

ANÁLISE DAS IMPRESSÕES DIGITAIS DE DNA E DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE *HELICOBACTER PYLORI*

Anita P. O. **GODOY**, Maíra C. B. **MIRANDA**, Luciana C. **PAULINO**, Sergio **MENDONÇA**, Marcelo Lima **RIBEIRO** e José **PEDRAZZOLI Jr.**

RESUMO – *Racional* - *Helicobacter pylori* é hoje aceito como o principal agente etiológico de gastrite em seres humanos e fator de risco para úlcera péptica e câncer gástrico. A evolução da infecção está relacionada a diversos fatores, inclusive bacterianos, como presença do gene *cagA* e o genótipo *vacA* s1m1, associados ao desenvolvimento de úlcera e adenocarcinoma gástrico. A técnica de RAPD (“random amplified polymorphic”) tem sido amplamente utilizada para obtenção de impressões digitais de DNA para examinar a similaridade entre linhagens. *Objetivos* - Avaliar a presença de *cagA* e alelos do *vacA* em amostras de *H. pylori* e associar os achados com a doença apresentada e também investigar possível clonicidade entre os fatores de virulência e as doenças com a impressão digital de DNA gerada pelo RAPD-PCR. *Métodos* - Foram incluídas 112 amostras provenientes de pacientes com diferentes laudos endoscópicos: gastrite (n = 41), esofagite de refluxo (n = 14), úlcera gástrica (n = 19) e úlcera duodenal (n = 38). A análise dos fatores de virulência da bactéria foi feita por PCR e as impressões digitais de DNA foram estabelecidas pelo método de RAPD-PCR. *Resultados* - Os resultados obtidos indicam que houve uma associação significativa entre úlcera duodenal e o mosaico *vacA* s1m1. Analisando-se os padrões de bandas geradas pelo RAPD-PCR, sete diferentes dendogramas foram construídos e não foi possível detectar associação significativa entre os agrupamentos, sugerindo que as amostras não possuem perfil clonal. *Conclusão* - Os resultados reforçam a importância do gene *vacA* como um marcador de virulência do *H. pylori*. O RAPD da impressão digital de DNA realizado foi incapaz de associar o padrão de bandas com as enfermidades e os genótipos de *vacA* e *cagA*.

DESCRIPTORIOS – Impressões digitais de DNA. *Helicobacter pylori*. Infecções por *Helicobacter*. Antígenos de bactérias. Proteínas de bactérias.

INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori tem sido associado à etiopatogenia de diversas doenças do sistema digestório⁽³⁵⁾. Atualmente, o microrganismo é considerado o mais importante agente causador de gastrite, fator essencial na gênese da úlcera péptica e fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico⁽¹⁹⁾. Há, ainda, evidências de sua associação com o linfoma MALT (linfoma do tecido linfóide associado à mucosa) e com o linfoma não-Hodgkin gástrico⁽¹⁵⁾.

Isolados clínicos obtidos de diferentes pacientes têm mostrado grande diversidade genética^(25, 34). Nesse sentido, estudos baseados nas seqüências genômicas de duas cepas de *H. pylori* (26695 e J99) revelaram que 22% dos genes não são essenciais e aproximadamente 6% são únicos a cada linhagem^(7, 50). Além disso, é notável a variação na seqüência de alguns genes ou regiões, como a ilha de patogenicidade *cag* (PAI)^(14, 43) e genes de resistência a drogas^(43, 47).

Nos últimos anos vem se intensificando a pesquisa de marcadores de patogenicidade na tentativa de detectar

linhagens bacterianas associadas a cada uma das doenças. O antígeno *CagA* é um fator de virulência do *H. pylori* que é codificado pelo gene *cagA*. A maioria das funções desempenhadas pelas proteínas produzidas por *cagPAI* ainda não foi determinada, no entanto, sabe-se que sua presença está associada ao aumento da secreção de interleucina 8 (IL-8), o que é importante para a quimiotaxia e para a ativação de neutrófilos. O *cagPAI* também é responsável pela remodelação da superfície celular e formação de pedestal, fosforilação de tirosina das células do hospedeiro, ativação do fator transcricional AP-1 e expressão de protooncogenes *c-fos* e *c-jun* por ativação da cascata quinase ERK/MAP^(23, 52, 53). Por essa razão, a produção dessa proteína tem sido associada à progressão das doenças gastrointestinais⁽⁸⁾. PARSONNET et al.⁽⁴¹⁾ mostraram que pacientes infectados por linhagens mais virulentas (*cagA*⁺) teriam um risco 3 vezes maior de desenvolver câncer gástrico.

