

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**AMANDA FERRAZ ESTEVES
WEENDELLY NAYARA PEREIRA**

**DETECÇÃO DO MARCADOR DE PATOGENICIDADE
DO *HELICOBACTER PYLORI*, GENE *DUPA*, EM
AMOSTRAS DE BIÓPSIA GÁSTRICA INFECTADAS,
ATRAVÉS DA TÉCNICA DA PCR**

BAURU
2014

**AMANDA FERRAZ ESTEVES
WEENDELLY NAYARA PEREIRA**

**DETECÇÃO DO MARCADOR DE PATOGENICIDADE
DO *HELICOBACTER PYLORI*, GENE *DUPA*, EM
AMOSTRAS DE BIÓPSIA GÁSTRICA INFECTADAS,
ATRAVÉS DA TÉCNICA DA PCR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr.
Lucas Trevizani Rasmussen.

BAURU
2014

E799d Esteves, Amanda Ferraz.

Detecção do marcador de patogenicidade do Helicobacter Pylori, gene dupA, em amostras de biópsia gástrica infectadas, através da técnica da PCR / Amanda Ferraz Esteves; Weendelly Nayara Pereira -- 2014.
50f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. H. Pylori. 2. dupA. 3. cagA. 4. vacA. 5. Doenças gástricas. I. Pereira, Weendelly Nayara. II. Rasmussen, Lucas Trevizani. III. Título.

**AMANDA FERRAZ ESTEVES
WEENDELLY NAYARA PEREIRA**

**DETECÇÃO DO MARCADOR DE PATOGENICIDADE DO
HELICOBACTER PYLORI, GENE *DUPA*, EM AMOSTRAS DE
BIÓPSIA GÁSTRICA INFECTADAS, ATRAVÉS DA TÉCNICA DA PCR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen
Universidade Sagrado Coração

Prof. Dra. Rita Luiza Peruquetti
Universidade Sagrado Coração

Me. Agostinho Caleman Neto

Dedicamos este trabalho aos nossos pais
razão da nossa existência, a quem
seremos gratas, e a quem devemos
todas as nossas realizações.

AGRADECIMENTOS DE WEENDELLY NAYARA PEREIRA

Primeiramente a Deus, pela vida, por ter me dado dons e tudo mais o suficiente para que eu pudesse chegar a este estágio. Sei que *“tudo posso naquele que me fortalece”*;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Processo nº 2012/18333-3 pelo apoio financeiro e incentivo na pesquisa, que resultou no presente Trabalho de Conclusão de Curso;

À Universidade Sagrado Coração pela bolsa de Iniciação Científica concedida e por todos os recursos que vem oferecendo em prol da pesquisa e de um ensino de qualidade;

Aos meus pais por todos os esforços para garantir meus estudos e pelos ensinamentos de vida, a quem devo parte do que tenho e do que sou, principalmente a minha mãe, Maria Madalena, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me apoia e acredita na minha capacidade. Agradeço a dedicação e amor recebido sempre;

Às minhas irmãs Wellen e Thayani por estarem sempre do meu lado, compartilhando momentos importantes da minha vida;

A todos os meus familiares, amigos, colegas e conhecidos que participam, vibram e acreditam no meu potencial, agradeço de coração, pois sempre aumentam a minha vontade de vencer;

Ao professor Dr. Lucas Trevizani Rasmussen, meu orientador, pelos ensinamentos compartilhados, oportunidade, confiança e mensagens de fé e otimismo nos momentos difíceis desta caminhada;

À coordenadora do curso de biomedicina, professora Me. Daniela Barbosa Nicolielo pelo incentivo e apoio nessa fase tão importante da minha vida;

Ao funcionário do laboratório de Citogenética e Biologia Molecular da USC, Wilson Aparecido Orcini, pela ajuda, atenção e informações cedida;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento acadêmico e a construir os grandes momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS DE AMANDA FERRAZ

Agradeço a Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus pais, irmãos, e a toda minha família que, com muito apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao professor Dr. Lucas Trevizani Rasmussen pela paciência na orientação e incentivo.

À professora e coordenadora do curso, Me. Daniela Barbosa Nicolielo pelo convívio, pelo apoio, por todo conhecimento compartilhado.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio, em especial a minha amiga Weendelly, que sempre esteve ao meu lado me incentivando, me encorajando, me levando a buscar mais conhecimento.

“Ter fé é assinar uma folha em branco e deixar que Deus escreva o que ele quer.”

(Santo Agostinho)

RESUMO

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram negativa, conhecida por colonizar a mucosa gástrica humana, e tem sido associada à gastrite crônica, úlcera péptica e duodenal e é um importante fator de risco no desenvolvimento do câncer gástrico. Fatores de virulência produzidos por essa bactéria, têm sido alvo de várias pesquisas científicas, entre eles o gene *dupA* (*duodenal ulcer promoting A*) que pode estar envolvido no desenvolvimento de úlceras duodenais e parece ser um fator protetor contra o câncer gástrico. Assim, o presente estudo teve como objetivo detectar o marcador de patogenicidade *dupA* do *H. pylori*, através da técnica de PCR e associa-lo ao gene *vacA* e a presença do gene *cagA*, em amostras infectadas pelo *H. pylori*. Foram utilizadas 205 amostras de biópsia gástrica, submetidas à extração de DNA, diagnóstico e genotipagem do *H. pylori* pela PCR. O gene *dupA* foi detectado em 85 (41,5%) amostras, o gene *cagA* foi encontrado em 98 (47,8%), os genótipos s1/m1 e s2/m2 de maior e menor patogenicidade do gene *vacA* foram encontrados em 103 (50,24%) e 75 (36,58%) amostras respectivamente, outros genótipos do gene *vacA* foram diagnosticados (s1/m2, s2/m1 e s1/s2/m1/m2) em 27 pacientes (13,17%). A análise estatística revelou uma associação significativa entre as amostras *dupA*+ e *cagA*+ ($p=0.0003$, relative risk (RR) 1.73 and confidence interval [CI]=1.3–2.3). Uma segunda correlação foi verificada entre as amostras *dupA*+ e genótipo s1/m1 do gene *vacA* ($p=0.0001$, RR: 1.72 and CI: 1.3–2.2). A combinação mais virulenta *dupA*+ / *cagA*+ / s1/m1 foi obtida em 47 pacientes, sugerindo uma associação entre os principais marcadores de virulência do *H. pylori*. Em resumo o gene *dupA* apresentou uma alta frequência nos pacientes estudados e foi associado à presença do gene *cagA* e alelos s1/m1 do gene *vacA*, podendo ser considerado um importante fator de virulência envolvido na etiologia das doenças gástricas.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*. *dupA*. *cagA*. *vacA*. Doenças gástricas.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram negative bacteria, known to colonize the human gastric mucosa, and has been associated with chronic gastritis, peptic and duodenal ulcers and is a major risk factor for the development of gastric cancer. Virulence factors of *Helicobacter pylori* have been demonstrated to be predictors of gastric diseases. Duodenal ulcer-promoting gene A (*dupA*) is a novel virulence factor in the *Helicobacter pylori* and it was associated with the duodenal ulcer development and a reduced risk for gastric carcinoma in some populations. The present study aimed to determine the presence of *dupA* gene and evaluate the association among *dupA* and other virulence factors such as *cagA*, *vacA* in Brazilian patients. Gastric biopsies were obtained from 205 dyspeptic patients, 100 pediatric and 105 adult ones. DNA was extracted and analyzed for the presence of *H. pylori* and virulence factors using the polymerase chain reaction method. Patients with gastritis had a higher frequency of *H. pylori*-positive. The *dupA* gene was detected in 41.5% (85/205); *cagA* gene was obtained with 98 isolates (47.8%) and *vacA* genotypes s1/m1 50.2%, s1/m2 8.3%, s2/m2 36.6%, s2/m1 0.5% and s1/s2/m1/m2 4.4% were found respectively. We also verified a significant association between *cagA* and *dupA* genes ($p=0.0003$, relative risk (RR) 1.73 and confidence interval [CI]=1.3–2.3). The genotypes s1/m1 were also associated with *dupA* gene ($p=0.0001$, RR: 1.72 and CI: 1.3–2.2). The same associations were verified when analyzing pediatric and adults groups of patients individually. *dupA* is highly frequent in Brazilian patients and it was associated with *cagA* gene and *vacA* s1/m1 genotype, and it may be considered an important virulence factor in the development of gastric diseases in adult or pediatric patients.

Keywords: *Helicobacter pylori*. *dupA*. *cagA*. *vacA*. gastroduodenal diseases.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	BREVE HISTÓRICO.....	13
2.2	ASPECTOS GERAIS DO <i>H. PYLORI</i>	14
2.3	MORFOLOGIA	15
2.4	<i>H. PYLORI</i> E CÂNCER GÁSTRICO	15
2.5	EPIDEMIOLOGIA E ROTAS DE TRANSMISSÃO DO <i>H. PYLORI</i>	16
2.6	VIRULÊNCIA DO <i>H. PYLORI</i>	18
2.6.1	Gene <i>vacA</i> (Citotoxina Vacuolizante A).....	20
2.6.2	Gene <i>cagA</i> (Citotoxina - Associada A)	21
2.6.3	Gene <i>dupA</i> (Gene promotor de ulcera duodenal).....	22
3	OBJETIVOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	AMOSTRA DE DNA.....	24
4.2	COLETA DO MATERIAL, EXTRAÇÃO DE DNA, DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM DO <i>H. PYLORI</i>	24
4.3	DETECÇÃO DO FATOR DE VIRULÊNCIA DO <i>H. PYLORI</i> , GENE <i>DUPA</i>	25
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5	RESULTADOS	27
5.1	DETECÇÃO DO GENE <i>DUPA</i>	27
5.2	PRESENÇA DO GENE <i>CAGA</i> E ALELOS DO GENE <i>VACA</i>	27
5.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE PATOGENICIDADE: GENES <i>DUPA</i> , <i>CAGÁ</i> E <i>VACA</i>	28
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33
	APÊNCIDE A - ARTIGO PUBLICADO	41

1 INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um importante patógeno que coloniza a mucosa gástrica humana e induz a uma inflamação crônica, resultando numa variedade de doenças gastroduodenais variando de gastrite e úlcera péptica superficial a adenocarcinoma gástrico e linfoma de MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). (CAO et al., 2014; DE JESUS et al., 2012). Apesar de um declínio geral na incidência de câncer gástrico, ele continua a ser o quarto câncer mais comum e a segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. (YAMAOKA, 2012).

Trata-se de uma bactéria bacilar, Gram negativa, microaerófila e com flagelos, que lhe oferecem uma eficiente motilidade, além de ser uma grande produtora da enzima urease. (MARSHALL, WARREN, 1984; ZHAO et al., 2014).

A infecção pelo *H. pylori* é quase sempre associada a uma resposta inflamatória, no entanto, úlcera péptica e câncer gástrico ocorrem apenas em um subgrupo de indivíduos cronicamente infectados pelo *H. pylori*. Presume-se que ambos, os fatores bacterianos e do hospedeiro contribuam para esta resposta diferencial. (VIKRAM; ANANTHAKRISHNAN; TOVEY, 2013).

A infecção por este microorganismo é muito comum e afeta aproximadamente metade da população mundial, porém o modo de transmissão é incerto e nenhuma via tem sido claramente identificada. É normalmente adquirida na infância, e uma vez estabelecida, pode persistir durante toda a vida do hospedeiro se não proceder a sua erradicação com antibióticos. (PORTAL-CELHAY, PEREZ-PEREZ, 2006; BATESON, 2006). É a cronicidade desta infecção que pode levar ao desenvolvimento das doenças gástricas mais severas, aparecendo as manifestações clínicas normalmente na idade adulta. (BLASER, ATHERTON, 2004; BATESON, 2006).

