	73 (92.4)
***jhp918* +**	5 (50.0)	20 (68.9)	14 (70.0)	15 (62.5)	29 (65.9)	4 (66.7)	53 (67.1)
***cagT* +**	4 (40.0)	16 (55.2)	14 (70.0)	20 (83.3)	34 (77.3)	2 (33.3)	52 (65.8)
Total	10 (12.7)	29 (36.7)	20 (25.3)	24 (30.4)	44 (55.7)	6 (7.6)	79 (100.0)

[a] PUD: Peptic ulcer disease, DU: Duodenal ulcer, GU : Gastric ulcer GERD: Gastroesophageal reflux disease, Normal: Normal gastric mucosa,.

Figure Legends

Figure 1. Agarose (1%) gel electrophoresis demonstrating the detection of *jhp917* (A) and *jhp918* (B) in the genome of *H. pylori* strains. The genomic DNA of J99 strain was used as positive and the DNA of *E. coli* DH5α as negative control.

Figure 2. Agarose (1%) gel electrophoresis demonstrating the detection of *vir*B11 (A) and *cag*T (B) in the genome of *H. pylori* strains. The genomic DNA of 26695 strain was used as positive and the DNA of *E. coli* DH5α as negative control.

Figure 3. The percentage of virulence distributed according to the disease outcome.

Figure 1.

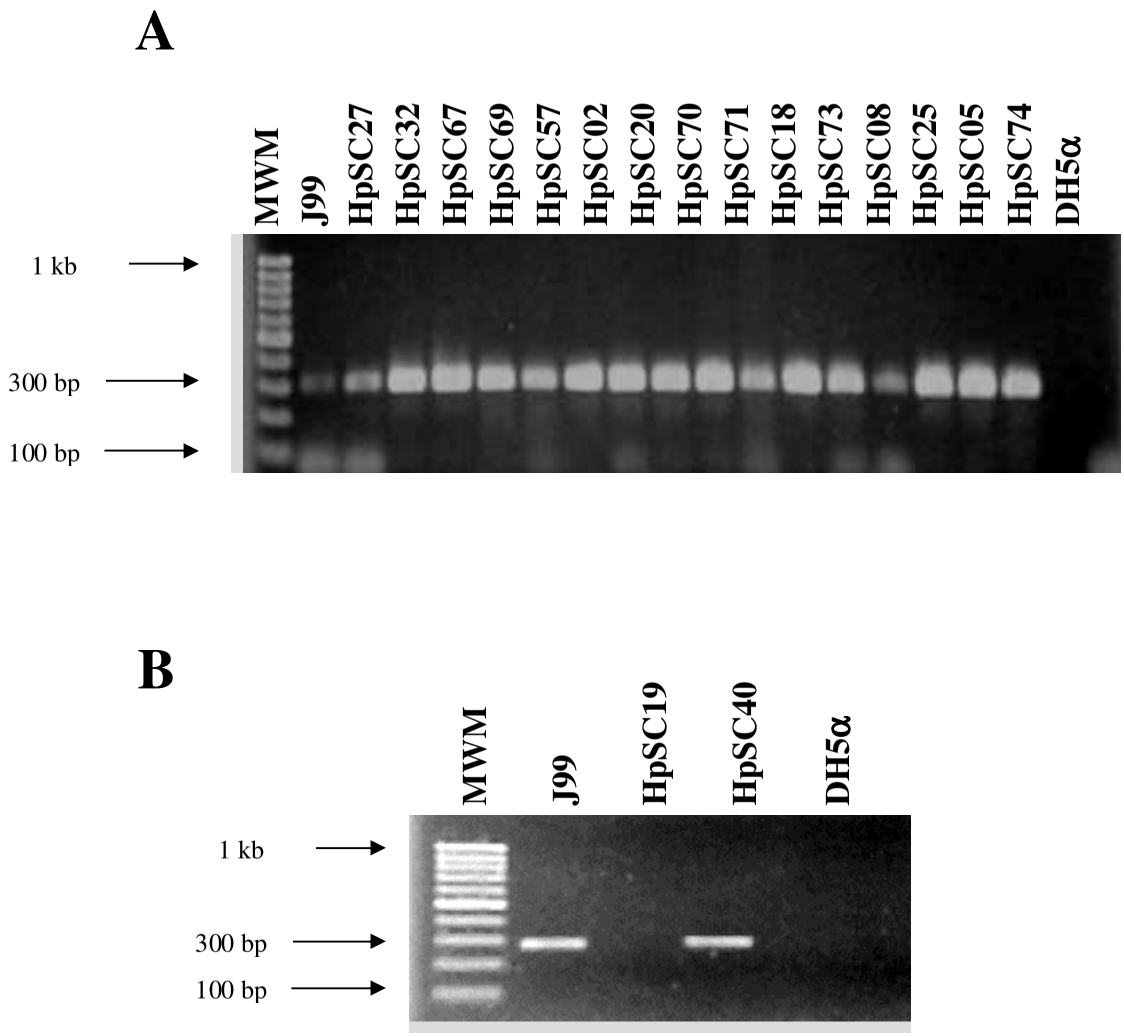
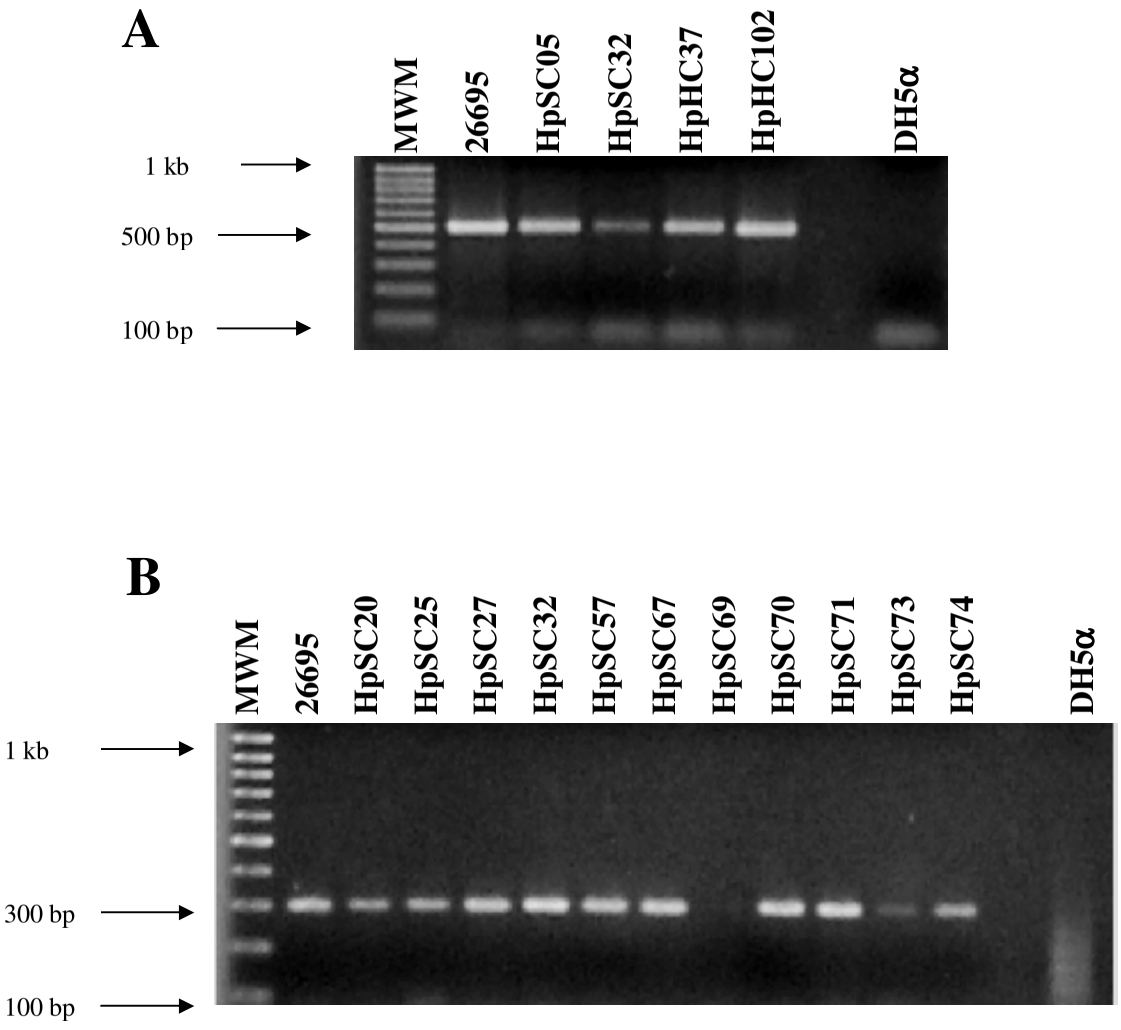