A produção da citotoxina vacuolizante (*VacA*), codificada pelo gene *vacA*, induz à formação de vacúolos nas células epiteliais⁽¹²⁾. Além disso, a *VacA* produz

Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia – UNIFAG, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP.
Correspondência: Dr. Marcelo Lima Ribeiro – Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia – Faculdade de Medicina da Universidade de São Francisco
– Av. São Francisco de Assis, 218 – 12916-900 – Bragança Paulista, SP. E-mail: marcelo.ribeiro@saofrancisco.edu.br

efeitos prejudiciais diretos nas células como, a alteração do citoesqueleto, a eliminação da proliferação celular, a migração e a apoptose^(13,40). Outros efeitos observados foram a inibição, a ativação e proliferação dos linfócitos T, e a modulação da citocina responsável pela modulação das células T sendo, assim, uma potente toxina imunodepressora, tendo como alvo o sistema imune adaptativo⁽²²⁾. Estudo recente⁽⁶¹⁾ demonstrou que isolados clínicos infectados por linhagens com genótipo *vacA* s1m1 tem a capacidade de mediar a formação de canais ativos e a intoxicação celular, que resulta em redução do potencial transmembranar das mitocôndrias e liberação de citocromos C.

O estudo de marcadores genéticos e técnicas de genotipagem bacteriana são importantes ferramentas para análises epidemiológicas, patogênicas e de susceptibilidade bacteriana. As técnicas mais frequentemente usadas para as tipagens de isolados de *H. pylori* são “restriction fragment length polymorphisms” (PCR-RFLP), “random amplified polymorphic” DNA-PCR (RAPD) e ribotipagem, porém seus desempenhos não têm sido avaliados com perspicácia⁽¹⁰⁾. O RAPD⁽⁶²⁾ tem sido aplicado para a distinção entre os isolados de *H. pylori*, entretanto existem problemas quando a estabilidade e reprodutibilidade da técnica, podendo apresentar amplificação instável para fragmentos pequenos, especialmente por não apresentar bandas visíveis⁽²⁸⁾.

Neste estudo avaliou-se o perfil genético dos isolados clínicos de *H. pylori* através da as impressões digitais de DNA obtido pela técnica de RAPD-PCR e comparou-se com as manifestações clínicas dos pacientes e também com a genotipagem dos fatores de virulência *vacA* e *cagA*, além de associar os fatores de virulências com as doenças manifestadas nos pacientes envolvidos.

MÉTODOS

Casuística

As amostras de *H. pylori* pertencem ao banco de linhagens da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco de Bragança Paulista, SP e foram obtidas de biopsias coletada de voluntários participantes de estudos anteriores previamente aprovados pelo comitê de ética médica (CEP-USF).

Foram incluídas no presente estudo 112 amostras provenientes de pacientes com diferentes laudos endoscópicos: gastrite (n = 41), esofagite de refluxo (n = 14), úlcera gástrica (n = 19) e úlcera duodenal (n = 38). Dentre os isolados clínicos, 64 eram de pacientes do sexo masculino com idades variando entre 21 a 83 (\bar{X} = 39,2 e DP = 13,41) e 48 do feminino, com idades entre 20 e 87 anos (\bar{X} = 47,58 e DP = 16,55).

Cultivo em meio sólido

As linhagens estocadas foram reativadas em meio seletivo BHI agar (Merck, Darmstadt, Alemanha), suplementada com 5% sangue de carneiro desfibrinado, 6 mg/L vancomicina (Sigma Aldrich Chemie, St Louis, MO, EUA), 20 mg/L ácido nalidixico (Sigma Aldrich Chemie), 10 mg/L anfotericina B (Sigma

Aldrich Chemie), 40 mg/L TTC (Sigma Aldrich Chemie) e incubadas em condições de microaerofilia por 3-5 dias, como previamente descrito^(37,44).