A prevalência da infecção por *H. pylori* nos adultos é maior em países em desenvolvimento se comparado com os países desenvolvidos podendo estar correlacionado a falta de saneamento básico, renda, educação, entre outros. (SUERBAUM, MUCHETTI, 2002; KASPER et al., 2008).

Há diversos fatores que contribuem para colonização e persistência da bactéria e estão inerentemente relacionados com a virulência do *H. pylori*. A resistência ao ácido gástrico, a motilidade e a adesão são processos fundamentais

para a colonização das células epiteliais gástricas.(AGUILAR, AYALA, FIERROS-ZARATE, 2001; TRABULSI, 2002)

É de grande importância o conhecimento das características genéticas do *H. pylori*, pois permite compreender que as espécies podem diferir em virulência, aumentando o risco de doença gástrica. (FAJARDO et al., 2013; SIDDIQUE et al., 2014).

A presença ou ausência de determinados genes e suas associações está relacionado com um maior grau de patogenicidade do. A literatura destaca três genes como sendo os principais marcadores de patogenicidade *H. pylori*; gene *cagA* (*cytotoxin associated gene A*), o gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin*), e o mais recente gene *dupA* (*duodenal ulcer promoting gene*). (FAJARDO et al., 2013; SALAMA et al., 2001).

Todas as cepas do *H. pylori* possuem o gene *vacA*, que é um importante fator de virulência do *H. pylori* e está associado com a produção de uma citotoxina vacuolizante conhecida como *vacA*. A atividade protéica do *vacA* envolve alterações no citoesqueleto das células, apoptose e vacuolização celular. (DEBELLIS et al., 2001; TOMBOLA et al., 2001).

O gene *vacA* é composto basicamente por três regiões variáveis conhecidas como região “s”, região “m” e região “i”. A região “s” é responsável por codificar o peptídeo sinal e pode se apresentar como alelos “s1” e/ou “s2”, já a região “m”, localizada na região mediana do gene, pode apresentar-se como alelos “m1” e/ou “m2” e a região “i” considerada como intermediária (CHIOZZI et al., 2009; SIDDIQUE et al., 2014).

O gene *cagA* está diretamente relacionado á doenças gástricas sendo o mais patogênico fator de virulência expresso pelo *H. pylori*. Presente em 50-70% das cepas de *H. pylori* está associado ao aumento da síntese de interleucinas pró-inflamatórias pelo epitélio gástrico, intensificando a resposta inflamatória e aumentando significativamente o risco do desenvolvimento de gastrites, úlceras pépticas, atrofia e câncer gástrico. (RASMI; RAEISI; SEYYED MOHAMMADZAD, 2012).

Em 2005, LU et al., identificaram um gene bacteriano associado à úlcera duodenal, nomeado de *dupA*. A bactéria portadora do gene *dupA* está presente em aproximadamente 42% das úlceras duodenais e em apenas 21% dos pacientes com gastrite, apresentando-se como um novo marcador de risco para úlcera duodenal e

de risco reduzido para câncer gástrico. Os resultados dos ensaios clínicos são ainda mais significativos, demonstrando que a erradicação de *H. pylori* pode promover a cura da úlcera péptica. (ARKKILA et al., 2005).

A função do *dupA* ainda é desconhecida, mas de acordo com LU et al. (2005) há relação com a absorção de DNA durante a transferência do material genético em conjugação bacteriana, divisão da célula e transferência de proteínas.

Por fim, dada a importância do *Helicobacter pylori* na etiologia de doenças gástricas, o pouco conhecimento sobre o marcador de patogenicidade *dupA* e a relação com o gene *cagA* e alelos do gene *vacA*, o presente trabalho é bastante original podendo contribuir significativamente no entendimento das doenças gástricas e do *H. pylori*. (RASMUSSEN et al., 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BREVE HISTÓRICO

Um dos primeiros registros sobre a observação de bactérias espirais na mucosa gástrica foi realizado em cachorros, em 1890. (BIZZOZERO et al., 1892). Em 1982 uma bactéria foi descrita pela primeira vez em humanos, por Marshall e Warren, a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com fortes dores estomacais, diagnosticadas como gastrite crônica e úlceras pépticas. Esses pesquisadores acreditavam que a bactéria referida pertencia ao gênero *Campylobacter*. (MARSHALL, 1984; GOODWIN, ARMSTRONG 1990).

Em 1989 foi realizado o sequenciamento do RNA do *Campylobacter pylori*; sendo associado às técnicas de biologia molecular, à caracterização de proteínas e lipídios da parede celular, à caracterização sorológica e análise das propriedades bioquímicas, demonstrando que esta espécie não pertencia ao gênero *Campylobacter*, sendo necessário reclassificá-la para um novo gênero, o *Helicobacter*, adequando a classificação taxonômica do microrganismo para *Helicobacter pylori*. (GOODWIN et al., 1989; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2006).

Antes do primeiro isolamento da bactéria e sua documentação, a comunidade médica da época não reconhecia a bactéria *H. pylori* como um agente responsável por potencializar e/ou contribuir para o aparecimento de úlceras estomacais e gastrites, pois acreditava-se que o estômago fosse um ambiente estéril, devido a sua acidez, impossibilitando que este fosse nicho ecológico de qualquer organismo. (GUZMÁN, 2006; TORTORA, FUNKE, CASE, 2000). No entanto o *H. pylori* é totalmente adaptado ao estômago humano, seu principal reservatório, tornando-se alvo de incontáveis pesquisas e estudos microbiológicos, histológicos, epidemiológicos, imunológicos, ecológicos e clínicos. (LAMBERT et al., 1995; VAZ, ZATERKA, 2005).

2.2 ASPECTOS GERAIS DO *H. PYLORI*

O *H. pylori* é provavelmente o agente de infecção crônica mais comum em seres humanos e é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico. (YAMAOKA, 2012; PASECHNIKOV et al., 2014). Este coloniza especificamente a mucosa gástrica e as microvilosidades gástricas das células epiteliais e acredita-se que contribua diretamente na destruição da célula gástrica por produção de citotoxinas e enzimas tóxicas, desregulando os fatores defensivos do epitélio. (VAZ; ZATERKA, 2005).

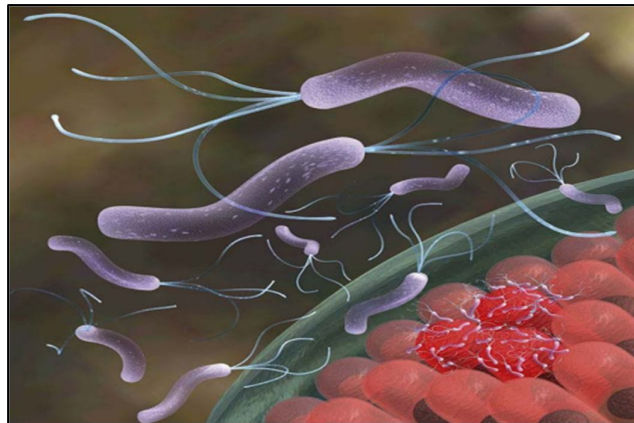


Figura 1 - *H. pylori* invadindo as células epiteliais do estômago e duodeno.

Fonte: DAVIDSON (2010).

Em 1994, *H. pylori* foi classificado como um carcinógeno de classe I pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo a própria OMS, 550.000 novos casos por ano de câncer de estômago são atribuídos ao *H. pylori*, o que corresponde a aproximadamente 55% dos casos de neoplasias. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Desta forma, cepas diferentes da bactéria com padrões de virulência distintos, atuam de forma diferenciada no hospedeiro, levando a distintos graus de inflamação da mucosa do estômago, incluindo a produção de urease, a citotoxina vacuolizante e a presença de flagelos. (THOMAZINI et al., 2006).

A colonização da bactéria no tecido gástrico é quase sempre acompanhada por processo inflamatório agindo como resposta imunológica do corpo frente à bactéria. Com o tempo a inflamação vai se estendendo, resultando na redução da secreção e, às vezes, na perda de células parietais, causando atrofia gástrica. Em

conseqüência disso, a inflamação pode passar de gastrite superficial para câncer gástrico. (SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

A infecção pelo *H. pylori* é normalmente adquirida na infância, e uma vez estabelecida, pode persistir durante toda a vida do hospedeiro, se não proceder a sua erradicação com antibióticos e a cronicidade desta infecção pode levar ao desenvolvimento das doenças gástricas mais severas, aparecendo as manifestações clínicas normalmente na idade adulta. (PORTAL-CELHAY; PEREZ-PEREZ, 2006).

2.3 MORFOLOGIA

O *H. pylori* é um bacilo, apresenta uma forma helicoidal, gram negativo, microaerófilo, curvo e espiralado; mede em torno de 2,4 a 4,0 μm de comprimento e 0,5 a 1,0 μm de largura, apresenta de dois a seis flagelos unipolares que atravessam a parede celular e estão ligados à membrana citoplasmática por um disco basal. Na extremidade, os flagelos apresentam uma forma de bulbo bastante característica e são constituídos por uma unidade central envolvida por uma bicamada fosfolipídica que os protege da acidez gástrica. (BROWN, 2000; VAZ, ZATERKA, 2005).

Em condições de stress físico ou químico o *H. pylori* pode apresentar uma forma cocóide com um tamanho variável entre 0,8 a 1,0 μm e não cultivável *in vitro*. Estas formas também possuem flagelos unipolares, e apesar de não serem cultiváveis, mantêm aparentemente a capacidade de sintetizar DNA. (MARSHALL, WARREN, 1984; ALARCÓN, DOMINGO, LÓPEZ-BRES, 1999).

2.4 *H. pylori* E CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico é a segunda causa mais comum de morte por câncer no mundo e quase dois terços dos casos ocorrem em países em desenvolvimento. (YAMAOKA, 2012; PASECHNIKOV et al., 2014).

A maioria dos casos de câncer gástrico estão relacionados à infecção por *H. pylori*, sendo este o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença, com uma estimativa conservadora de 74,7% de todos os carcinomas gástrico não-cárdia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) havia classificado em 1994 o *H. pylori* como carcinógeno de classe I e recentemente isso tem sido reforçado, pela Agência

Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC). (PASECHNIKOV et al., 2014).

Após a infecção pelo *H. pylori*, ocorre ativação de múltiplas vias intracelulares em células epiteliais, tais como MAPK, NF-κB, ativador de proteína (AP) -1, Wnt/β-catenina, PI3K, transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3 (STAT3), ciclooxigenase 2, que afetam as funções celulares tendo como consequência a produção elevada de citocinas inflamatórias, alteração das taxas de apoptose, proliferação e diferenciação de células epiteliais, e mais importante, resultam na transformação oncogênica de células epiteliais. (CAO et al., 2014; CHIURILLO et al., 2013). Os fatores de virulência como o *cagA*, *vacA*, *dupA* e as proteínas de membrana externa (OMPs), são responsáveis por muitos destes efeitos. O *H. pylori* induz alterações epigenéticas, como a metilação do DNA e a modificação das histonas, que são importantes na transformação oncogênica. (DING; GOLDBERG; HATAKEYAMA, 2010).