A
MWM
J99
HpSC27
HpSC32
HpSC67
HpSC69
HpSC57
HpSC02
HpSC20
HpSC70
HpSC71
HpSC18
HpSC73
HpSC08
HpSC25
HpSC05
HpSC74
DH5α
1 kb
300 bp
100 bp
B
MWM
J99
HpSC19
HpSC40
DH5α
1 kb
300 bp
100 bp

Figure 2.


A
MWM
26695
HpSC05
HpSC32
HpHC37
HpHC102
DH5α
1 kb
500 bp
100 bp
B
MWM
26695
HpSC20
HpSC25
HpSC27
HpSC32
HpSC57
HpSC67
HpSC69
HpSC70
HpSC71
HpSC73
HpSC74
DH5α
1 kb
300 bp
100 bp

6. DISCUSSÃO

Apesar de vários estudos, ainda não existe um marcador de virulência universal de *H. pylori* associado de forma invariável a determinada patologia. Sendo assim, é de suma importância que sejam realizadas novas pesquisas a respeito de novos fatores de virulência desta bactéria. Além disso, a identificação de fatores de virulência envolvidos na evolução da infecção por *H. pylori* ajudariam a esclarecer a interação entre esse patógeno e o hospedeiro humano, bem como a identificar pacientes que apresentam um risco maior de desenvolver patologias mais graves, como a úlcera péptica.

Neste trabalho, investigou-se a presença dos genes *vir*B11 e *cag*T, localizados na PAI*cag* de *H.pylori*, e dos genes *jhp*917 e *jhp*918, integrantes do locus *dup*A, encontrado na zona de plasticidade, em isolados brasileiros dessa bactéria. Além disso, investigou-se uma possível associação entre tais genes e algumas doenças decorrentes da infecção por *H. pylori*, tais como a gastrite, a úlcera péptica (PUD) e seus subtipos- úlcera gástrica (GU) e úlcera duodenal (DU)- e a doença do refluxo gastroesofágico (GERD), na tentativa de encontrar um gene marcador para alguma dessas doenças.

Estimativas apontam que a incidência da infecção por *H. pylori* no Brasil é alta, mas os dados a respeito da associação entre os genótipos de *H. pylori* e os quadros clínicos são contraditórios, quando se comparam resultados de países diferentes e até mesmo dentro de um mesmo país (Mattar et al, 2007).

O principal fator de virulência de *H. pylori* é a ilha de patogenicidade *cag* (PAI*cag*). A PAI*cag* contém alguns genes homólogos ao sistema de secreção tipo IV VirB/D4 cujo protótiopo é o sistema de secreção de *Agrobacterium tumefaciens*. Essa maquinaria de

secreção parece ser originária de sistemas de conjugação, e está envolvida na troca de material genético e no transporte de macromoléculas (DNA, proteínas) do interior da bactéria para o meio extracelular ou diretamente para o interior de células hospedeiras eucarióticas. Dentre as várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que possuem tal aparato de secreção, muitas são patogênicas, e dependem do transporte de moléculas efetoras para causar doenças em seus hospedeiros: *Legionella pneumophila, Brucella sp, Bordetella pertussis*, e *Helicobacter pylori*. O sistema de secreção de *A. tumefaciens* tem sido considerado o protótipo entre os sistemas de secreção do tipo IV por ser o sistema mais bem estudado. Por meio de seu T4SS, o fitopatógeno *A. tumefaciens* injeta T-DNA no interior das células da planta, onde induz proliferação celular que culmina no desenvolvimento de um tumor, que passa a funcionar como um perfeito nicho ecológico para a bactéria e rico em nutrientes (Cascales e Christie, 2003).

Algumas evidências experimentais apontam que o T4SS codificado pela PAI*cag* de *H. pylori* desempenha uma função essencial na interação entre a bactéria e o hospedeiro (Backert *et al*, 2004). Estudos *in vivo* utilizando cobaias como modelo da infecção mostram que a maquinaria de secreção da PAI*cag* é essencial para o desenvolvimento de gastrite severa, úlcera e metaplasia (Akanuma *et al*, 2002; Ogura *et al*, 2000).

Em trabalho prévio realizado pelo nosso grupo (Proença-Módena *et al*, 2007), investigou-se a presença dos genes *cag*A e *cag*E, localizados na metade *cag*I da PAI*cag*, em isolados brasileiros de *H. pylori* da região do Estado de São Paulo. Análises estatísticas mostraram associação entre o gene *cag*A e o desenvolvimento de PUD, enquanto o gene *cag*E foi considerado um marcador mais confiável para a detecção da PAI*cag* em isolados brasileiros de *H. pylori* (Proença-Módena et al, in press). Com o objetivo de aumentar nossos conhecimentos sobre a região *cag*II da PAI*cag* em amostras brasileiras de *H. pylori*,

no presente trabalho optou-se por investigar a presença de dois genes localizados nessa região, o gene *vir*B11 e o gene *cag*T.