Análises moleculares

A partir da cultura bacteriana, o DNA genômico dos isolados clínicos foram extraídos usando o protocolo de fenol-clorofórmio, adaptado por FOX et al.⁽²⁰⁾. A PCR⁽⁴⁹⁾ foi realizada com 25 µl de volume final, contendo 100 ng de DNA genômico, 50 pmol de cada iniciador, 1.0 mmol/L de cada dNTPs (Invitrogen™ Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 1,5% de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™ Life Technologies) e tampão de reação para a enzima. A identificação da bactéria foi confirmada através amplificação do gene que codificou o RNA *r16S* e *glmM* usando iniciadores específicos para cada um dos genes^(6,29). O gene *cagA* foi analisado através dos iniciadores D008 e R008⁽¹¹⁾. Para a amplificação da região m do gene *vacA* foram usados os iniciadores VA3-R e VA3-F para amplificar o tipo m1 e VA4-R e VA4-F para o tipo m2 e para a região s os iniciadores usados foram VA1-R e VA2-F⁽⁵⁴⁾. As impressões digitais de DNA genômicas dos isolados clínicos estudados foram obtidas através da técnica de RAPD-PCR. A reação foi feita com 25 µl de volume final contendo 2,5 µl de DNA genômico, 20 pmol de iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1,5% de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA polimerase e tampão de reação para a enzima. A reação foi realizada em triplicata para garantir a reprodutibilidade do método. Três iniciadores universais, considerados altamente discriminativos (1281, D11344 e D9355)⁽¹⁾ foram usados para obtenção dos diferentes padrões de bandas. Os produtos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2%.

Análise dos dados

A possível associação entre os genes *vacA* e *cagA* do *H. pylori* com as diferentes doenças foi analisada por meio do teste Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates e Exato de Fisher com o auxílio do “software” Biostat 2,0. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para $P < 0,05$. A possível associação entre o padrão de bandas oriundas do RAPD da bactéria com os fatores de virulência e as doenças foi analisada com o auxílio do “software” GelCompare 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

RESULTADOS

Apenas amostras de pacientes com monoinfecção pelo *H. pylori* foram incluídas neste estudo. Deste modo, 17 amostras com genótipo múltiplo foram excluídos das análises, restando 95 isolados clínicos (33 de pacientes com gastrite, 12 com esofagite, 17 com úlcera gástrica e 33 com úlcera duodenal).

A genotipagem para *vacA* foi determinada por PCR, o alelo s1 foi identificado em amostras obtidas de 58 pacientes (61%) enquanto que isolados clínicos de 37 pacientes apresentaram o alelo s2 (39%). Para o polimorfismo da região mediana do gene, em 26 (27%) foi possível detectar o alelo m1, e o m2 foi

DISCUSSÃO

identificado em amostras obtidas de 69 pacientes (73%). Para a associação em mosaico dos alelos s e m, obtiveram-se taxas de 27% (26/95), 34%(32/95) e 39% (37/95) para os genótipos s1m1, s1m2 e s2m2, respectivamente (Tabela 1).

Comparando-se as diferentes manifestações clínicas (gastrite, esofagite, úlcera gástrica e úlcera duodenal) com os genótipos de *vacA* através do teste χ^2 , observou-se associação significativa entre úlcera duodenal (UD) e o mosaico alélico *vacA* s1m1 ($\chi^2=10,41$; $P = 0,005$; OR = 4,1; 95% CI = 1,57 $\leq \mu \leq 10,6$), devido a maior frequência do alelo s1 ($\chi^2 = 10,16$; $P = 0,003$; OR = 12,14; 95% CI = 3,35 $\leq \mu \leq 44,02$). Por outro lado, foi detectada também uma associação entre o alelo s2 e a esofagite ($\chi^2 = 5,65$; $P = 0,038$; OR= 5,89; 95% CI = 1,47 $\leq \mu \leq 23,5$).