2.5 EPIDEMIOLOGIA E ROTAS DE TRANSMISSÃO DO *H. pylori*

A gastrite por *H. pylori* é uma das infecções mais comuns entre os seres humanos, comprometendo cerca da metade da população mundial, sendo mais frequentemente adquirida na infância e em países em desenvolvimento. (BATESON, 2006). A bactéria é cosmopolita, sendo, portanto, encontrada em habitantes dos cinco continentes. (FOX; WANG, 2002). O baixo nível socioeconômico e suas consequências naturais, como condições de higiene precárias, aglomeração nas moradias e ausência ou deficiência de saneamento básico, são fatores que favorecem a aquisição da bactéria. (BROWN, 2000).

O modo de transmissão do *H. pylori* é incerto, nenhuma única via tem sido claramente identificada. O contato pessoa a pessoa é considerado a mais provável, quer seja por via oral-oral, gástrica-oral ou oral fecal. (WEYERMANN et al., 2006). Porém, a infecção por vegetais e/ou água contaminada e transmissão zoonótica também tem sido sugerida, principalmente nas populações servidas por água municipal. (STONE, 1999; KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002).

A prevalência da infecção por *H. pylori*, nos adultos, é superior a 80% na maioria dos países em desenvolvimento e varia entre 20 e 50% nos países desenvolvidos. (SUERBAUM, MUCHETTI, 2002; KASPER et al., 2008).

Em estudos realizados no Brasil as prevalências encontradas foram: 59,5% no Rio de Janeiro (RJ); 76,3% em São Paulo (SP); 83% em Santa Maria (RS); 84,7% em Nossa Senhora do Livramento (MT); 85,18% em Botucatu (SP); 87% em Araçuaí (MG); 89,6% em Campinas (SP) e 96% em São Luís (MA). (LADEIRA, 2003). Em uma pesquisa feita no estado de São Paulo foi observado que a prevalência do *H. pylori* em adultos é de 65,6%; apresentando correlação com a raça, idade, exame endoscópico prévio, áreas populosas, tipo de água, falta de saneamento durante a infância, baixa renda e educação. (VERGUEIRO et al., 2008).

No Brasil, há poucos estudos avaliando a prevalência da infecção em crianças. Um estudo realizado na periferia de Fortaleza e na área rural de Melquíades (MG), sugere que as taxas de prevalência da infecção entre as crianças são superiores a 56,8%, e deve-se salientar que atingem 75,4% nas crianças entre 12 e 14 anos de idade. (ROCHA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004).

A prevalência é ainda mais elevada em populações ribeirinhas e indígenas de Rondônia, onde atinge o percentual de 83,1%. (CUNHA et al., 2003). Cálculos de incidência mostram que a infecção é adquirida muito precocemente nas regiões menos favorecidas do país, podendo atingir até 25,0% de crianças de até 2 anos de idade. (ROCHA et al., 2003; CUNHA et al., 2003). Por outro lado, em países desenvolvidos, a infecção ocorre em apenas 10% das crianças abaixo dos 10 anos de idade, e um declínio acentuado da prevalência vem sendo verificado. (EVERHART, 2000).

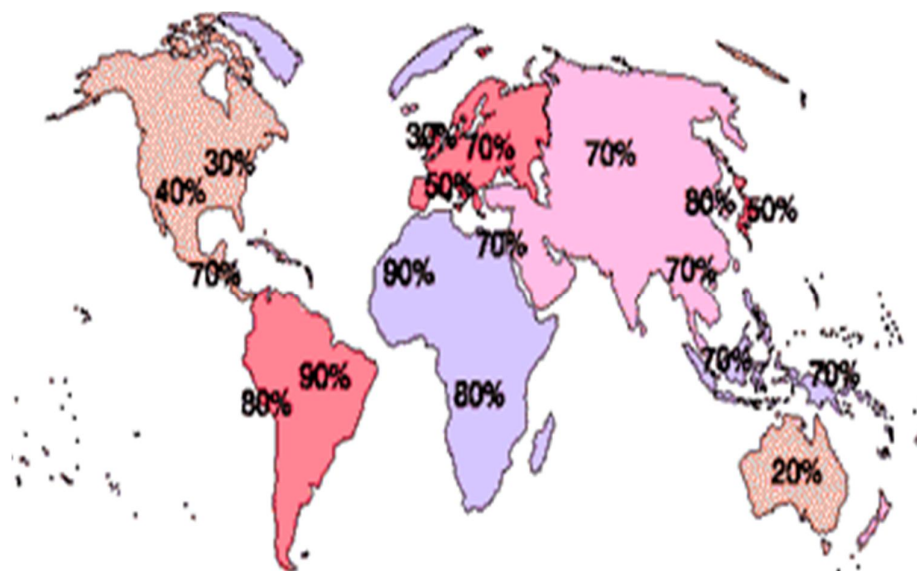


Figura 2 – Distribuição mundial da infecção pelo *H. pylori*
 Fonte: Comparative Bioinformatics Services (2011)

2.5.1 Transmissão por via oral-oral e gastro oral

Na contaminação oral-oral, a cavidade bucal tem sido proposta como reservatório de infecção e reinfecção pela *H. pylori*. A regurgitação do suco gástrico pode contaminar a boca, predispondo a colonização por essa bactéria por tempo indeterminado. Dentre as principais fontes de infecção oral incluem a saliva, a placa dental, o conteúdo do refluxo gástrico e o vômito. (BROWN, 2000).

2.5.2 Transmissão por via fecal-oral

Já na contaminação fecal-oral, o isolamento da bactéria das fezes em meios de cultura foi realizado por vários pesquisadores do mundo todo, sugerindo assim uma possível via de transmissão. (BLASER, ATHERTON, 2004; BATESON, 2006). No entanto o isolamento da bactéria das fezes é dificultado pela necessidade de utilização de fezes não armazenadas por longos períodos para a obtenção de melhores resultados. (BROWN, 2000).

2.5.3 Transmissão iatrogênica ou gastro-gástrica

O material clínico que contém o *H. pylori* utilizado para procedimentos diagnósticos realizados por via endoscópica pode servir como uma fonte de infecção. Mesmo com procedimentos de desinfecção, instrumentos utilizados durante biópsia por via endoscópica também são a causa de infecções. (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002).

2.6 VIRULÊNCIA DO *H. pylori*

Como citamos anteriormente o *H. pylori* infecta cronicamente a mucosa gástrica humana, o que pode contribuir no desenvolvimento das doenças pépticas. Os fatores que contribuem para colonização e persistência da bactéria estão

inerentemente relacionados com a virulência do *H. pylori*. A resistência ao ácido gástrico, a motilidade e a adesão são processos fundamentais para a colonização das células epiteliais gástricas. A afinidade do *H. pylori* pelas células mucíparas gástricas deve-se à composição neutra do muco gástrico, diferente dos mucopolissacarídeos ácidos produzidos pelas células caliciformes da metaplasia intestinal. (QUEIROZ; MENDES, 1993).

Sua capacidade de aderir à mucosa gástrica propriamente dita por meio de adesinas é uma forma da bactéria não ser eliminada pelo peristaltismo gástrico e, assim, poder provocar inflamação (gastrite) e colonizar focos de metaplasia gástrica no duodeno, promovendo inflamação (duodenites) e facilitando a ulceração da mucosa duodenal. (TRABULSI, 2002; CLYNE, DOLAN, REEVES, 2007).

A potente atividade de secreção ureásica desempenha papel fundamental na sobrevivência da *H. pylori* em meio ácido. A urease que é liberada hidrolisa a uréia presente no estômago produzindo íons amônia e CO₂. (VOLAND et al., 2003). Os íons de amônia alcalinizam o ácido do estômago nas proximidades da bactéria, fato que possibilita a sua multiplicação. (HARVEY et al., 2008). A atividade citotóxica da amônia aumenta a permeabilidade das células epiteliais para prótons, desta forma podendo contribuir como mediador de resposta imunológica no local, pois é um potente ativador de macrófagos *in vitro*. (GOBERT et al., 2002).

Os flagelos propiciam a locomoção da bactéria através da mucosa gástrica até alcançar o pH mais alcalino abaixo da mucosa. Essa propriedade também serve como defesa da bactéria contra as contrações que regulam o estômago vazio. (AGUILAR, AYALA, FIERROS-ZÁRATE, 2001).

O *H. pylori* também é protegido pela produção de enzimas, sintetizadas pela bactéria, tais como superóxido dismutase, catalase e arginase, que conferem proteção contra as atividades de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro. (MURRAY et al., 2006). Além disso, fatores genéticos da bactéria parecem estar relacionados ao prognóstico do hospedeiro, grau de infecção e inflamação gástrica. (MARIE, 2012).

O conhecimento das características genéticas do *H. pylori* tem permitido compreender que as espécies podem diferir em virulência, aumentando o risco à doença gástrica. Dentre os marcadores de patogenicidade do *H. pylori* podemos citar os genes: *cagA* (*cytotoxin associated gene A*), o *vacA* (*vacuolating cytotoxin*), o *babA* (*blood group antigen-binding adhesin*) e o *iceA* (*induced by contact with*

epithelium) e o mais recente *dupA* (*duodenal ulcer promoting gene*). (RASMUSSEN et al., 2013).

2.6.1 Gene *vacA* (Citotoxina Vacuolizante A)

O gene *vacA* é considerado um importante fator de virulência do *H. pylori* na patogênese da ulceração péptica e do câncer gástrico. Este gene codifica a produção de uma citotoxina vacuolizante conhecida como *vacA*. A atividade protéica da *vacA* envolve múltiplas atividades celulares, incluindo vacuolização da célula, formação de canais da membrana, liberação do citocromo C levando a apoptose, interrupção das funções endossomais e lisossomais e imunomodulação. (DEBELLIS et al., 2001; SHIOTA, SUZUKI, YAMAOKA, 2014).

O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori*, e compreende duas partes variáveis, conhecidas como região “s” e região “m”. A região “s” do gene *vacA* é responsável por codificar o peptídeo sinal e está localizado na extremidade 5' do gene e pode se apresentar como alelos “s1” e/ou “s2”. (CHIOZZI et al., 2009; SIDDIQUE et al., 2014). A região “m”, localizada na região mediana do gene, pode apresentar como alelos “m1” e/ou “m2”. O alelo s1 se relaciona com a produção de citotoxina e o alelo m1 a produção de maior quantidade de proteína. Dessa forma, linhagens bacterianas classificadas como s1/m1 estão envolvidas com produção de altos níveis de citotoxina de vacuolização e linhagens tipo s1/m2 estão associadas com produção de médios níveis de toxina. No entanto, as linhagens classificadas como s2/m2 induzem a produção de baixos níveis ou até mesmo associam-se a nenhuma produção de citotoxina de vacuolização. As cepas *vacA* do tipo s1/m1 parecem ser mais patogênicas que as s2/m2, sendo mais relacionadas à úlcera péptica e câncer gástrico. (VAN-DOORN et al., 1998; ATHERTON et al., 1999).

Gene vacA - Diversidade Alélica

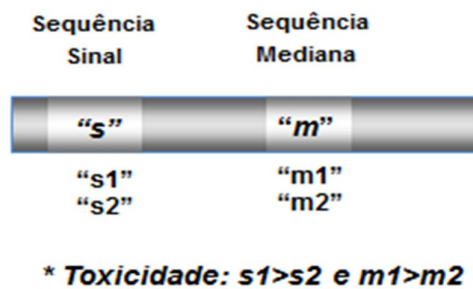


Figura 3 - Diversidade alélica do gene *vacA*.
Fonte: Elaborada pelo autor.