O gene *vir*B11 foi detectado em 89,9% das amostras. Análises estatísticas não mostraram associação entre o gene *vir*B11 e gastrite, PUD ou GERD. Na verdade, a presença do gene *vir*B11 não foi particularmente associada à nenhuma das doenças gastroduodenais incluída nessa análise, uma vez que esse gene estava presente em virtualmente todas as amostras, a despeito do quadro clínico apresentado pelo paciente do qual foi obtida a amostra. Dessa forma, concluiu-se que o gene *vir*B11 não pode ser usado como marcador para nenhuma doença decorrente da infecção por *H. pylori* na nossa região, Estado de São Paulo.

Existem poucos relatos na literatura a respeito da detecção do gene *vir*B11 de *H. pylori*; no Brasil, este tipo de investigação ainda não havia sido realizada. Em trabalho realizado por Tomasini e colaboradores (2002), foi investigada a composição da PAI*cag* de isolados italianos de *H. pylori*, por meio da detecção de três genes localizados em diferentes regiões da PAI*cag*: *cag*A, localizado próximo à extremidade direita da região *cag*I; *cag*E, localizado entre as duas extremidades do segmento *cag*I, à montante em relação ao gene *cag*A; e *vir*B11, localizado na região *cag*II da PAI*cag*. Os resultados obtidos por Tomasini e colaboradores, mostram que o gene *vir*B11 estava presente em 90% dos isolados, e que a deleção desse gene estava associada à deleção de *cag*A e/ou *cag*E. Dessa forma, os resultados obtidos por nosso grupo corroboram em parte os resultados de Tomasini e colaboradores, já que no presente trabalho o gene *vir*B11 foi detectado em 89,9% das amostras, mas não foi encontrada associação entre a presença do gene *vir*B11 e *cag*A.

Devido à alta porcentagem das amostras de *H. pylori* utilizadas em nossa investigação serem positivas para *vir*B11, não foi encontrada associação entre a presença

deste gene e nenhuma das formas de doença decorrente da infecção por *H. pylori* incluídas neste trabalho. Por outro lado, a presença quase ubíquita de *vir*B11 sugere que esse gene seja um fator de virulência essencial de *H. pylori*, podendo estar envolvido no desenvolvimento de gastrite, PUD e GERD. Deve ser enfatizado que este é o primeiro trabalho a investigar a presença do gene *vir*B11 no Brasil.

O gene *vir*B11 codifica a proteína VirB11, que apresenta homologia com as VirB4 ATPases de *Agrobacterium tumefaciens*. Essas ATPases são importantes integrantes do sistema de secreção tipo IV, responsável por translocar proteínas efetoras do interior do citolasma de algumas bactérias para o interior de células hospedeiras eucarióticas. VirB11 se organiza como um homomultímero na membrana interna, e fornece energia para a exportação de substrato e biogênese do pilus. VirB11 ATPases direcionam a montagem da maquinaria de secreção tipo IV, bem como direcionam a passagem de CagA e possivelmente de outros fatores de virulência ainda não identificados através do envelope para on interior das células epiteliais gástricas dos hospedeiro, funcionando como poros cuja abertura e fechamento envolve mudanças conformacionais dinâmicas mediadas pela ligação e liberação de ATP (Cascales e Christie, 2003). Dessa forma, VirB11 desempenha um papel fundamental no funcionamento da maquinaria de secreção, sendo essential para o transporte da proteína efetora CagA, que provoca várias alterações fenotípicas nas células epiteliais gástricas, incluindo rearranjos no citoesqueleto, que levam ao fenótipo extremamente alongado dessas células (fenótipo *humminbird*), aumento da motilidade celular (Segal *et al*, 1999), fenótipo de célula esparramada (Mimuro et al, 2002), apoptose e alterações no ciclo celular, que levam à perda da integridade da mucosa gástrica (revisto em Blaser e Atherton, 2004).

A importância da VirB11-ATPase Cag-α como fator de virulência essencial de *H. pylori* evidenciou seu potencial como alvo para novos compostos antibacterianos. Pesquisadores do grupo liderado por Antonello Covacci (Hilleringmann *et al*, 2006), na Itália, utilizaram o sistema de *high-throughput screening* de uma biblioteca química de 524.400 pequenas moléculas, e identificaram vários inibidores de Cag-α de *H. pylori*. O composto que apresentou maior atividade, denominado CHIR-1, reduziu os danos sofridos pelas células AGS mediados por CagA e também diminuiu os níveis de IL-8. Utilizando o modelo murino, o tratamento prévio de *H. pylori* com CHIR-1 prejudicou a colonização dos camundongos por essa bactéria. Esse trabalho foi o primeiro a descrever um inibidor de um sistema de secreção tipo IV.

Outro gene da região *cag*II da PAI*cag* investigado neste trabalho foi o gene *cag*T (HP0532). O gene *cag*T foi detectado em 65,8% das amostras, e particularmente em 77,3% dos isolados obtidos de pacientes com úlcera péptica (PUD). Análises estatísticas não mostraram associação entre esse gene e gastrite ou GERD, mas mostraram associação entre *cag*T e PUD. Análises por regressão logística indicaram que o gene *cag*T representa um fator de risco para o desenvolvimento de PUD.

Alguns relatos na literatura apóiam os resultados obtidos por nosso grupo no presente trabalho. Recentemente, em trabalho realizado com amostras brasileiras de *H. pylori* na capital paulista, Mattar e colaboradores (2007) investigavam se algum dos genes da PAI*cag*, incluindo *cag*A, *cag*E, *cag*M e *cag*T, seria um marcador para o desenvolvimento de úlcera péptica. Foi demonstrado que o gene *cag*T estava presente em 98% das amostras obtidas de casos de PUD e as análises estatísticas mostraram uma associação entre *cag*T e PUD. Análises por regressão logística mostraram que *cag*T representaria um fator de risco para PUD. Dados obtidos por um grupo no Japão também

estão de acordo com os dados obtidos em nosso presente trabalho. Após a investigação da composição da PAI*cag* em amostras de *H. pylori* de pacientes japoneses, Ikenowe e colaboradores (2001) documentaram que as amostram que apresentavam deleção total ou parcial da PAI*cag*, e que portanto eram negativas para o gene *cag*T e *cag*E, eram obtidas mais frequentemente de pacientes com gastrite crônica do que aqueles com PUD ou câncer gástrico . Na Inglaterra, Kauser e colaboladores (2005), encontraram associação entre *cag*T e úlcera; os genes detectados mais frequentemente nos isolados ingleses de casos de úlcera eram positivos para o gene *cag*T (83%) e *cag*E (71,2%).

A úlcera péptica pode ser subdividida em úlcera duodenal e úlcera gástrica, de acordo com a topologia da ulceração na mucosa gastroduodenal. Dentre os isolados incluídos no presente estudo, 70% dos casos de DU eram *cag*T+, assim como 83,3% dos casos de GU. Nossos resultados são apoiados por aqueles obtidos por Ali e colaboradores (2005), na Índia. Esse grupo relatou que 96,5% das amostras de casos de DU eram *cag*T+, enquanto 100% dos casos de GU eram positivos para o mesmo gene. Portanto, pode-se sugerir que o gene *cag*T está envolvido na indução de um processo inflamatório intenso, que pode levar ao desenvolvimento de ulcerações tanto na mucosa gástrica quanto na mucosa duodenal, desempenhando um papel importante na patogênese de *H. pylori*.