Em relação ao gene *cagA* foi possível detectar a presença deste gene em 68% (65/95) das amostras. Quando se compara a presença desse gene com as doenças estudadas, não foi observada associação significativa. Porém o genótipo *cagA* + *vacA* s1m1 foi mais freqüentemente observado em pacientes com UD ($\chi^2 = 11,95$; $P = 0,0354$; OR = 5; 95% CI = 1,87 $\leq \mu \leq 13,37$).

Para a obtenção das impressões digitais de DNA genômicas das linhagens estudadas foi utilizado o RAPD-PCR, e com a ajuda do software GelCompar 4.1. Foram realizados três ensaios em dias alternados, mostrando que os padrões de banda se mantiveram iguais, sendo, assim, considerados estáveis. Sete diferentes dendogramas foram construídos através da comparação do padrão de bandas. Cada dendograma gerou dois agrupamentos distintos e totalmente heterogêneos.

Ao comparar as doenças desenvolvidas pelos pacientes e a genotipagem de *cagA* e *vacA* dos isolados clínicos com o agrupamento dos dendogramas, não foi possível detectar associação significativa entre os grupamentos de nenhum dos sete dendogramas construídos.

TABELA 1. Genotipagem do *vacA* e *cagA* de pacientes com diferentes doenças

| Genótipo | Enfermidades | | | | Total n (%) |
|--------------------|------------------|----------|----------|----------|-------------|
| | Úlceras pépticas | | | | |
| | G n (%) | UG n (%) | UD n (%) | E n (%) | |
| <i>vacA</i> | | | | | |
| s1 | 16 (48) | 9 (53) | 30 (90)* | 3 (25) | 58 (61) |
| s2 | 17 (52) | 8 (47) | 3 (10) | 9 (75)** | 37 (39) |
| m1 | 6 (18) | 3 (18) | 15 (45) | 2 (17) | 69 (73) |
| m2 | 27 (82) | 14 (82) | 18 (55) | 10 (83) | 26 (27) |
| s1m1 | 6 (18) | 3 (18) | 15 (45)* | 2 (17) | 26 (27) |
| s1m2 | 10 (30) | 6 (35) | 15 (45) | 1 (8) | 32 (34) |
| s2m2 | 17 (52) | 8 (47) | 3 (10) | 9 (75) | 37 (39) |
| <i>cagA</i> | | | | | |
| <i>cagA</i> + | 18 (55) | 14 (82) | 26 (79) | 7 (58) | 65 (68) |
| <i>cagA</i> - | 15 (45) | 3 (18) | 7 (21) | 5 (42) | 30 (32) |

* s1m1 x UD (úlcera duodenal) [$\chi^2=10,41$; $p=0,005$; OR= 4,1 ;95% CI= 1,57 $\leq \mu \leq 10,6$] devido a uma maior frequência do alelo s1 [$\chi^2=10,16$; $p=0,003$; OR= 12,14 ;95% CI= 3,35 $\leq \mu \leq 44,02$].

** s2 x GERD [$\chi^2=5,65$; $p=0,038$; OR= 5,89 ;95% CI= 1,47 $\leq \mu \leq 23,5$].

Legenda:

G – gastrite
UG – úlcera gástrica
UD – úlcera duodenal
E – esofagite

Algumas características das amostras de *H. pylori* parecem estar associadas à evolução da infecção para uma doença mais grave. Entre elas, alguns genótipos, como alelos s1 e m1 de *vacA* e presença de *cagA*, têm sido considerados marcadores de patogenicidade por estarem associados à produção e excreção de citotoxina, à indução de lesão epitelial e à resposta inflamatória, mais intensas^(5, 12, 13, 23, 27, 40, 42, 52, 53, 55).