2.6.2 Gene *cagA* (Citotoxina - Associada A)

O primeiro gene específico identificado no *H.pylori* foi o gene *cagA* (cytotoxina-Associada A), este gene está diretamente relacionado a doenças gástricas sendo o mais patogênico fator de virulência expresso pelo *H. pylori*. Está presente em 50-70% das cepas de *H. pylori*, codifica uma proteína imunodominante de alto peso molecular, 120-140 KDa. (COVACCI et al., 1993). Localizado em uma região denominada ilha de patogenicidade cromossômica (*Cag PAI*) de aproximadamente 40kb, compreende diversos genes que podem transcrever entre 27 e 30 proteínas. (RASMI, RAEISI, SEYYED MOHAMMADZAD, 2012)

A proteína *cagA* do *H. pylori* atua como antígeno altamente imunogênico. Essa proteína é injetada na célula hospedeira, via sistema de secreção do tipo IV, induzindo alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas que estimulam a célula a se espalhar e se alongar de maneira idêntica a produzida pelo fator de crescimento de hepatócitos da célula hospedeira. (CRABTREE et al., 1999).

Vários genes, localizados na ilha de patogenicidade *cag PAI* codificam proteínas que aumentam a produção de interleucinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL -1 β) e interleucina -8 (IL -8) pelo epitélio gástrico, assim o gene *cagA* é encontrado com freqüência em pacientes que apresentam altos títulos de anticorpos anti-cag e que apresentam uma intensa resposta inflamatória gástrica aumentando significativamente o risco do desenvolvimento de gastrites, úlceras

pépticas, atrofia gástrica e câncer gástrico. (LADEIRA, SALVADORI, RODRIGUES, 2003; RASMI, RAEISI, SEYYED MOHAMMADZAD, 2012).

2.6.3 Gene *dupA* (Gene promotor de úlcera duodenal)

Atualmente, a associação entre *H. pylori* e úlcera péptica está definitivamente comprovada. Em 2005, LU et al. identificaram um gene bacteriano associado à úlcera duodenal, nomeado de *dupA*.

De acordo com SHIOTA (2014), e colaboradores o gene *dupA* é o primeiro fator genético do *H. pylori* detectado a ser associado com uma susceptibilidade diferencial de úlcera duodenal e câncer gástrico e, portanto, pode ser considerada como um marcador de virulência específicos da doença.

As cepas portadoras do gene *dupA* estão presentes em aproximadamente 42% das úlceras duodenais e em apenas 21% dos pacientes com gastrite, apresentando-se como um novo marcador de risco para úlcera duodenal e de risco reduzido para câncer gástrico. Os resultados dos ensaios clínicos são ainda mais significativos, demonstrando que a erradicação de *H. pylori* pode promover a cura da úlcera péptica. (ARKKILA et al., 2005).

O marcador de virulência, *dupA*, está localizado na região de plasticidade do genoma do *H. pylori* e é composto por 2 genes: Jhp0917 e Jhp0918 que formam uma abertura para a leitura contínua da sequência, através da inserção de uma base T ou C após a posição 1385 na região 3' do gene Jhp0917. (Lu et al., 2005).

A função do *dupA* ainda é desconhecida, mas há relação com a absorção de DNA durante a transferência do material genético em conjugação bacteriana, divisão da célula e transferência de proteínas. (LU et al., 2005)

Similarmente ao observado para outros marcadores de virulência, a presença do gene *dupA* em cepas de *H. pylori* e sua associação com doenças variam consideravelmente, dependendo a população estudada e as áreas geográficas do mundo. No Brasil há poucos estudos que detectam a presença do gene *dupA*, tornando essa abordagem extremamente original e interessante no entendimento da etiologia das doenças gástricas. (ZHANG et al., 2008; HUSSEIN et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Considerando amostras de biópsia gástrica coletadas de crianças e adultos, com sintomas pépticos, o presente trabalho, teve como objetivos:

- a) Caracterizar o marcador de patogenicidade *dupA* do *Helicobacter pylori*, por meio da técnica de PCR;
- b) Associar os alelos do gene *vacA* e a presença do gene *cagA*, previamente detectados, á presença do gene *dupA*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas um total de 205 amostras, sendo: 105 amostras de pacientes adultos, (média de idade: 47.8 ± 14.3 e 57♂/48♀), e 100 de pacientes pediátrico,(média de idade: 10.9 ± 3.7 e 41♂/59♀) todos positivos para a infecção pelo *H. pylori*.

É importante destacar que o presente projeto faz parte do projeto de auxílio a pesquisa “*Caracterização do Marcador de Patogenicidade dupA, do Helicobacter pylori, Genotipagem e Análise da Expressão dos Genes do Fator de Necrose Tumoral e E-caderina em Amostras de Crianças e Adultos com Sintomas Pépticos*” aprovado recentemente pela FAPESP (2012/18333-3), o qual também foi aprovado pelo Comitê de Ética Local (parecer nº 086/12).

4.1 AMOSTRA DE DNA

Todas as amostras foram coletadas e submetidas à extração de DNA, para o diagnóstico e genotipagem do *H. pylori* pela técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction). As referidas amostras foram provenientes de pacientes com dor abdominal da cidade de Marília e região, atendidos no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília, submetidos à endoscopia digestiva alta e que não receberam drogas quimioterápicas, antiparasitárias ou antibióticos nos últimos 30 dias.

4.2 COLETA DO MATERIAL, EXTRAÇÃO DE DNA, DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM DO *H. pylori*

O estudo em questão foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Marília, sob coordenação do Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão.

É importante destacar que o Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Marília apresenta implantado e padronizado há anos o serviço de Coleta de Biópsia Gástrica, Extração de DNA, Diagnóstico e Genotipagem do *H. pylori* pela PCR. Desta forma o Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Marília forneceu todas as amostras de DNA além do diagnóstico e genotipagem

dos marcadores de patogenicidade *cagA* e *vacA* do *H. pylori*, assim a coleta do material, extração de DNA e diagnóstico do *H. pylori* não serão descritos no presente estudo, porém todos os detalhes estão descritos na literatura em artigos publicados pelo nosso grupo de pesquisa. (GATTI et al., 2006; RASMUSSEN et al., 2010; RASMUSSEN et al., 2013). Vale ressaltar, que as amostras foram fornecidas, e todas positivas para o *H. pylori*, de forma randomizada e blindada na qual os pesquisadores do presente projeto tiveram acesso às informações de cada amostra apenas após a conclusão do projeto.

4.3 DETECÇÃO DO FATOR DE VIRULÊNCIA DO *H. pylori*, Gene *dupA*

A detecção do gene *dupA* foi realizada através da técnica da PCR, utilizando o par de *primers*: *sense* 5', - CGTGATCAATATGGATGCTT – 3' e o *antisense* 5'- 'TCTTTCTAGCTTGAGCGA -3' descritos por GOMES et al., (2008), o qual amplifica um fragmentos de 197pb referente ao gene em questão (Figura 1). Controles negativo e positivo foram incluídos em todos os experimentos. As condições de amplificação para a reação da PCR foram de 35 ciclos de amplificação, onde cada ciclo consistiu de 45 segundos de desnaturação a 94° C, 45 segundos de associação a 53 °C e 45 segundos de extensão a 72° C.

Os fragmentos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2,0%, documentados e analisados através do sistema de captura e análise de imagens *Alpha Imager 2000* (Alpha Innotech Corporation) (Figura 4).

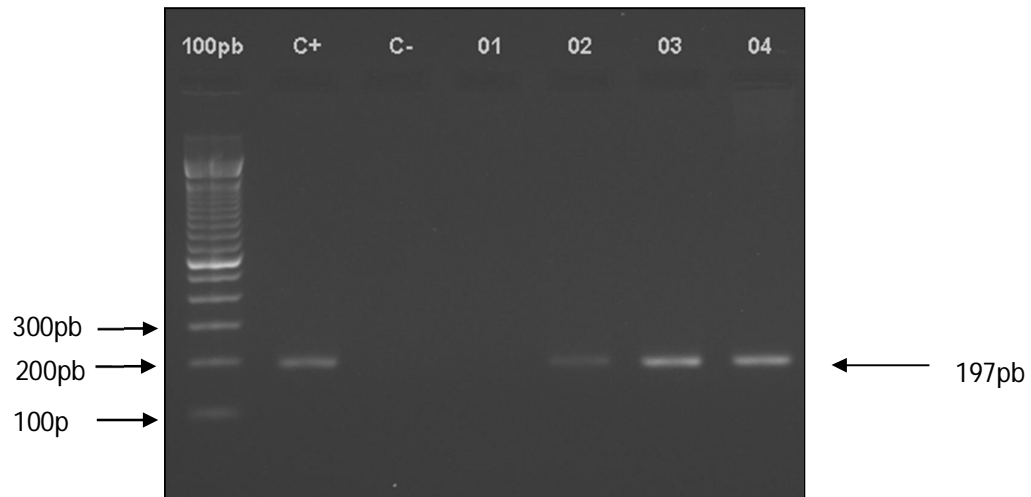


Figura 4 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para visualização do fragmento de 197pb referente à presença do gene *dupA*. Slot 1: Ladder 100pb; Slot 2 e 3: Controles positivo e negativo, respectivamente; Slot 4: Amostras negativa para a detecção do gene *dupA*; Slot 5, 6 e 7: Amostras positivas para o gene *dupA*.
 Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As associações entre os marcadores de patogenicidade foram analisadas pelos testes: χ^2 com correção de Yates e/ou Exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SPSS®, versão 20.0 e consideradas estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DO GENE *dupA*

Foram analisadas um total de 205 amostras de biópsias gástricas de pacientes adultos e pediátricos, todas positivas para a infecção pelo *H. pylori*, o gene *dupA* foi detectado em 85 (41,5%) amostras, destas, 105 são provenientes de pacientes adultos nas quais o gene *dupA* foi detectado em 48 (45,7%), amostras; entre os 100 pacientes pediátricos estudados, o gene *dupA* foi encontrado em 37 amostras (37%). (Tabela 1).

A análise histopatológica foi realizada em 154 (75,13%) pacientes (99 adultos e 55 pediátricos) e revelou a presença de gastrite crônica em 144 (93,5%) (97 adultos e 47 pediátricos), sendo que apenas 10 (6,5%) pacientes (2 adultos e 8 pediátricos) apresentavam a mucosa gástrica normal.

Tabela 1 - Detecção do marcador de patogenicidade do *Helicobacter pylori*, gene *dupA* em amostras de pacientes adultos e pediátricos.

Pacientes	N (%)	<i>dupA</i> Positivo	<i>dupA</i> Negativo
Adultos	105 (100%)	48 (45,7%)	57 (54,3%)
Pediátricos	100 (100%)	37 (37,0%)	63 (63,0%)
Total	205 (100%)	85 (41,5%)	120 (58,5%)

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 PRESENÇA DO GENE *cagA* E ALELOS DO GENE *vacA*

Em relação à presença dos outros marcadores de patogenicidade do *H. pylori*, o gene *cagA* foi detectado em 51 (48,57%) das 105 amostras de pacientes adultos e em 47 (47%) das 100 amostras de pacientes pediátricos. Em relação ao gene *vacA*, em amostras de adultos, a combinação alélica mais virulenta, s1/m1 foi detectado em 58 (55,23%) pacientes, por outro lado o alelo s2/m2 foi encontrado em 33 (31,42%) indivíduos, outras combinações, s1/m2 e s1/s2/m1/m2 foram encontradas em 14 pacientes (13,33%) (Tabela 2).

Quanto às amostras de crianças, o genótipo s1/m1 foi detectado em 45 (45%) amostras, por outro lado o genótipo s2/m2 foi encontrado em 42 (42%) indivíduos,

outras combinações s1/m2, s2/m1e s1/s2/m1/m2, foram encontradas em 13 pacientes (13%).