Recentemente, nosso grupo documentou uma forte associação entre a presença do gene *cag*A e PUD (Proença-Módena *et al*, 2007). De fato, dados da literatura obtidos de diferentes países em todo o mundo mostram que indivíduos infectados por amostras de *H. pylori cag*A+ apresentam maior risco de desenvolver PUD (Rudi et al, 1998; van Doorn *et al*, 1998; Ribeiro *et al*, 2003; Salih *et al*, 2007).

Já que os resultados obtidos no presente trabalho mostraram uma associação entre *cag*T e PUD, investigou-se a possibilidade de os genes *cag*T e *cag*A estarem associados um

ao outro. O resultado dessa análise foi estatisticamente significante, sugerindo que a presença de *cag*T estava correlacionada à presença do gene *cag*A.

Estudos dos efeitos fenotípicos de mutações am alguns genes do T4SS de *H. pylori* podem explicar a correlação entre a positividade para os genes *cag*T e *cag*A. Rohde e colaboradores (2003) documentaram que linhagens de *H. pylori* negativas para o gene *cag*T apresentavam defeitos na maquinaria de secreção tipo IV codificada pela PAI*cag*, que consequentemente perdia a capacidade a translocar a proteína CagA para o interior das células AGS *in vitro*.

Investigou-se também a associação entre a positividade para *cag*T e *cag*E, tendo sido este último estudado num trabalho prévio do grupo (Proença-Módena et al, 2007). Análises estatísticas mostraram uma associação significante entre os dois genes (P = 0.0169). O gene *cag*E apresenta homologia com *vir*B4 de *A. tumefaciens* e *ptl*C de *Bordetella pertussis*, genes que codificam componentes da maquinaria de secreção tipo IV nessas bactérias. Tummuru e colaboradores (1995) relataram o envolvimento do produto do gene *cag*E, CagE, e a indução da expressão de IL-8 pelas células epiteliais gástricas. Estudos posteriores mostram que CagE, assim como CagM, são necessários para a ativação do fator de transcrição de NF-κB, envolvido na secreção de IL-8 (Glocker *et al*, 1998).

Podemos concluir que dentro da população de pacientes aqui analisada, o gene *cag*T pode representar um gene marcador para o desenvolvimento de PUD assim como o gene *cag*A. Nossos resultados, aliados aos resultados obtidos por Mattar e colaboradores (2007) nos leva à hipótese de que o gene *cag*T pode ser um marcador para o desenvolvimento de úlcera péptica no Estado de São Paulo, Brasil. Estudos adicionais envolvendo amostras de *H. pylori* de diferentes regiões do Brasil seriam úteis para descobrir se *cag*T seria um marcador brasileiro para o desenvolvimento de PUD.

O gene *vac*A tem uma organização em mosaico, apresentando pelo menos 2 partes variáveis, a sequência sinal (*s-sinal region*) e a região intermediária (*m-middle region*). Estudos conduzidos no mundo todo mostram que genótipos particulares de *vac*A podem ser considerados marcadores da patogenicidade de linhagens de *H. pylori*, já que certos fenótipos como a produção da citotoxina *in vitro*, danos no epitélio *in vivo*, desenvolvimento de úlcera péptica ou carcinoma gástrico estão relacionados a genótipos específicos de *vac*A (revisto em Gusmão et al, 2000).Vários relatos na literatura, incluindo um trabalho realizado por nosso grupo (Proença-Módena et al, in press) mostram uma correlação entre o genótipo *vac*A*s*1*m*1 ou *vac*A*s*1a*m*1 de *H. pylori* e PUD (Atherton et al, 1995; Gusmão et al, 2000; Salih et al, 2007).

Como foi encontrada associação entre o genótipo *vac*A*s*1*m*1 e PUD, bem como entre *cag*T e PUD, foram feitas análises estatísticas para investigar uma possível associação entre os genes *vac*A-alelos *s*1, *s*2, *m*1 e *m*2- e *cag*T. Foi encontrada uma associação direta entre a positividade para o gene *cag*T e os seguintes alelos de *vac*A: v*ac*A*s*1, *vac*A*m*1 e à combinação *vac*A*s*1*m*1. Uma associação inversa foi encontrada entre *cag*T e os alelos *vac*A*s*2, *vac*A*m*2 e os genótipos *vac*A*s*2*m*2 and *vac*A*s*1*m*2.

A presença do gene *cag*T está associada à presença de *cag*A, e ambos estão envolvidos no desenvolvimento de patologias severas, como a úlcera péptica. O genótipo *vac*A*s*1*m*1 tem sido apontado em diversos estudos como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças severas. A expressão simultânea da maquinaria de secreção tipo IV, a injeção de CagA e a produção da citotoxina VacA provocaria danos na mucosa gastroduodenal, e conseqüentemente, elicitariam uma resposta inflamatória intensa no local por parte do sistema imune, que contribuiria para lesar ainda mais o epitélio gástrico, podendo causar ulcerações. Dessa forma, a combinação entre a positividade para *cag*A,

*cag*T e *vac*A*s*1*m*1 seria uma das causas possíveis do desencadeamento de um processo inflamatório intenso, que levaria ao desenvolvimento de úlceras no trato gastroduodenal humano. Nossos resultados representam uma evidência de que o desenvolvimento das doenças gastroduodenais em decorrência da infecção por *H. pylori* seria o resultado da interação entre fatores de virulência produzidos por *H. pylori* e a resposta imune elaborada pelo hospedeiro.

Desde que a zona plástica de *H. pylori* foi descrita por Alm e colaboradores (1999), muitos estudos tem sido realizados na tentativa de se encontrar uma associação entre genes localizados nessa região e doenças resultantes da infecção por *H. pylori*.

Embora a maioria dos genes localizados nessa região codifique proteínas prováveis de função desconhecida, esses genes podem ser importantes para a virulência de *H. pylori*, codificando fatores que estariam envolvidos na geração de diferentes quadros clínicos (Chanto *et al*, 2002).

Genes da região de plasticidade de *H. pylori* tem sido apontados como potenciais marcadores de virulência para doenças decorrentes da infecção por essa bactéria. No entanto, dados a respeito do papel desses genes no desenvolvimento de doenças gastrodudenais são bastante contraditórios, inclusive dentro de um mesmo País (Santos *et al*, 2004; Proença-Módena *et al*, in press).

A importância de se identificar um fator de virulência que possa ser preditivo do desenvolvimento de uma doença específica resultante da infecção por *H. pylori* estimula pesquisas no mundo todo. A busca por um determinante genético que permita identificar pacientes com risco de desenvolver doenças severas impulsiona o estudo de possíveis novos marcadores genéticos, que seriam muito úteis na prática clínica.