A distribuição geográfica dos alelos do *vacA* não é uniforme⁽⁵⁶⁾. A frequência do alelo *vacA* s1 observada neste estudo foi de 61%, sendo condizente com os dados encontrados por esta mesma equipe em outros estudos e também com as descritas na França, Itália, Canadá e Estados Unidos e inferior à encontrada em países como Japão, México e África do Sul^(26, 38, 46, 56, 58, 59). Por outro lado, estudos demonstraram que a distribuição dos alelos m é mais homogênea e, de maneira geral, metade das amostras é m1 e a outra metade é m2⁽⁵⁶⁾. No entanto, no presente estudo a frequência do alelo *vacA* m2 (73%) foi superior às do tipo m1 (27%), como também foi observado em estudos anteriores^(26, 46).

Estudos realizados anteriormente sugerem que o alelo m1 do gene *vacA* é responsável por promover alterações histológicas devido a sua associação com a degeneração epitelial, redução do muco e erosões microscópicas, contrastando com o observado no alelo m2. Além disso, os alelos s1m1 associados à presença de *cagA* aumentariam a inflamação tecidual e a migração neutrofílica⁽³⁹⁾. Estudos realizados na década de 90 sugerem que o genótipo s1m1 possa ser usado como marcador de amostras mais virulentas, em conformidade com o fato de que o alelo s1 está relacionado à produção de maior quantidade de citotoxina vacuolizante e que o alelo m1 está associado com produção de maior quantidade da toxina⁽⁴⁾. Neste estudo, foi observada associação entre genótipo s1m1 dos isolados e presença de úlcera duodenal, confirmando resultados descritos para amostras brasileiras e também de outras regiões mundiais^(2, 4, 16, 17, 26, 27, 36, 46, 48, 55, 59).

A esofagite de refluxo é uma doença caracterizada por exposição anormal da mucosa ao conteúdo ácido do estômago. Recentemente, alguns trabalhos mostram que a infecção pelo *H. pylori* poderia ter um efeito protetor contra a doença^(17, 18, 33, 45, 57). De modo complementar, mostrou-se que pacientes infectados por linhagens mais virulentas (*cagA*+, *vacA*s1) estariam inversamente associados com o desenvolvimento da doença. Deste modo, pacientes infectado por tais linhagens seriam protegidos contra complicações decorrentes do refluxo ácido^(17, 33, 45, 57). Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar tal fenômeno. Por um lado, postula-se que este efeito deva-se à redução da secreção ácida gerada pela infecção por linhagens mais virulentas^(51, 57), por outro acredita-se que, além dos fatores de virulência da bactéria, alguns fatores genéticos do hospedeiro devem contribuir nesta proteção⁽⁴⁵⁾. Na presente série, detectou-se uma associação entre a presença de linhagens menos virulentas com esta doença ao se comparar o genótipo s2 do gene *vacA* da bactéria com o desenvolvimento de esofagite de refluxo, assim como observado por outros autores^(18, 32, 44, 57).

De forma semelhante ao que se observa para o *vacA*, a frequência de amostras *cagA* positivas são heterogêneas, variando

de uma região geográfica para outra. Em grande parte dos países da Europa ocidental e nos Estados Unidos, a frequência de amostras *cagA* positivas varia entre 59% e 75%^(55, 60), na Itália e em Portugal, as taxas são superiores a 80%⁽⁵⁵⁾ e, no México, praticamente 100% dos indivíduos apresentam-se colonizados por amostras que carregam o gene⁽³⁸⁾. No presente estudo, amostras *cagA* positivas foram identificadas em 68% dos isolados, frequência similar à observada em diversos países ocidentais e em várias regiões do Brasil, com exceção de Marília, cidade do interior do Estado de São Paulo, onde a taxa de amostras *cagA* positivas foi de apenas 48%^(3, 16, 21, 26, 36, 46).

O genótipo *cagA*+ *vacA* s1m1 foi mais frequentemente observado em pacientes com úlcera duodenal de acordo com o reportado por outros autores brasileiros^(3, 16, 21, 26, 36, 46). Essa relação entre os genótipos ainda é pouco conhecida. Embora vários estudos tenham demonstrado a existência de uma relação entre *cagA* e *vacA*, a razão pela qual esses dois elementos genéticos estão fortemente associados não é clara mesmo porque eles não apresentam nenhuma ligação física no cromossomo do *H. pylori*⁽⁹⁾. Essa associação pode ser epidemiológica e/ou evolutiva; é possível, ainda, que tais associações tenham uma base funcional ainda não explicada.