A análise histopatológica foi realizada em um total de 166 pacientes, destes 166 pacientes, 153 apresentavam gastrite crônica e 13 apresentavam a mucosa gástrica normal.

Tabela 2 - Distribuição do gene *dupA*, *cagA* e genótipos do gene *vacA* em amostras de pacientes adultos e pediátricos com gastrite crônica e mucosa normal (GC: Gastrite Crônica e MN: Mucosa Normal).

Genes	N	Amostras De		Histopatológico			
				GC		MN	
				Total	Adultos	Crianças	Adultos
<i>cagA</i> +	98	51	47	47	26	1	4
<i>cagA</i> -	107	54	53	48	32	1	7
<i>dupA</i> +	85	48	37	44	26	1	2
<i>dupA</i> -	120	57	63	51	32	1	9
<i>s1/m1</i>	103	58	45	54	26	2	4
<i>s2/m2</i>	75	33	42	28	26	0	4
<i>s1/m2</i>	17	10	7	10	4	0	2
<i>s2/m1</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>s1/s2/m1/m2</i>	9	4	5	3	2	0	1
Total	205	105	100	153	13		

Fonte: Elaborado pela autora.

Notas: Sinais utilizados:

GC: Gastrite Crônica

MN: Mucosa Normal

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE PATOGENICIDADE: GENES *dupA*, *cagA* e *vacA*

A análise estatística revelou uma associação estatisticamente significativa entre o gene *dupA* e o gene *cagA* ($p=0.0003$, risco relativo (RR) 1.73 e intervalo de confiança [CI]=1.3–2.3). Uma segunda associação estatisticamente significativa foi observada entre o gene *dupA* e o genótipo s1/m1 do gene *vacA* ($p=0.0001$, RR: 1.72

and CI: 1.3–2.2). Como esperado o gene *cagA* também foi associado aos alelos s1/m1 do gene *vacA* (Tabela 3).

Vale ainda salientar que a combinação dos marcadores de patogenicidade genes *dupA+*/*cagA+*/s1/m1 foi encontrada em 47 amostras revelando uma possível associação entre os principais marcadores.

É importante destacar que os resultados mencionados acima foram obtidos quando analisadas todas as 205 amostras simultaneamente (pacientes adultos e pediátricos) porém, as mesmas associações foram encontradas quando os grupos foram analisados separadamente.

Tabela 3 - Associação entre os marcadores de patogenicidade do *H. pylori*, gene *dupA*, *cagA* e genótipo do gene *vacA* em amostras de pacientes com sintomas pépticos.

Genes	<i>cagA</i>		<i>vacA</i>			<i>total</i>
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>s1/m1</i>	<i>s2/m2</i>	<i>outros</i>	
<i>dupA</i>						
<i>Positivo</i>	54*	31	59*	19	7	85
<i>Negativo</i>	44	76	44	56	20	120
Total	98	107	103	75	27	205

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: *Associação estatisticamente significativa

6 DISCUSSÃO

O *H. pylori* apresenta uma grande diversidade genética e foi na região de plasticidade do genoma do *H. pylori*, que o gene *dupA* foi descrito. Primeiramente, o gene *dupA* foi associado ao desenvolvimento de úlceras duodenais e considerado um fator protetor contra o câncer gástrico. (Lu et al., 2005). Entretanto estes resultados são controversos e podem variar de acordo com a população e principalmente com a área geográfica estudada.

Estudando pacientes com sintomas pépticos, da cidade de Marília e região, atendidos pelo Sistema Único de Saúde o presente estudo detectou o gene *dupA* em 85 (41,5%) pacientes, sendo 48 (23,4%) adultos e 37 (18,1%) crianças. Contrariando nossos resultados, Gomes et al., (2008) relataram uma alta frequência do gene *dupA* e reportam sua presença em 89,46% e 100% dos pacientes adultos e pediátricos estudados, respectivamente. É importante destacar que para a detecção do gene *dupA*, utilizamos *primers* específicos para cepas brasileiras e descritos por Gomes et al., (2008) porém, os resultados distintos podem ser, em parte, explicados pela heterogenia populacional, área geográfica estudada e/ou perda de material genético ou rearranjos na zona de plasticidade do genoma do *H. pylori*.

Arachchi e colaboradores (2007), estudando a população Indiana, detectaram o gene *dupA* em 37,5% dos pacientes com úlcera duodenal e em 22,9% dos pacientes com sintomas pépticos. Resultados similares foram encontrados por Zhang et al., (2008) e Wang et al., (2013) que diagnosticaram o gene *dupA*, em 35,3% e 31%, respectivamente. Ambos os autores, Arachchi et al., (2007) e Zhang et al., (2008), revelaram uma associação entre a presença do gene *dupA* e úlcera duodenal, resultado não observado em relação ao câncer gástrico e gastrite. Wang (2013) e colaboradores associaram a presença do gene *dupA* com resultados clínicos mais graves e um pior prognóstico.

Recentemente, Imagawa et al., (2010), revelaram que pacientes infectados por cepa *dupA* positiva apresentam uma maior secreção de ácido gástrico, além disso Abadi et al., (2012) concluíram que cepas *dupA* positivas são mais resistentes à acidez estomacal e adaptadas ao microambiente ácido, contribuindo para o desenvolvimento de úlceras.

Shiota (2012) e colaboradores estudaram 142 pacientes e não verificaram associação entre o *dupA* e doenças gastrointestinais, sua meta-análise confirmou a

importância do gene *dupA* na formação de úlceras duodenais, especialmente em países asiáticos.

Em relação a presença do gene *cagA*, nossos resultados confirmam estudos anteriores com 47,8% de positividade. (GATTI et al., 2006, GOMES et al., 2008, GONÇALVES et al., 2013; GATTI et al., 2003; RASMUSSEN et al., 2012). Outro resultado interessante foi a associação entre a presença dos genes *dupA* e *cagA*, em pacientes adultos e pediátricos com gastrite. Arachchi et al., (2007) e Gomes et al., (2008) encontraram resultados semelhantes porém apenas em pacientes com úlcera duodenal.

Também encontramos uma importante associação entre a presença do gene *dupA* e o genótipo mais virulento do gene *vacA*, s1/m1. Resultados que vão ao encontro dos relatados por Arachchi et al., (2007) que associaram o gene *dupA* com os alelos s1 e m1 separadamente. Interessantemente, cepas *H. pylori dupA* positivo, *cagA* positivo e genótipos s1/m1 do gene *vacA* foram encontrados em 47 (23%) pacientes. Arachchi et al., (2007) encontrou esta mesma associação, porém, em apenas três pacientes com sintomas pépticos.

Marie (2012), observou em seu estudo, uma correlação entre o genótipo s1/m1 do gene *vacA* e úlcera péptica, além da associação entre os alelos s1/m1 e a presença do gene *cagA*, associação também observada em nosso estudo.

No entanto, nosso estudo apresenta algumas limitações. Os pacientes estudados apresentavam apenas gastrite e seria interessante reproduzir o estudo em pacientes com úlceras e câncer gástrico. Outro aspecto relevante é que o gene *dupA* foi detectado pela PCR, demonstrando a presença dos genes *jhp0917* e *jhp0918*. Queiroz, et al. (2011) sugerem que apenas a presença destes genes pode não ser suficiente para caracterizar o gene *dupA* funcional, assim a utilização de outras ferramentas molecular seria interessante.

Nossos resultados demonstram que o gene *dupA* apresenta uma alta prevalência na região estudada e pode ser considerado um marcador de virulência importante, mas são necessários mais estudos, para afirmar que é um marcador doença-específica. Em adicional, as associações encontradas representam uma nova informação que sugerem uma íntima relação entre os marcadores de patogenicidade e o desenvolvimento de doenças gástricas mais severas.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o gene *dupA* tem moderada frequência em pacientes brasileiros e foi associado com o gene *cagA* e o com o genótipo s1/m1 do gene *vacA*, e é considerado um importante fator de virulência no desenvolvimento de doenças gástricas em pacientes adultos e pediátricos.

REFERÊNCIAS

- ABADI, A. T. et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains lacking dupA is associated with an increased risk of gastric ulcer and gastric cancer development. **Journal Of Medical Microbiology**, Edinburgh, Livingstone. v. 61, p. 23-30, jan., 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Infection+with+Helicobacter+pylori+strains+lacking+dupA+is+associated+with+an+increased+risk+of+gastric+ulcer+and+gastric+cancer+development>>. Acesso em: 13 maio 2013.
- AGUILAR, G. R.; AYALA, G.; FIERROS-ZÁRATE, G. *Helicobacter pylori*: recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. **Salud pública de México**, Cuernavaca, v. 43, n. 3, p. 237-247, may./jun. 2001. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452701>>. Acesso em 14 jun. 2013.
- ALARCÓN, T.; DOMINGO, D.; LÓPEZ-BRES, M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 12, p. 19-26, jun./out. 1999. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857999000515#>>. Acesso em: 15 maio 2013.
- ARACHCHI, H. S. et al. Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (dupA) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population. **Helicobacter**, Malden, v. 12, n. 6, p. 591-597, dez. 2007. Disponível em:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1523-5378.2007.00557.x/abstract>>. Acesso em: 17 maio 2013.
- ARKKILA, P.E. et al. *Helicobacter pylori* eradication as the sole treatment for gastric and duodenal ulcers. **European Journal of Gastroenterology And Hepatology**, London, v. 17, n. 1, p. 93-101, jan. 2005. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Helicobacter+pylori+eradication+as+the+sole+treatment+for+gastric+and+duodenal+ulcers>>. Acesso em 16 maio 2013.
- ATHERTON, J.C. et al. Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 9, p. 2979-2982, 1999. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85427/>>. Acesso em: 18 jun 2013.
- BATESON, M.C. Current concepts in medicina: *Helicobacter pylori*. **Journal of postgraduate medicine**, Bombay, v. 76, p. 141-144, 2006. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1118119/>>. Acesso em: 19 maio 2013.
- BIZZOZERO, G. Sulle ghiandole tubulari del tubo gastro-enterico e sui rapporti del loro epitelio coll'epitelio di revestimento della mucosa. **Atti della Reale Accademia delle Scienze di Torino**, Norfolk, p. 28:233, 1892. Disponível em:
<http://books.google.com.br/books?id=2I_wwiNoilcC&pg=PA6&lpg=PA6&dq=.+Sulle+ghiandole+tubulari+del+tubo+gastroenterico+e+sui+rapporti+del+loro+epitelio+coll+%E2%80%99epitelio+di+revestimento+della+mucosa&source=bl&ots=UNiAs2kNPV&sig=HkG2peyhqzQIV1-J763XDikEpyA&hl=pt->

BR&sa=X&ei=lcRSUu3uM4OQ9QSvw4DADA&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q=.%20Sulle%20ghiandole%20tubulari%20del%20tubo%20gastroenterico%20e%20sui%20rapporti%20del%20loro%20epitelio%20coll%E2%80%99epitelio%20di%20revestimento%20della%20mucosa&f=false>. Acesso em 20 jul 2013.

BLASER, M.J.; ATHERTON, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 113, n.3, p. 321-333, 2004. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/20925>>. Acesso em: 15 maio 2013.

BROWN, L.M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 22, n. 2, p. 283-297, 2000. Disponível em: <<http://epirev.oxfordjournals.org/content/22/2/283.long>>. Acesso em: 21 abr. 2013.

CAO, Q. et al. Progressive genomic convergence of two *Helicobacter pylori* strains during mixed infection of a patient with chronic gastritis. **BMJ Open Gastroenterology**. Jul., 2014. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/content/early/2014/07/31/gutjnl-2014-307345.long>>. Acesso em: 15 set. 2014.