Recentemente, Lu e colaboradores (2005) descreveram um novo marcador de virulência de *H. pylori*, o *locus dup*A (*duodenal ulcer promoting gene*), associado com aumento no risco de úlcera duodenal. O *locus dup*A é constituído de dois genes consecutivos, *jhp*917 e *jhp*918, da zona de plasticidade do genoma de *H. pylori*. Tanto *jhp*917 quanto *jhp*918 são homólogos do gene *vir*B4 de *A. tumefaciens*, que codificam para uma ATPase envolvida no fornecimento de energia para a maquinaria de secreção tipo IV. Esses pesquisadores relataram que a presença do locus *dup*A estava associada também ao aumento na produção de IL-8 *in vitro* e *in vivo*, sendo consequentemente responsável pelo aumento na infiltração neutrofílica observada na região antral do estômago. Por outro lado, *dup*A foi considerado um fator protetor contra atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico. O locus *dup*A foi sugerido como marcador de virulência universal para DU, dessa forma representando o primeiro marcador de virulência universal para uma doença gastroduodenal resultante da infecção por *H. pylori* (Lu *et al*, 2005).

Nós investigamos a presença desse *locus* em isolados brasileiros de *H. pylori* e os resultados obtidos contrastam aqueles apresentados por Lu e colaboradores. Primeiramente, não foi encontrada associação entre a presença de *jhp*917 e *jhp*918, uma vez que a porcentagem e a distribuição das amostras positivas para cada um dos genes é diferente (ver tabela 2 do artigo). Enquanto o gene *jhp*917 foi detectado na maioria das amostras (92,4%), o gene *jhp*918 foi detectado em 67,1%.

Análises estatísticas foram realizadas para investigar uma possível associação entre os genes *jhp*917 ou *jhp*918 e gastrite, úlcera péptica e seus subtipos (úlcera gástrica e úlcera duodenal) e GERD. Os resultados mostraram que *jhp*917 não estava associado com gastrite, PUD, GU, DU ou GERD. De maneira similar, não foi encontrada associação entre a presença do gene *jhp*918 e gastrite (P=0,9824), PUD (P=0,9927), GU (P=0,7543), ou

GERD (p=0,2836). Apesar de 70% das amostras de DU serem positivas para o gene *jhp*918, não foi encontrada associação estatisticamente significante entre esse gene e DU (p=0,9639).

Dessa forma, nenhum dos genes integrantes do *locus dup*A foi associado com nenhuma das doenças decorrrentes da infecção por *H. pylori* incluídas nessa análise nem com o desenvovimento de DU particularmente, indicando que *dup*A não representa um marcador de virulência universal para DU, como proposto por Lu e colaboradores (2005).

Nossos resultados podem ser explicados pelo fato de que a zona de plasticidade é uma região hipervariável do genoma de *H. pylori*, que abriga quase 50% dos genes linhagem-específicos de *H. pylori*. Desse forma, não seria aconselhável tentar encontrar um marcador de virulência universal em uma região de tamanha variabilidade genética. Portnto, não é surpreendente que o *locus dup*A tenha se apresentado tão heterogêneo em amostras brasileiras de *H. pylori*, e consequentemente não representa um marcador universal.

A espécie *H. pylori* é considerada uma quasispécie por alguns autores, devido a sua alta variabilidade genética. Essa variabilidade genética notável parece ser o resultado de um conjunto de eventos, incluindo as altas taxas de mutação, competência natural para aquisição de DNA exógeno, habilidade de sofrer deleções e recombinações.

A região conhecida como zona de plasticidade contém grande parte da variabilidade genética apresentada por *H. pylori* (Alm *et al*, 1999). Um estudo realizado por Occhialini e colaboradores (2000) analisou a composição da região de plasticidade em isolados de *H. pylori* obtidos de diferentes quadros clínicos. Os resultados obtidos por esse grupo mostraram que a zona plástica é um mosaico e deveria ser considerada uma ilha genômica. Sendo uma ilha genômica, a zona plástica pode ser parcialmente ou completamente

excisada do genoma de *H. pylori*. Dessa forma, acreditamos que os genes da zona plástica devem estar associados à adaptações de *H. pylori* à variações ambientais que, de alguma forma, podem influenciar a virulência mas que , no entanto, devido a sua alta variabilidade, é possível que esta região não contenha marcadores invariáveis, universais ou determinantes de doenças associadas a esta bactéria.

Concluindo, nossos resultados sugerem que o gene *cag*T pode ser usado como marcador para o desenvolvimento de PUD no Estado de São Paulo, Brasil; o gene *vir*B11 pode representar um gene de virulência essencial para a patogênese da infecção causada por *H. pylori* no desenvolvimento de gastrite, PUD e GERD; o *locus dup*A não é um marcador universal para o desenvolvimento de DU.

7. CONCLUSÕES

- o gene *cag*T pode ser um novo marcador para o desenvolvimento de úlcera péptica em indivíduos infectados por *H. pylori* no Estado de São Paulo, Brasil;

- o gene *cag*T está diretamente associado a *cag*A, *vac*A*s*1*m*1, *vac*A*s*1, *vac*A*m*1;

- o gene *vir*B11 pode representar um gene de virulência essencial de *H. pylori* no desenvolvimento de gastrite, úlcera péptica e doença do refluxo gastroesofágico;

- o *locus dup*A não pode ser considerado um marcador universal para o desenvolvimento de úlcera duodenal em pacientes infectados por *H. pylori*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akanuma, M; Maeda, S; Ogura, K; Mitsuno, Y; Hirata, Y; Ikenoue, T; Otsuka, M; Watanabe, T; Yamaji, Y; Yoshida, H; Kawabe, T; Shiratori, Y; Omata, M. 2002. The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian gerbil infection model. J. Infect. Dis. 185: 341-347.

Ahmed, N. 2005. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: is the debate over? Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 4 (17).

Ali, M; Khan AA; Tiwari SK; Ahmed N; Rao LV; Habibullah. 2005. Association between *cag*-pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspesia subjects with histological changes. World J. Gastroenterol. 21; 11 (43): 6815-22.

Alm, R; Ling, J; Moir, DT; King, BL; Brown, ED; Doig, PC *et al*.1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature. 397: 176-80.

Alm, R & Trust, T. 1999. Analysis of the genetic diversity of of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. J. Mol. Med. 77: 834-846.

Appelmelk, BJ; Shiberu, B; Trinks, C; Tapsi, N; Zheng, PY, *et al*. 1998. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infect Immun. 66: 70-76.

Aras, RA; Kang, J; Tschumi, AI; Harasaki, Y; Blaser, MJ. 2003. Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. 100 (23): 13579-13584.

Atherton, JC; Cao, P; Peek, RM; Tummuru, MK; Blaser MJ; Cover, TL. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori.* Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J. Biol. Chem**.** 270: 17771-17777.