O perfil genético (impressão digital de DNA) dos 95 isolados clínicos estudados foi analisado através da técnica de RAPD-PCR. Essa técnica tem sido usada para discriminar amostras de *H. pylori* associadas a diferentes doenças e com a resistência bacteriana aos antimicrobianos usados na terapia de erradicação. O RAPD tem capacidade discriminatória razoável e é eficaz para a genotipagem do *H. pylori* em larga escala, mas a estabilidade desse método deve ser levada em consideração, pois a reprodutibilidade interlaboratorial é muito baixa. BURUCOA et al.⁽¹⁰⁾, KUIPERS et al.³¹ e KIDD et al.⁽³⁰⁾ sugeriram que a técnica RAPD pode ser estável e reprodutível desde que esteja altamente padronizada,

incluindo métodos criteriosos de preparo do DNA, o uso constante de polimerase termoestável, os volumes e concentrações dos reagentes que nunca devem variar e o procedimento adequado e padronizado do termociclador e do método de visualização das bandas. Neste estudo todas as reações de RAPD foram repetidas por 3 vezes em tempos diferentes e por operadores distintos para a garantia da reprodutibilidade.

Os resultados de RAPD observados neste estudo mostraram que os agrupamentos dos sete dendogramas construídos foram totalmente heterogêneos. A análise dos padrões de bandas obtidos foi incapaz de identificar associação entre agrupamento e potencial das doenças, estando de acordo com o observado por KIDD et al.⁽³⁰⁾. Outro estudo realizado nos Estados Unidos obteve resultados distintos onde, isolados clínicos provenientes de pacientes com UD foram agrupados⁽²⁴⁾.

Não houve associação significativa entre os fatores de virulência e a segregação dos dois agrupamentos de cada dendograma. Diferentemente do observado por outro estudo, que sugere haver associação entre RAPD das impressões digitais de DNA e as variações de *vacA* e a presença de *cag* PAI, porém esse mesmo estudo falhou em associar a segregação dos agrupamentos com o genótipo de *iceA* e da região m do gene *vacA*⁽³⁰⁾.

Os resultados desta casuística sugerem que RAPD das impressões digitais de DNA realizados com os iniciadores 1281, D1134 e D955 não deveriam ser usados como ferramenta para o estudo da virulência do *H. pylori*, sendo incapaz de associar o padrão de bandas com as doenças e os genótipos de *vacA* e *cagA*, que tiveram distribuição similar em ambos os agrupamentos dos dendogramas. Estes resultados também reforçam a importância do gene *vacA* como um marcador de virulência do *H. pylori*. A busca por novos marcadores é importante para o melhor entendimento da patogenicidade causada pela presença do *H. pylori*.

Godoy APO, Miranda MCB, Paulino LC, Mendonça S, Ribeiro ML, Pedrazzoli Jr J. Analysis of molecular fingerprint and virulence factors of *Helicobacter pylori* strains. *Arq Gastroenterol*. 2007;44(2):107-12.

ABSTRACT - Background - *Helicobacter pylori* is now accepted as the most important agent of gastritis in humans, as well as a risk factor for peptic ulcer disease and gastric carcinoma. The outcome of the infection is related to several factors, among them bacterial ones such as *cagA* and *vacA* s1m1 genotype. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR, has been used to generate DNA fingerprints to evaluate similarity among strains within a bacterial species. **Aim** - To assess the association between RAPD fingerprinting, virulence factors and the disease. **Methods** - *H. pylori* was isolated from 112 patients (41 with gastritis; 19 with gastric ulcers; 38 with duodenal ulcer disease; and 14 with gastroesophageal reflux disease). Allelic variants of *cagA* and *vacA* were identified using the polymerase chain reaction (PCR) and the fingerprints were generated by RAPD-PCR. **Results** - There was a strong association between the genotype *vacA* s1m1 and duodenal ulcers. Although RAPD-PCR is a very useful tool in genotyping *H. pylori*, no significant correlation between the diseases studied and DNA fingerprint was detected neither with fingerprint and different *vacA* and, *cagA* genotypes. **Conclusion** - The extension of our analysis to patients with well-characterized gastric diseases may provide significant information on the relationship between *vacA* genotypes and clinical outcomes of *H. pylori* infection.