CHIOZZI, V. et al. Relationship between VacA toxin and ammonia in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in human gastric epithelial cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Poland, v. 60, n. 3, p. 23-30, set., 2009. Disponível em: <http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/09_09/pdf/23_09_09_article.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2013.

CHIURILLO, M.A. et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. **International Society for Infectious Diseases**, Barquisimeto, v.17, p. 750-756, set., 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971213001252>>. Acesso em: 14 out 2013.

CLYNE, M.; DOLAN, B.; REEVES, E. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. **FEMS microbiology letters**., Amsterdam, v. 268, p. 135–143, mar., 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17313591>>. Acesso em 25 jun 2013.

CUNHA, R.P. et al. Prevalence and risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in native population from Brazilian Western Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, p. 382-386, jul-ago 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035920303900630>>. Acesso em: 23 jul 2013.

COVACCI, A. et al. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, Washington, v. 90, p. 5791-5795, jun., 1993. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/90/12/5791.full.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2013.

CRABTREE, J. E. et al. Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. **Journal of clinical pathology**. London, UK. v. 52, p. 653-657, set., 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655985>>. Acesso em: 14 jun 2013.

DEBELLIS, L. et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin vacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells. **Gastrointestinal and liver physiology**, Bethesda, v. 281, n. 6, p. 1440-1448, dez., 2001. Disponível em: <<http://ajpgi.physiology.org/content/281/6/G1440>>. Acesso em: 3 abr 2013.

DING, S. Z.; GOLDBERG, J. B.; HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. **Future Oncology**, London, v. 6, n. 5, p. 851–862, Maio, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2882595/>. Acesso em: 23 ago 2014.

EVERHART, J.E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, p. 559-578, set., 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030073>>. Acesso em 12 jul 2013.

FAJARDO, C.A. et al. CagA EPIYA polymorphisms in Colombian *Helicobacter pylori* strains and their influence on disease-associated cellular responses. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, Beijing, v. 5, p. 50-9, mar., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648663/>>. Acesso em 20 jun 2013.

FOX, J. G.; WANG, T. C. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. **Current opinion in gastroenterology**, London, v. 18, p. 15-25, jan., 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17031225>>. Acesso em: 12 jun 2013.

GATTI, L. L. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, iceA and babA2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Tropica**, Basel, p. 232-240, dez., 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X06002178>>. Acesso em 13 jun 2013.

GOBERT, AP. et al. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macro-phage inducible nitric oxide synthase. **Journal of immunology**. Baltimore. v.168, p. 6002-6006, jun., 2002. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/168/12/6002.full.pdf>>. Acesso em: 19 jul 2013.

GOODWIN C.S.; ARMSRONG J.A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**., Berlin, v. 9, n. 1, p. 1-13, jan., 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2406141>>. Acesso em: 23 maio 2013.

GOODWIN, C.S. et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, UK, v. 39, n. 4, p. 397-405, out., 1989. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/content/39/4/397.abstract>>. Acesso em: 24 jun 2013.

GOMES, L. I. et al. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with dupA-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, p. 223-30, abr., 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422107001063>>. Acesso em: 28 maio 2013.

GONCALVES, M. H. et al. *Helicobacter pylori* virulence genes detected by string PCR in children from an urban community in northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, Washington, p. 988-9, mar., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Helicobacter+pylori+virulence+genes+d+etected+by+string+PCR+in+children+from+an+urban+community+in+northeastern+B+rail>>. Acesso em: 10 ago 2013.

GUZMÁN, M. El premio nobel de fisiología y medicina 2005. **Biomédica**, Bogotá, v. 26, n. 1, p. 7-8, mar., 2006. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IisScript=iah/iah.xis&base=LILACS&lang=p>>. Acesso em: 06 jun. 2007.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. *Microbiologia Ilustrada* 2ª Edição 341, 2008.

HUSSEIN, N.R. et al. *Helicobacter pylori* dupA Is Polymorphic, and Its Active Form Induces proinflammatory Cytokine Secretion by Mononuclear Cells. **The Journal of Infectious Diseases**, Cambridge, v. 202 n.2, p. 261–269, jul., 2010. Disponível em: <<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.elsevier-7d3cc913-ca21-3137-a391-f41e01d6b18a>>. Acesso em: 23 jun 2013.

IMAGAWA, S. et al. *Helicobacter pylori* dupA and gastric acid secretion are negatively associated with gastric cancer development. **Journal of medical**, Hiroshima, vol. 59 no. 12 p. 1484-9, 2010. Disponível em: <<http://jmm.sgmjournals.org/content/59/12/1484.long>>. Acesso em 23 abr 2013.

JESUS, N.Z.T. et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel v. 13, n. 3, p. 3203-3228, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317710/>>. Acesso em 13 jun 2013.

KASPER, D. et al. McGraw-Hill Medical Publishing Division. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 17th ed. 2008. New York, 2008.

KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A. M. U., de; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 356-369, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v36n3/10501>>. Acesso em: 21 jun 2013.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000400011>. Acesso em: 23 jun 2013.

LAMBERT, J. R.; LIN, S. K. & ARANDA-MICHEL, J. *Helicobacter pylori*. **Scand J Gastroenterol Suppl**, Oslo, v. 208, p.33-46. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7777803>>. Acesso em: 23 jun 2013.

LU, H. et al. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, Chichester, v.128, n.4, p. 833-848, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3130061/>>. Acesso em: 13 jun 2013.

MARIE, M.A.M.M. Relationship between *Helicobacter pylori* Virulence Genes and Clinical Outcomes in Saudi Patients. **J. Korean. Med. Sci.**, Seoul, v. 27, p. 190-193, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271293/>>. Acesso em: 17 jun 2013.

MARSHALL, B.J; WARREN, J.R. Unidentified curve bacilli the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, New York, v. 1, n. 8390, p. 1311-1315, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Unidentified+curve+bacilli+the+stomach+of+patients+with+gastritis+and+peptic+ulceration>>. Acesso em: 12 maio 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Campylobacter* e *Helicobacter*. In: _____. **Microbiologia médica**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 33, p. 339-347.

PASECHNIKOV, V. et al. Gastric Cancer: Prevention, Screening and Early Diagnosis. **World Journal Gastroenterol**. v. 20, n. 38, p. 13842-13862, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4194567/>. Acesso em: 12 ago 2014.

PORTAL-CELHAY, C; PEREZ-PEREZ, G. I. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. **Clinical Science**, London, v. 110, p. 305-314, 2006. Disponível em: <<http://www.clinsci.org/cs/110/0305/cs1100305.htm>>. Acesso em 14 jun 2013.

QUEIROZ, D. M. M.; MENDES, E. N. H. *Helicobacter pylori* e outros microorganismos espiralados gástricos: aspectos microbiológicos. **Tópicos em gastroenterologia**. São Paulo. Cap.15, v. 4, p. 235-248, 1993.

QUEIROZ, D. M. et al. dupA polymorphisms and risk of *Helicobacter pylori*-associated diseases. **International Journal of Medical Microbiology**, Belo Horizonte, p. 225-8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050811>>. Acesso em: 12 jun 2013.

RASMI, Y.; RAEISI, S.; SEYYED MOHAMMADZAD, M.H. Association of inflammation and cytotoxin-associated gene a positive strains of *Helicobacter pylori* in cardiac syndrome x. **Helicobacter**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 116-120, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1523-5378.2011.00923.x/abstract;jsessionid=DD2E12E07952DB56C122E3D1E83D6C0B.d04t01>>. Acesso em: 17 jun 2013.

RASMUSSEN, L. T. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies, saliva and dental plaques of dyspeptic patients from Marília, São Paulo, Brazil: presence of *vacA* and *cagA* genes. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 18, n. 2, jan., 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1678-91992012000200008&script=sci_arttext>. Acesso em: 14 jun 2013.

RASMUSSEN, L. T. et al. *Helicobacter pylori* detection in gastric biopsies, saliva and dental plaque of Brazilian dyspeptic patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n.3 p. 326-330, maio, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000300015&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em 21 fev 2013.

ROCHA, G.A. et al. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. **Tropical medicine & international health**, Oxford, v. 8, p. 987-991, nov., 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1360-2276.2003.01121.x/pdf>>. Acesso em: 14 maio 2013.

RODRIGUES, M.N. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from an urban community in north-east Brazil and risk factors for infection. **European journal of gastroenterology & hepatology**, London, v. 16, p. 201-205, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075995>>. Acesso em: 13 jun 2013.

SALAMA, N.R. et al. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. **International journal of medical microbiology**. Washington, v.69, n. 2, p. 730-736, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97945/>>. Acesso em: 17 jul 2013.

SHIOTA, S. et al. Association of *Helicobacter pylori dupA* With the Failure of Primary Eradication. **Journal of Clinical Gastroenterology**. New York, v. 46, n. 4, p. 297-301, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296869/>>. Acesso em: 17 jun 2013.

SHIOTA, S.; SUZIKI, R.; YAMAOKA, Y. The Significance of Virulence factors in *Helicobacter pylori*. *Journal of Digestive Diseases*. Carlton, v.14, n.7, p. 341-349, jul., 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-2980.12054/abstract;jsessionid=963847944A0C8ADA75C4432D8CDD6C32.f04t04>>. Acesso em: 21 jun 2014

SIDDIQUE et al. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and severity of chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric mucosal interleukin-8 levels: Evidence from a study in the Middle East. **Gut Pathogens**. London, v. 6, n.41, p. 3-10, set., 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4181383/pdf/13099_2014_Article_41.pdf>. Acesso em out 2014

STONE, M.A. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Postgrad. Journal of medicine*, London, v. 75, p. 198-200, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22880/>>. Acesso em 13 mar 2013.

SUERBAUM, S.M.D.; MICHETTI, P.M.D. *Helicobacter pylori* infection. **New England journal of medicine**., Boston ,v. 347, p. 1175-1186, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22880/>>. Acesso em: 15 maio 2013.

THOMAZINI, C. M.; PINHEIRO, N. A.; PARDINI, M. I. Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas CagA e VacA em pacientes com câncer gástrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1 p. 25 -30, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n1/29913.pdf>>. Acesso em 12 jul 2013.

TOMBOLA, F. et al. The *Helicobacter pylori vacA* toxin is a urea permease that promote urea diffusion across epithelia. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 108, n. 6, p. 929-937, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC200932/>>. Acesso em: 14 jul 2013.

TONELLI, E.; FREIRE, L. M. S. *Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência*. São Paulo: Medsi, 2ª edição p. 656-657, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Doenças microbianas do sistema digestivo*. In: _____. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. Cap. 25, p. 670.

TRABULSI, L. *Microbiologia*. 3. Ed. São Paulo: Atheneu; 2002.

VAN-DOORN, L. et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, *iceA*, status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, Chichester, v. 115, p. 59-66, jul., 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508598703658>>. Acesso em: 17 jun 2013.

VAZ, C.L.G.; ZATERKA, S. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arquivos de gastroenterologia**, São Paulo, v. 42, n.2, p. 128-132, jun., 2005.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032005000200012>. Acesso em: 12 jul 2013.

VERGUEIRO, C. et al. Seroprevalence and epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection in bone marrow donors in São Paulo. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v.11, n. 2, p. 196-203, jun., 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-790X2008000200002&script=sci_arttext>. Acesso em: 14 mar 2013.

VIKRAM, K.; ANANTHAKRISHNAN, N.; TOVEY, F.I. Is *Helicobacter pylori* Infection the Primary Cause of Duodenal Ulceration or a Secondary Factor? A Review of the Evidence. **Gastroenterology Research and Practice**. Cairo, mar., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623110/>>. Acesso em 12 jul 2013.