Backert, S; Schwarz, T; Miehlke, S; Kirsch, C; Sommer, C; Kwok, T; Gerhard, M; Goebel, Ub; Lehn, N; Koenig, W; Meyer, T. 2004. Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Infect. Immun. Feb: 1043-1056.

Backert, S & Meyer, T. 2006. Type IV scretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. 9: 207-217.

Baltrus, DA & Guillemin, K. 2006. Multiple phases of competence occur during the *Helicobacter pylori* growth cycle. FEMS Microbiol. Lett. 255: 148-155.

Beji, A; Mégraud, F; Vincent, P; Gavini, F; Izard, D; Leclerc, H. 1988 . GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging or related to the genus *Campylobacter*. Ann Inst Pasteur Microbiol. Sep-Oct; 139(5):527-34

Berg, DE; Hoffman, PS; Appelmelk, BJ; Kusters, JG.. 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. Trends Microbiol. 5: 468-474.

Bjorkholm, B; Sjolund, M; Falk, PG; Berg, O; Engstrand, L; Andersson, DI. 2001. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 14607-14612.

Blaser, MJ. 1993. *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. Trends Microbiol. 161: 626-633.

Blaser, MJ & Parsonet, J. 1994. Parasitism by the slow bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. J. Clin. Invest. 94: 4-8.

Blaser, MJ. 1998. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. BMJ. 316: 1507-1510.

Blaser, MJ & Berg, D. 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J. Clin. Invest. 107 (7): 767-773.

Blaser, MJ & Atherton, JC. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J. Clin. Invest. 113: 321-333.

Brocchi, M; Vasconcelos, ATR; Zaha, A. 2007. Restriction-modification systems in *Mycoplasma spp*. Gen. Mol. Biol. 30 (1): 236-244.

Carrol, IM; Ahmed, N; Beesley, SM; Khan, AA; Ghousunnissa, S; Ó Moráin, CA; Habibullah, CM; Smyth, CJ. 2004. Microevolution between paired antral and paired antrum and corpus *Helicobacter pylori* isolates recovered from individual patients. J. Med. Microbiol. 53: 669-677.

Cascales, E & Christie, PJ. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. Nat Rev Microbiol. Nov 1; 137-148.

Censini, S; Lange, C; Xiang, Z; Crabtree, JE; Ghiara, P; Borodovski, M; Rappuoli, R; Covacci, A. 1996. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc. Natl. Acd. Sci. USA. 93: 14648-14653.

Chanto, G; Occhialini, A; Gras, N; Alm, RA; Mégraud, F; Marais, A. 2002. Identification of strain-specific genes located outside of the plasticity zone in nine clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Microbiology. 148: 3671-3680.

Christie, PJ; Atmakuri, K; Krishnamoorthy, V; Jakubowski, S; Cascales, E. 2005. Biogenesis, Architecture and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. Annu. Rev. Microbiol. 59; 451-485.

Chiba, T; Seno, H; Marusawa, H; Wakatsuki, Y; Okazaki, Z. 2006. Host factors are important in determining clinical outcomes of *Helicobacter pylori* infection. J. Gastroenterol. 41: 1-9.

Covacci, A & Rappuoli, R. 1998. *Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasi-species. Curr Opin Microbiol. 1: 96-102.

Covacci, A; Telford, JL; Del Giudice, G; Parsonnet, J; Rappuoli, R. 1999. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. Science. 284: 1328-1333.

Cover, TL; Dooley, CP; Blaser, MJ. 1990. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect. Immun. 58: 603-610.

Cover, TL; Cao, P; Lind, CD; Tham, KT; Blaser, MJ. 1993. Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates *in vitro* and *in vivo*. Infect. Immun. Dec: 5008-5012.

Cover, TL; Handson, PI; Heuser JE. 1997. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. J. Cell. Biol. 134: 759-769.

Cover, TL & Blanke, SR. 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat. Rev. Microbiol. Apr; 3(4):320-32.

de Jonge R; Kuipers EJ; Langeveld SC; Loffeld RJ; Stoof J; van Vliet AH; Kusters JG. 2004. The *Helicobacter pylori* plasticity region locus *jhp*0947-*jhp*0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. FEMS Immunol Med Microbiol . 41:161-167.

Dunn, BE; Cohen, H; Blaser, MJ. 1997. *Helicobacter pylori.* Clinical Microbiology Reviews**.** 10: 720-741.

Evans, DJ Jr*;* Evans, DG; Takemura, T; Nakano, H; Lampert, HC; Graham, DY; Granger, DN; Kvietys, PR. 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. Infect. Immun. 63: 2213-2220.

Evans, DG; Queiroz, DM; Mendes, EN; Evans, DJ Jr. 1998. *Helicobacter pylori cag*A status and *s* and *m* alleles of *vac*A in isolates from individuals with a variety of *H. pylori*-associated gastric diseases. J Clin Microbiol. 36: 3435-3437.

Evans, DJ Jr & Evans, DG. 2000. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter*. 5(4): 83-195.

Falush, D; Kraft, C; Taylor, NS; Correa, P; Fox, JG; Achtman, M; Suerbaum, S. 2001. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 15056-15061.

Falush, D; Wirth, T; Linz, B; Pritchard, JK; Stephens, M; Kidd, M; Blaser, MJ; Graham, DY; Vacher, S; Perez-Perez, GI; Yamaoka, Y; Mégráud, F; Otto, K; Reichard, K; Katzowitsch, E; Wang, X; Achtman, M; Suerbaum, S. 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. Science. 299: 1582-1585.

Fujikawa, A; Shirasaka, D; Yamamoto, S; Ota, H; Yahiro, K; Fukada, M; Shintani, T; Wada, A; Aoyama, N; Hirayama, T; Fukamachi, H; Noda, M. 2003. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. Nat Genet. 33: 375-381.

Gal-Mor, O & Finlay, BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. 2006. Cell. Microbiol. 8(11): 1707-1719.

Gatti, LL; Fagundes e Souza, EK; Leite, KR; Bastos, EL; Vicentini, LR; Silva, LC; Smith, M de A; Payao, SL. 2005. *cag*A *vacA* alelles and *babA*2 genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 51: 231-235.

Gatti, LL; Modena, Jl; Payao SL; Smith, M de A; Fukuhara, Y; Modena, JL; de Oliveira, RB; Brocchi, M. 2006. Prevalence of *Helicobacter pylori cag*A, *ice*A and *bab*A2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. Acta Trop. 2006 Dec;100(3):232-40. Epub 2006 Dec 19.

Garrity, GM & Holt, JG. "Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria." In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1 (The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria) (D.R. Boone and R.W. Castenholz, eds.), Springer-Verlag, New York (2001). pp. 155-166.

Ge, Z & Taylor, DE. 1999. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. Annu. Rev. Microbiol. 53: 353-387.