HEADINGS – DNA fingerprints. *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* infections. Antigens. Bacterial. Bacterial proteins.

REFERÊNCIAS

1. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:5137-42.
2. Arents NL, Van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Van Slochteren KR, Degener JE, Kleibeuker JH, Van Doorn LJ. The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:2603-8.
3. Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, De Gusmao VR, Queiroz DM, Magalhaes PP, De Carvalho AS, De Oliveira CA, Nogueira AM, Rocha GA, Rocha AM. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1746-50.
4. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995;270:17771-7.
5. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997;112:92-9.
6. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol.* 1993;39:338-44.
7. Bjorkholm BM, Oh JD, Falk PG, Engstrand LG, Gordon JJ. Genomics and proteomics converge on *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4:237-45.
8. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleianthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995;55:2111-5.
9. Bukanov NO, Berg DE. Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol Microbiol.* 1994;11:509-23.
10. Burucoa C, Lhomme V, Fauchere JL. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 1999;37:4071-80.
11. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burrone D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:5791-5.
12. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 1992;267:10570-5.
13. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* 2003;63:951
14. Dong Q, O'Sullivan M, Hall W, Herra C, Kean C, O'Morain C, Buckley M. Identification of a new segment involved in *cagA* 3' region variation of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;33:51-5.
15. Eidt S, Stolte M, Fischer R. *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol.* 1994;47:436-9.
16. Evans DG, Queiroz DM, Mendes EN, Evans DJ Jr. *Helicobacter pylori* *cagA* status and s and m alleles of *vacA* in isolates from individuals with a variety of *H. pylori*-associated gastric diseases. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3435-7.
17. Fallone CA, Barkun AN, Friedman G, Mayrand S, Loo V, Beech R, Best L, Joseph L. Association of *Helicobacter pylori* genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:659-69.
18. Feldman M, Cryer B, McArthur KE, Huet BA, Lee E. Effects of aging and gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. *Gastroenterology.* 1996;110:1043-52.
19. Forman DE, Coletta D, Kenny D, Kosowsky BD, Stoukides J, Rohrer M, Pastore JO. Clinical issues related to discontinuing digoxin therapy in elderly nursing home patients. *Arch Intern Med.* 1991;151:2194-8.
20. Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Shames B, Murphy JC. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1229-37.
21. Gatti LL, Fagundes-e-Souza EK, Leite KR, Bastos EL, Vicentini LR, Silva LC, Smith A, Payao SL. *cagA vacA* alleles and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51:231-5.
22. Gebert B, Fischer W, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;152:205-20.
23. Glocker E, Lange C, Covacci A, Bereswill S, Kist M, Pahl HL. Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kappaB activation. *Infect Immun.* 1998;66:2346-8.
24. Go MF, Chan KY, Versalovic J, Koeuth T, Graham DY, Lupski JR. Cluster analysis of *Helicobacter pylori* genomic DNA fingerprints suggests gastroduodenal disease-specific associations. *Scand J Gastroenterol.* 1995;30:640-6.
25. Go MF, Kapur V, Graham DY, Musser JM. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol.* 1996;178:3934-8.
26. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvenuto YH, Vitiello L, Miranda C, Mendonça S, Pedrazzoli J Jr. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol.* 2003;3:20
27. Gunn MC, Stephens JC, Stewart JA, Rathbone BJ, West KP. The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *J Clin Pathol.* 1998;51:761-4.
28. Han FC, Ng HC, Ho B. Stability of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting in genotyping clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol.* 2003 9:2021-4.
29. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, Dixon MF, Wyatt JJ, Tompkins DS, Taylor GR. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2543-9.
30. Kidd M, Atherton JC, Lastovica AJ, Louw JA. Clustering of South African *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer disease patients is demonstrated by repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1833-9.
31. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, van Der Hulst RW, With HP, Hook-Nikanne J, Thompson AS, Blaser MJ. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis.* 2000;181:273-82.
32. Labenz J, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* in gastro-oesophageal reflux disease: causal agent, independent or protective factor? *Gut.* 1997;41:277-80.
33. Loffeld RJ, Werdmuller BF, Kusters JG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Kuipers EJ. Colonization with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains inversely associated with reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Digestion.* 2000;62:95-9.
34. Logan RP, Berg DE. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1996;348:1462-3.
35. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984;1:1311-4.
36. Martins LC, Corvelo TC, Demachki S, Araujo MT, Assumpcao MB, Vilar SC, Freitas FB, Barbosa HP, Fecury AA, do Amaral RK, dos Santos SE. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:875-81.
37. Mendonça S, Eccissato C, Sartori MS, Godoy APO, Guerzoni RA, Degger M, Pedrazzoli JJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter.* 2000;5:79-83.
38. Morales-Espinoso R, Castillo-Rojas G, Gonzalez-Valencia G, Ponce de Leon S, Cravioto A, Atherton JC, Lopez-Vidal Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3001-4.
39. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Gomes AT, Barreira R, Figueira P, Salgado C, Belo L, Peixoto A, Bravo JC, Bravo LE, Realpe JL, Plaisier AP, Quint WG, Ruiz B, Correa P, van Doorn LJ. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol.* 2001;158:647-54.
40. Pai R, Cover TL, Tarnawski AS. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (*VacA*) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;262:245-50.
41. Parsonnet J, Replogle M, Yang S, Hiatt R. Seroprevalence of *CagA*-positive strains among *Helicobacter pylori*-infected, healthy young adults. *J Infect Dis.* 1997;175:1240-2.
42. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest.* 1995;73:760-70.
43. Peters TM, Owen RJ, Slater E, Varea R, Teare EL, Savarymattu S. Genetic diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island and effect on expression of anti-*CagA* serum antibody in UK patients with dyspepsia. *J Clin Pathol.* 2001;54:219-23.
44. Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1987;25:2378-9.
45. Queiroz DM, Rocha GA, Oliveira CA, Rocha AM, Santos A, Cabral MM, Nogueira AM. Role of corpus gastritis and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* infection in reflux esophagitis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2849-53.
46. Ribeiro ML, Vitiello L, Miranda MC, Benvenuto YH, Godoy AP, Mendonça S, Pedrazzoli J Jr. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;36:181-5.
47. Ribeiro ML, Gerrits MM, Benvenuto YH, Berning M, Godoy AP, Kuipers EJ, Mendonça S, Van Vliet AH, Pedrazzoli J Jr, Kusters JG. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using Pcr-Rflp. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;40:57-61.
48. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol.* 1998;36:944-8.
49. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:6230-4.

50. Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:14668-73.
51. Schwizer W, Thumshirn M, Dent J, Guldenschuh I, Menne D, Cathomas G, Fried M. *Helicobacter pylori* and symptomatic relapse of gastro-oesophageal reflux disease: a randomised controlled trial. Lancet. 2001;357:1738-42.
52. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:1259-64.
53. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J Exp Med. 1994;179:1653-8.
54. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun. 1993;61:1799-809.
55. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger PM, Boer W, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 1998;115:58-66.
56. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, Carneiro F, Vanderborght B, Pegado MD, Sanna R, De Boer W, Schneeberger PM, Correa P, Ng EK, Atherton J, Blaser MJ, Quint WG. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 1999;116:823-30.
57. Vicari JJ, Peek RM, Falk GW, Goldblum JR, Easley KA, Schnell J, Perez-Perez GI, Halter SA, Rice TW, Blaser MJ, Richter JE. The seroprevalence of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease. Gastroenterology. 1998;115:50-7.
58. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. Helicobacter. 1998;3:241-53.
59. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol. 1999;37:2274-9.
60. Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon AT, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. J Clin Pathol. 1998;51:55-61.
61. Willhite DC, Blanke ER. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. Cell Microbiol. 2004;6:143-54.
62. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990;18:6531-5.

Recebido em 21/12/2005.
Aprovado em 5/10/2006.