VOLAND, P.; WEEKS, D. L.; MARCUS, E. A.; PRINZ, C.; SANCHS, G.; SCOTT, D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. **American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology**. Bethesda, v. 284, p. 96-106, jan., 2003. Disponível em: <<http://ajpgi.physiology.org/content/284/1/G96>>. Acesso em 4 jun 2013.

WANG, M. et al. Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer. **Microbial Pathogenesis**. England, v. 13, n. 8, p. 59-60, jun/jul., 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ShoppingCartURL&_method=add&_eid=1-s2.0-S0882401013000478&originContentFamily=serial&_origin=article&_acct=C000228598&_version=1&_userid=10&_ts=1377981959&md5=69580a6a82363d7f83b15f01064caf0f>. Acesso em: 28 out 2013.

WEYERMANN, M. et al. The mother as source of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiology**, Heidelberg, v.17, p. 332-334, maio, 2006, Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452833>>. Acesso em: 13 maio 2013.

YAMAOKA, Y. 2012. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Related Gastroduodenal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. **Gastroenterology Research and Practice**. Cairo, v. 2012, jul., 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398592/>>. Acesso em: 12 maio 2013.

ZHANG, Z. et al. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. **BMC Gastroenterolog.**, London, v. 8, n.49., out., 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2584642/>>. Acesso em: 14 jul 2013

ZHAO Y. et al. Crystal Structure Confirmation of JHP933 as a Nucleotidyltransferase Superfamily Protein from *Helicobacter pylori* Strain J99. **Public Library of Science one**. San Francisco, v. 9, n.8 p. 104609, 2014. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0104609>. Acesso em: 13 set 2014

APÊNCIDE A - ARTIGO PUBLICADO

Esse estudo foi desenvolvido durante a iniciação científica da aluna, e havia previsto a publicação do mesmo. O artigo científico foi redigido e publicado no periódico *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* (JVAT*iTD*). Podendo ser comprovado no site: <http://www.jvat.org/content/20/1/1>.

Open Access

Research

Association among *H. pylori* virulence markers *dupA*, *cagA* and *vacA* in Brazilian patients

Weendelly Nayara Pereira¹, Mariane Avante Ferraz¹, Luanna Munhoz Zabaglia¹, Roger William de Labio², Wilson Aparecido Orcini¹, João Paulo Bianchi Ximenez¹, Agostinho Caleman Neto², Spencer Luiz Marques Payão^{1,2} and Lucas Trevizani Rasmussen^{1*}

* Corresponding author: Lucas T Rasmussen
lucas_rasmussen@hotmail.com ▼ Author Affiliations

¹ Sacred Heart University, Bauru, São Paulo State, Brazil

² Department of Genetics, Blood Bank, Marília Medical School, Marília, São Paulo State, Brazil

For all author emails, please [log on](#).

Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2014, **20**:1
doi:10.1186/1678-9199-20-1

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at:
<http://www.jvat.org/content/20/1/1>

Received: 3 September 2013
Accepted: 20 January 2014
Published: 23 January 2014

© 2014 Pereira et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Association among *H. pylori* virulence markers *dupA*, *cagA* and *vacA* in Brazilian patients

Weendelly Nayara Pereira¹, Marianne Avante Ferraz¹, Luanna Munhoz Zabaglia¹, Roger William de Labio², Wilson Aparecido Orcini¹, João Paulo Ximenez¹, Agostinho Caleman Neto², Spencer Luiz Marques Payão^{1,2}, Lucas Trevizani Rasmussen^{1*}

¹ Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, Brazil

² Disciplina de Genética, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Marília, Marília, São Paulo, Brazil.

***Corresponding Author:** Lucas Trevizani Rasmussen, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Sagrado Coração – USC. Rua Irmã Armanda, 10-50 Jardim Brasil, CEP 17011-160 Bauru, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 14 2107 7126; email: lucas_rasmussen@hotmail.com or lucasrasmussen@gmail.com.

Abstract

Background: Virulence factors of *Helicobacter pylori* have been demonstrated to be predictors of gastric diseases. Duodenal ulcer-promoting gene A (*dupA*) is a novel virulence factor in the *Helicobacter pylori* and it was associated with the duodenal ulcer development and a reduced risk for gastric carcinoma in some populations. The present study aimed to determine the presence of *dupA* gene and evaluate the association among *dupA* and other virulence factors such as *cagA*, *vacA* in Brazilian patients. **Methods:** Gastric biopsies were obtained from 205 dyspeptic patients, 100 pediatric and 105 adult ones. DNA was extracted and analyzed for the presence of *H. pylori* and virulence factors using the polymerase chain reaction method. **Results:** Patients with gastritis had a higher frequency of *H. pylori*-positive. The *dupA* gene was detected in 41.5% (85/205); *cagA* gene was obtained with 98 isolates (47.8%) and *vacA* genotypes s1/m1 50.2%, s1/m2 8.3%, s2/m2 36.6%, s2/m1 0.5% and s1/s2/m1/m2 4.4% were found respectively. We also verified a significant association between *cagA* and *dupA* genes (p=0.0003, relative risk (RR) 1.73 and confidence interval [CI]=1.3–2.3). The genotypes s1/m1 were also associated with *dupA* gene (p=0.0001, RR: 1.72 and CI: 1.3–2.2). The same associations were verified when analyzing pediatric and adults groups of patients individually. **Conclusion:** *dupA* is highly frequent in Brazilian patients and it was associated with *cagA* gene and *vacA* s1/m1 genotype, and it may be considered an important virulence factor in the development of gastric diseases in adult or pediatric patients.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *dupA*, *cagA*, *vacA*, gastroduodenal diseases, PCR.

Background

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram-negative spiral bacterium which colonizes the human stomach and approximately half of the world's population is infected with it [1, 2]. In 1994, the International Agency for Research on Cancer categorized the *H. pylori* infection as a definite group I

carcinogen and several authors report the chronic infection may induce gastritis, peptic ulcer, gastric adenocarcinoma and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [3-5].

It is interesting to note that, only a minority, approximately 20%, of *H. pylori*-infected individuals develop severe gastric diseases, suggesting that clinical outcomes are determined by the interaction of bacterial virulence, host genetic susceptibility and environmental factors [2, 6].

Virulence factors of *H. pylori*, including *vacA*, *cagA* and *babA* play important roles in gastric diseases. The *vacA* gene is present in all *H. pylori* strains and it is composed of two main regions: the signal region (s1 or s2) and the middle region (m1 or m2), which contributes to variations in the vacuolating activity of different *H. pylori* strains. s1/m1 strains are the most cytotoxic, followed by the s1/m2 strains and the s2/m2 [7].

In addition, *cagA* gene, is present in approximately 60 to 70% of *H. pylori* strains and several epidemiological studies have revealed that the presence of *cagA*-positive strains is correlated with a higher risk of developing peptic ulceration, gastric atrophy and gastric cancer [8, 9].

Most recently, Lu, *et al.* [10] described a novel virulence factor, a *virB4* homologue, called duodenal ulcer promoting gene (*dupA*), it is located in the “plasticity region” of *H. pylori* genome and composed of 2 genes, *jhp0917* and *jhp0918*, which form one continuous open reading frame by the insertion of a base T or C after the position 1385 in the *jhp0917* 3' region [6, 11].

The function of the *dupA* gene is unclear, but Lu, *et al.* [10] suggested this gene involvement in cell division and chromosomal DNA transfer, and reported that infections with *dupA*-positive strains increased the risk for duodenal ulcer but they were protective against gastric atrophy, intestinal metaplasia and gastric cancer in the Japanese, Korean and Columbian patients.

The involvement of virulence factors of *H. pylori* in gastric disease has been demonstrated around the world and the aim of the present study was to evaluate the presence of the *cagA*, *vacA* and *dupA* genes in Brazilian patients (children and adults) and analyze a relationship between virulence factors and gastroduodenal diseases.

Methods

Patients and Samples

We analyzed 205 samples which were obtained from 100 pediatric patients (41♂/59♀ mean age 10.9 ± 3.7) and 105 adult patients (57♂/48♀ mean age 47.8 ± 14.3) with abdominal symptoms and who had been submitted to upper gastrointestinal endoscopy in the Department of Gastroenterology of the School of Medicine of Marilia, Brazil. All subjects or their parents signed an informed consent form approved by the local Ethical Committee.

Two biopsies were taken endoscopically from the gastric antrum of each patient, one for genotyping and detecting *H. pylori* by polymerase chain reaction and the second for histopathological analyses. Just the patients *H. pylori* positive were included in this study

All patients were from the same socioeconomic level and had similar cultural habits. Regarding the ethnic origins: approximately 40% were of European origin, 45% were of Amerindian origin, and 15% were of mixed origin. The ethnic origins were determined by self-report and by the family geographical origin.

DNA Extraction and H. pylori Isolation

DNA from the gastric biopsies was extracted using the QIAamp® tissue kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. For detection of the *H. pylori*, PCR assays were performed using one set of oligonucleotides Hpx1/Hpx2 that amplifies a 150bp fragment corresponding to 16S-rRNA from *H. pylori* (Table 1). In each experiment, positive (strain 26695) and negative (water) controls were included.

Detection of cagA, vacA and dupA genes

The analyses of the presence of the target genes, *cagA*, *dupA* and *vacA* genotypes were performed through PCR, using one set of oligonucleotides for each gene fragment (Table 1)

Genomic DNA was PCR amplified for *cagA* by the methods of Rasmussen, *et al.* [9], van Doorn, *et al.* [12], amplifying a fragment of 232pb. The *vacA* "s" and "m" regions were genotyped with the previously described primer sets SA/SC and MA/MB. The SA/SC primers amplified "s1" fragments of 176 bp and "s2" fragments of 203 bp. The "m1" fragments were 400 bp and the "m2" fragments were 475 bp [9, 12-14] (Table 1).

To evaluate the presence of the *dupA* gene, we used the primers described by Gomes, *et al.* [6] which amplifies a 197bp fragment. It is important to note that these primers were constructed in well-conserved regions based on Brazilian strains.

Histopathology

Gastric mucosal biopsy specimens were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut in sequential and stained with Haematoxylin & Eosin and Giemsa stain. The histological parameters were graded using the criteria described in the Sydney system for analysis of chronic inflammation, polymorphonuclear activity and intestinal metaplasia [15].

Statistical Analysis

Associations among the virulent factors were evaluated by the two-tailed Chi-square test with Yates' correction for each group of patients separately. Differences were considered significant with a p value lower than 0.05. All statistical analyses were performed with SPSS version 20.0.

Results

Histopathology analyses were performed in 168/205 (82%) patients (99 adults and 69 children) and they revealed 153 patients with chronic gastritis, 13 patients with normal gastric mucosa and just two patients with duodenal ulcer. These results suggest an association between chronic gastritis and the presence of *H. pylori*.

***cagA*, *vacA* and *dupA* status**

Overall, the *cagA* gene was obtained in 98/205 (47.8%) samples. If we considered the age, *cagA* gene was detected in 51/105 and 47/100 samples of adults and pediatric patients respectively (Table 2).

Regarding the *vacA* gene, the most virulent allelic combination s1/m1 was found in 58 (55.2%) of the *H. pylori* strains, the s2/m2 was detected in 33 (31.4%) and the other genotypes, s1/m2 and s1/s2/m1/m2 were verified in 14 (13.4%) samples from adults. In children, we isolated 45 (45%) strains of the common *vacA* genotype s1/m1 and 42 (42%) strains of *vacA* s2/m2. Thirteen percent (13 strains) of the *H. pylori* bacterium had *vacA* genotype s1/m2, s2/m1 and s1/s2/m1/m2 (Table 2).