Ghose, C; Perez-Perez, GI; van Doorn, LJ; Dominguez-Bello, MG; Blaser, MJ. 2005. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. J. Clin. Microbiol. 43: 2635-2641.

Goodwin, CS; Armstrong, JA; Chilvers, T; Peters, M; Collins, MD; SLY, L; McConnell, W; Harper, WES. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. 4: 397-405.

Glocker, E; Lange, C; Covacci A; Bereswill, S; Kist, M; Pahl, HL. 1998. Proteins encoded by the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-κB activation. Infect. Immun. 66: 2346-2348.

Gusmão, VR; Mendes, EN; Queiroz, DMM; Rocha,GA; Rocha, AMC; Ashour, AAR; Carvalho, AST. 2000. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. J. Clin. Microbiol**.** 38: 2853-2857.

Hatakeyama, M & Higashi, H. 2005. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci. 96 (12): 835-843.

Higashi, H; Tsutsumi, R; Muto, S *et al.* 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori Cag*A protein. Science. 295: 683-686.

Hilleringmann, M; Pansegrau, W; Doyle, M; Kaufman, S; MacKichan, ML; Gianfaldoni, C; Ruggiero, P; Covacci, A. 2006. Inhibitors of *Helicobacter pylori* ATPase Cag-α block CagA transport and cag virulence. Microbiology. 152: 2919–2930

Hofman, P; Waidner, B; Hofman, V; Bereswill, S; Brest, P; Kist, M. 2004. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter***.** 9: 15-22.

Hofreuter, D; Odenbreit, S; Haas, R. 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. Mol. Microbiol. 41 (2): 379-391.

Ikenoue, T; Maeda, S; Ogura, K; Akanuma, M; Mitsuno, Y; Imai, Y; Yoshida, H; Shiratori, Y; Omata, M. 2001. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. Clin Diagn Lab Immunol. 8: 181-186.

Ilver, D; Arnqvist, A; Ogren, J; Frick, IM; Kersulyte, D; Incecik, ET; Berg, DE; Covacci, A; Engstrand, L; Boren, T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science. 279: 373-377.

Israel, DA; Salama, N; Krishna, U; Rieger, UM; Atherton, JC; Falkow, S; Peek, RMJ. 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 14625-14630.

Kabir, S. 2007. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: a review. *Helicobacter.* 12: 89-102.

Kang, J & Blaser, MJ. 2006. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. Nature. 4: 826-835.

Kauser, F; Hussain, MA; Ahmed, I; Srinivas, S; Devi, SM; Majeed, AA; Rao, KR; Khan, AA; Sechi, LA; Ahmed, N. 2005. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. BMC Microbiol. 5 (32).

Kersulyte, D; Chalkauskas, H; Berg, DE. 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. Mol Microbiol. 31: 31-43.

Kleanthous, H; Clayton, CL; Tabaqchali, S. 1991 . Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. Mol Microbiol. Oct; 5(10): 2377-89.

Koike, T; Ohara, S; Sekine, H; Iijima, K; Abe, Y; Kato, K; Toyota, T; Shimosegawa, T. 2001. *Helicobacter pylori* infection prevents erosive reflux oesophagitis by decreasing gastric acid secretion. Gut. 49: 330-334.

Kraft, C & Suerbaum, S. Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: mechanisms and role in generating strain diversity. Int. J. Med. Microbiol. 295: 299-305.

Kuipers, EJ; Israel, DA; Kusters, JG; Gerrits, MM; Weel, J; van der Ende, A; van der Hulst, RWM; Wirth, HP; Höök-Nikanne, J; Thompson, SA; Blaser, MJ. 2000. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. J. Infect. Dis. 181: 273-282.

Linz, B; Balloux, F; Moodley, Y; Manica, A; Liu, H; Roumagnac, P; Falush, D; Stamer, C; Prugnolle; van der Merwe, SW; Yamaoka, Y; Graham, DY; Perez-Trallero, E; Wadstrom, T; Suerbaum, S; Achtman, M. 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature. Fev: 1-4.

Lu, Y; Redlinger, TE; Avitia, R; Galindo, A; Goodman, K. 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1436-1439.

Lu, H; Hsu, PI; Graham, DY; Yamaoka, Y. 2005. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2005 Apr;128(4): 833-48.

Luo, ZQ & Isberg, RR. 2004. Multiple substartes of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 841-846.

Lupetti, P; Heuser, JE; Manetti, R; Massari, P; Lanzavecchia, S; Bellon, PL; Dallai, R; Rappuoli, R; Telford, JL. 1996. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. J Cell Biol. 133: 801-807

Mahdavi, J; Sonden, B; Hurtig, M; Olfat, FO; Forsberg, L; Roche, N; Angstrom, J; Larsson, T; Teneberg, S; Karlsson, KA; Altraja, 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. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science. Jul 26; 297(5581): 573-578.

Mattar, R; Marques, SB; Monteiro, MS; Santos, AF; Iriya, K; Carrilho, FJ. 2007. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. J Med Microbiol. 56: 9-14.

Marshall, DG *et al*. 1998. *Helicobacter pylori* – a conundrum of genetic diversity. Microbiology. 144, 2925–2939.

Marshall, BJ & Warren, JR. 1984. Unidentifield curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet**.** 1: 1311-1315.

Mendall, MA; Goggin, PM; Molineaux, N; Levy, J; Toosy, T; Strachan, D; Camn, AJ; Northfield, TC. 1994. Relation of *Helicobacter pylori* infection and conorary heart disease**.** Br. Heart Journal**.** 71: 437-439.

Mimuro, H, Suzuki, T, Tanaka, J, Asahi, M, Haas, R, Sasakawa, C. 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. Mol. Cell. 10: 745-755.

Molinari, M; Salio, M; Galli, C; Norais, N; Rappuoli, R; Lanzavecchia, A; Montecucco, C. 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. J Exp Med. 187: 135-140.

Monteccuco, C & Rappuoli, R. 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2: 457-466.

Odenbreit, S; Puls, J; Sedlmaier, B; Gerland, E; Fischer, W; Haas, R. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science**.** 287: 1497-1500.

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. Infect Immun. 68: 6240-6249.

Occhialini, A; Marais, A; Urdaci, M; Sierra, R; Muñoz, N; Covacci, A; Mégraud, F. 2001. Composition and gene expression of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* strain isolated from gastric carcinoma in gastritis patients in Costa Rica. Infect Immun.69: 1902-1908.

Ogura, K; Maeda, S; Nakao, M; Watanabe, T; Tada, M; Kyutoku, T; Yoshida, H; Shiratori, Y; Omata, M. 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbils. J. Exp. Med. 192: 1601-1610.

On, SLW. 1996. Identification methods for *Campylobacters, Helicobacters* and related organisms. Clin. Microbiol. Rev. 405-422.

Pai, R; Cover, TL; Tarnawski, AS. 1999. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 262: 245-250.

Peck, B; Ortkamp, M; Diehl, KD; Hundt, E; Knapp, B. 1999. Conservation, localization, and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. Nucleic. Acid. Res. 27: 3225-3333.

Peek, RM Jr; Thompson, SA; Donahue, JP; Tham, KT; Atherton, JC; Blaser, MJ; Miller, GG. 1998. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *ice*A, that is associated with clinical outcome. Proc. Assoc. Am. Physicians**.** 110: 531-544.

Perez-Perez, GI; Rothenbacher, D; Brenner, H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 9: 1-6.

Polenghi, A; Bossi, F; Fischetti, F; Durigutto, P; Cabrelle, A; Tamassia, N; Cassatella, MA; Montecucco, C; Tedesco, F; de Bernard, M. 2007. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion *in vivo*. J. Immunol. 178: 1312-1320.

Proença-Módena, JL; Sales, IL; Acrani, GO; Russo, R; Ribeiro, MAV; Fukuhara, Y; Silveira, WD; Pimenta-Módena, JL; Oliveira, RB; Brocchi, M. 2007. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the *cag* pathogenicity island (*cag*PAI)**.** Diagn Microbiol Infect Dis.

Prtichard, DM & Crabtree, JE. 2006. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Curr Opin Gastroenterol. Nov; 22(6): 620-625.

Ribeiro, ML; Godoy, AP; Benvengo, YH; Mendonça, S; Pedrazzoli, J Jr. 2003. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. FEMS Immunol Med Microbiol. 36: 181-185.

Rohde, M; Püls, J; Buhrdorf, R; Fischer, W; Hass, R. 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. Mol. Microbiol. 49: 219-234.

Rudi, J; Kolb, C; Maiwald, M; Kuck, D; Sieg, A; Galle, PR; Stremmel, W. 1998. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. J Clin Microbiol. 36: 944-948.

Salih, BA; Abasiyannik, MF; Ahmed, N. A preliminary study on the genetic profile of cag pathogenicity-island and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey. Infec. Gen. Evol.

Santos, A; Queiroz, DM; Menard, A; Marais, A; Rocha, GA; Oliveira, CA; Nogueira, AM; Uzeda, M; Megraud, F. 2003. New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. J Clin Microbiol. 41: 1651-1655.

Saunders, NJ; Peden, JF; Hood, DW; Moxon, ER. 1998. Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. Mol. Microbiol. 27: 1091-1098.

Selbach, M; Moese, S; Hauck, CR; Meyer, TF; Backert, S. 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. J Biol Chem. 277: 6775-6778.

Selbach, M; Moese, S; Hurwitz, R; Hauck, CR; Meyer, TF; Backert, S. 2003. *The Helicobacter pylor*i CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. EMBO J. 22 (3): 515-528.

Segal, ED; Cha, J; Lo, J; Falkow, S; Tompkins, LS. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 14559-14564.

Seto, K; Hayashi-Kuwabara, Y; Yoneta, T; Suda, H; Tamaki, H. 1998. Vacuolation induced by cytotoxin for *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in Hela cells. FEBS Lett. 431: 347-350.

Suerbaum, S; Josenhans, C; Labigne, A. 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter* mustelae *fla*B flagellin genes and construction of *H. pylori fla*A- and *fla*B-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J. Bacteriol. 175: 3278-3288.

Suerbaum, S; Smith, JM; Bapumia, K; Morelli, G; Smith, NH *et al.* 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 12619-12624.

Suerbaum, S & Michetti, P. 2002. Medical progress: *Helicobacter pylori* infection. N. Engl. J. Med. 374: 1175-1186.

Suerbaum, S & Josenhans, C. 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotyic diversification in a changing host. Nat. Rev. Microbiol. 5: 441-452.

Sundrud, MS; Torres, VJ; Unutmaz, D; Cover, TL. 2004. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is dependent of VacA effects on IL-2 secretion. Proc Natl Acad Sci USA. 101: 7727-7732.

Telford, JL; Covacci, A; Rappuoli, R; Chiara, P. 1997. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. Curr Opin Immunol. 9: 498-503.

Thanassi, DG & Hultgren, SJ. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr. Opin. Cell. Biol. 12: 420-430.

Tummuru, M. K, Sharma, S. A, Blaser, M. J. 1995. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. Mol. Microbiol. 18: 867-876.

Tomasini, ML; Zanussi, S; Sozzi, M; Tedeschi, R; Basaglia, G; De Paoli, P. 2002. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. J. Clin. Microbiol. Mar: 976-980.

Tomb J. F, White, O, Kerlavage, A. R, Clayton, R. A; Sutton, G. G, Fleischmann, R. D, Ketchum, K. A, Klenk, H. P, Gill, S, Dougherty, D. A, Nelson, K, Quackenbush, J, Zhou, L, Kirkness, E. F, Peterson, S, Loftus, B, Richardson, D, Dodson, R, Khalak, H. G; Glodek, A, McKenney, K, Fitzegerald, L. M, Lee, N, Adams, M. D, Venter, J. C. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori***.** Nature. 388: 539-547.

Tombola, F; Morbiato, L; Del Giudice, G; Rappuoli, R; Zoratti, M; Papini, E. 2001. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. J. Clin. Invest. 108: 929-937.

van Doorn, LJ; Figueiredo, C; Sanna, R; Plaisier, A; Schneeberger, P; de Boer, W; Quint, W. 1998. Clinical relevance of the *cag*A, *vac*A, and *ice*A status of *Helicobacter pylori***.** Gastroenterology. 115: 58-66.

van Doorn, LJ; Figueiredo, C; Megráud, F; Pena, S; Midolo, P; Queiroz, DMM; Carneiro, F; Vanderborght, B; Pegado, MGF; Sanna, R; de Boer, W; Schneeberger, PM; Correa, P; Ng, EKW; Atherton, JC; Blaser, MJ; Quint, WGV. 1999. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 116: 1653:1658.

Wang, Ge; Humayun, Z; Taylor, DE. 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. Trend. Microbiol. 7(12): 488-492.

Warren, JR & Marshall, B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet i: 1273-1275.

Xiang, Z; Censini, S; Bayeli, PF; Telford, JL, Figura, N *et al.* 1995. Analysis of expression of cagA and vacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that cagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect. Immun. 63: 94-98.

Xu, Q; Morgan, RD; Roberts, RJ; Xu, SY; van Doorn, LJ; Donahue, JP; Miller, GG; Blaser, MJ 2002. Functional analysis of *iceA1,* a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in *Helicobacter pylori*. Nucleic Acids Research**.** 30: 3839-3847.

Yamazaki, S; Yamakawa, A; Okuda, T; Ohtani, M; Suto, H; Ito, Y; Yamazaki, Y; Keida, Y; Higashi, H; Hatakeyama, M; Azuma, T. 2005. Distinct diversity of *vac*A, *cag*A, and *cag*E genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. J. Clin Microbiol. Aug: 3906-3916.

Zheng, PY & Jones, NL. 2003. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagossome maturation inmacropahges by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. Cell. Microbiol. 5: 25-40.