The *dupA* gene was considered positive when harboring the jhp0917 and jhp0918 genes. *dupA* gene was detected in 48 (45.7%) and in 37 (37%) *H. pylori* strains from adults and children, respectively. (Table 2)

When children and adults were compared, the *dupA* gene was more frequent in strains from adults, but this difference was not statistically significant ($p = 0.2610$). Similar results were observed for *cagA* gene ($p = 0.932$) and genotypes of *vacA* ($p = 0.1414$).

Association of *dupA* gene with *cagA* and *vacA* genes

When the total gastric samples were analyzed collectively, (adults and children) the presence of the *dupA* was associated with strains *cagA* positive ($p=0.0003$; RR 1.73; CI = 1.3–2.3). A Similar association was verified between the *dupA* gene and the s1/m1 genotypes of *vacA* gene ($p=0.0001$; RR: 1.72; CI: 1.3–2.2). As expected, the virulent allelic combination s1/m1 was associated with *cagA* positive ($p = 0.0001$; RR 3.52; CI = 2.5–4.99). When children and adults were analyzed separately, a similar association was observed (data not shown).

It is worthwhile to emphasize that the combination of *dupA* positive, *cagA* positive and s1/m1 genotype was found in 47 strains of *H. pylori* suggesting a possible relationship among the main virulent factors.

Discussion

H. pylori shows a large degree of genomic and allelic diversity, in special for the “plasticity region” of the genome, which is, composed of *dupA* gene, described by Lu, *et al.* [10]. First, *dupA* gene was associated with an increased risk of duodenal ulcer and protection against gastric cancer in

Japan and Korea, but these results are controversial and there can be variables depending mainly of the geographic areas studied.

Studying the Brazilian population, we detected the *dupA* gene in 85 (41.5%) patients, 48 (23.4%) adults and 37 (18.1%) children respectively. In contrast, Gomes, *et al.* [6] reported different rates and revealed the presence of *dupA* gene in 89.46% and 100% of adults' and children patients, respectively. Although, we used the primers described by Gomes, *et al.* [6], these discordant results may be explained by the geographic areas of Brazil, the population study, the method for molecular analyzes and lost or rearrangement in the plastic zone.

On the other hand, Arachchi, *et al.* [16], studying the Indian population, reported the presence of *dupA* in 37.5% of patients with duodenal ulcer and 22.86% in patients with functional dyspepsia. In addition, Zhang, *et al.* [17] detected *dupA* gene in 35.3% in the Chinese population. Both authors revealed that the prevalence of the *dupA* was significantly higher in strains from duodenal ulcer confirming the original results, which showed *dupA* was associated to DU and can be a virulence marker to this specific-disease; however the present study reported a similar prevalence of *dupA* in patients with gastritis.

Recently, Imagawa, *et al.* [18] showed that patients infected with *dupA*-positive strains have a gastric acid output significantly higher than *dupA*-negative patients. In addition, Abadi, *et al.* [19] observed higher acid resistance of the *dupA*-positive strains which suggest these strains are adapted to a stomach with high gastric acid output. Together, these results may explain the associations between the *dupA* gene and an increased risk for DU formation.

Regarding the detection of *cagA* gene, our results confirmed previous studies in Western countries, with 47.8% of *cagA*-positive patients, without significant differences between adults and children [6, 9, 14, 20, 21]. Other interesting result was the association between the presence of *dupA* and *cagA* genes in adults, children and when both groups were analyzed simultaneously. Arachchi, *et al.* [16] and Gomes, *et al.* [6] also found similar results, however these authors showed this association just in patients with DU and in adults.

vacA genotypes were also investigated in this study, and an important association was found between s1/m1 genotype and the presence of *dupA* gene, in contrast, strains *H. pylori dupA*-negative were associated with genotype s2/m2 of *vacA* gene. Similar results were reported by Arachchi, *et al.* [16] but with the allele s1 and m1 separately. Interestingly, strains of *H. pylori* with the combination *dupA* positive, *cagA* positive and s1/m1 were found in 47 (23%) patients and to our knowledge, just Arachchi, *et al.* [16] had described the same association, but they found only three patients with functional dyspepsia and infected with strains *dupA* positive, *cagA* positive and s1/m1. These results reveal an important association and suggest a possible relationship among the main virulent factors and the development of severe gastric disease.

However, our study includes some limitations. The patients studied had only gastritis and it would be interesting to conduct the same study in patients with duodenal ulcer and gastric cancer. It is

important to note that *dupA* gene was detected using PCR methods, showing the presence of genes jhp0917 and jhp0918. Queiroz, *et al.* [11] suggest that the presence of jhp0917 and jhp0918 genes may not be enough to characterize an intact and maybe functional *dupA* and that an analysis of *dupA* gene with other molecular biology techniques is important.

Conclusions

DupA is highly frequent in Brazil and it can be considered an important virulence marker. However, more studies are necessary to affirm this is a specific-disease marker. In addition, the association among the major virulence marker in adults and children represents new information that can be associated with the prognosis of patients and a severe gastric disease.

Acknowledgements

The authors would like to thank the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) for its funding of this research (grant number 2012/18333-3) and Universidade do Sagrado Coração.

References

1. Marshall BJ: *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994, **89**:S116-128.
2. Liu YE, Yue HG, Li PS, Qian X, Yuan Y: **The Relationship between *H. pylori* Virulence Genotypes and Gastric Diseases**. *Polish Journal of Microbiology* 2012, **61**:3.
3. Humans IWGotEoCRt: **Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori***. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994, **61**:241.
4. Wang MY, Chen C, Gao XZ, Li J, Yue J, Ling F, Wang XC, Shao SH: **Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer**. *Microb Pathog* 2013, **59-60**:13-18.
5. Yamaoka Y: **Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors**. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, **7**:629-641.
6. Gomes LI, Rocha GA, Rocha AM, Soares TF, Oliveira CA, Bittencourt PF, Queiroz DM: **Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients**. *Int J Med Microbiol* 2008, **298**:223-230.
7. Yamaoka Y: **Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Related Gastroduodenal Diseases from Molecular Epidemiological Studies**. *Gastroenterol Res Pract* 2012, **2012**:371503.
8. Karlsson A, Ryberg A, Dehnoei MN, Borch K, Monstein HJ: **Association between *cagA* and *vacA* genotypes and pathogenesis in a *Helicobacter pylori* infected population from South-eastern Sweden**. *BMC Microbiol* 2012, **12**:129.
9. Rasmussen LT, de Labio RW, Neto AC, Silva LC, Queiroz VF, Smith MAC, Payão SLM: **Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies, saliva and dental plaques of dyspeptic patients from Marília, São Paulo, Brazil: presence of *vacA* and *cagA* genes**. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2012, **18**:7.
10. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y: **Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori***. *Gastroenterology* 2005, **128**:833-848.
11. Queiroz DM, Rocha GA, Rocha AM, Moura SB, Saraiva IE, Gomes LI, Soares TF, Melo FF, Cabral MM, Oliveira CA: ***dupA* polymorphisms and risk of *Helicobacter pylori*-associated diseases**. *Int J Med Microbiol* 2011, **301**:225-228.

12. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, Carneiro F, Quint WG: **Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**:1271-1276.
13. Atherton JC, Peek RM, Jr., Tham KT, Cover TL, Blaser MJ: **Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*.** *Gastroenterology* 1997, **112**:92-99.
14. Lobo Gatti L, Agostinho Jn F, De Labio R, Balbo Piason F, Carlos Da Silva L, Fagundez De Queiroz V, Peres CA, Barbieri D, De Arruda Cardoso Smith M, Marques Payao SL: ***Helicobacter pylori* and cagA and vacA gene status in children from Brazil with chronic gastritis.** *Clin Exp Med* 2003, **3**:166-172.
15. Fonseca TL, Moraes EP, Juliano CR, Silva AM, Scaini CJ, Mendoza-Sassi RA, Silva PE: **Detection of *Helicobacter pylori* by phenotypic and genotypic methods.** *Dig Dis Sci* 2010, **55**:1643-1648.
16. Arachchi HS, Kalra V, Lal B, Bhatia V, Baba CS, Chakravarthy S, Rohatgi S, Sarma PM, Mishra V, Das B, Ahuja V: **Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (dupA) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population.** *Helicobacter* 2007, **12**:591-597.
17. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H: **The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, dupA in China.** *BMC Gastroenterol* 2008, **8**:49.
18. Imagawa S, Ito M, Yoshihara M, Eguchi H, Tanaka S, Chayama K: ***Helicobacter pylori* dupA and gastric acid secretion are negatively associated with gastric cancer development.** *J Med Microbiol* 2010, **59**:1484-1489.
19. Abadi AT, Taghvaei T, Wolfram L, Kusters JG: **Infection with *Helicobacter pylori* strains lacking dupA is associated with an increased risk of gastric ulcer and gastric cancer development.** *J Med Microbiol* 2012, **61**:23-30.
20. Gatti LL, Modena JL, Payao SL, Smith Mde A, Fukuhara Y, de Oliveira RB, Brocchi M: **Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, iceA and baba2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases.** *Acta Trop* 2006, **100**:232-240.
21. Goncalves MH, Silva CI, Braga-Neto MB, Fialho AB, Fialho AM, Queiroz DM, Braga LL: ***Helicobacter pylori* virulence genes detected by string PCR in children from an urban community in northeastern Brazil.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**:988-989.

Table 1: Primers and condition of amplification used in the study

Primers	Primer Sequence (5'- 3')	Amplification Condition	Gene	Reference
Hpx1 ^a	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	40 cycles at: 1 min, 94°C; 1 min, 59°C and 1 min, 72°C.	16S rRNA	Scholte et al., 1997
Hpx2	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCCGA			
SA	ATGGAATACAACAAACACAC	40 cycles at: 45 sec, 94°C; 45 sec, 54°C and 45 sec, 72°C.	vacA-s	Atherton et al., 1995
SC ^a	CCTGARACCGTTCCTACAGC			Doorn et al., 1998
MA ^a	CACAGCCACTTTYAATAACGA	35 cycles at: 45 sec, 94°C, 45 sec, 55°C and 1 min, 72°C.	vacA-m	Doorn et al., 1998
MB	CGTCAAATAATTCCAAGGG			
Cag1	ATGACTAACGAAACTATTGATC	40 cycles at: 1 min, 94°C; 1 min, 53°C and 1 min, 72°C.	cagA	Rasmussen et al., 2010
Cag2	CAGGATTTTGTATCGCTTTATT			

<i>DupA1</i>	CGTGATCAATATGGATGCTT	35 cycles at: 45 sec, 94°C; 45 sec, 52°C and 45 sec, 72°C.	<i>dupA</i>	Gomes et al., 2008
<i>DupA2</i>	TCTTTCTAGCTTGAGCGA			

- Genotype *vacA*: s1/m1 - strain 60190 of *H.pylori* (GeneBank U05676).
- Genotype *vacA*: s2/m2 - strain Tx30a of *H.pylori* (GeneBank U29401).
- ^aR = a A or G and Y = C or T.

Table 2: Frequency of genes *cagA* and *dupA* and genotypes of *vacA* in *H. pylori* strains isolated from 105 adults and 100 children with gastric chronic and normal gastric mucosa (GC: Gastric Chronic e NGT: Normal Gastric Tissue).

Genes	N	Samples from		Histopathology			
				CG		NGT	
				Total	Adults	Children	Adults
<i>cagA</i> +	98	51	47	47	26	1	4
<i>cagA</i> -	107	54	53	48	32	1	7
<i>dupA</i> +	85	48	37	44	26	1	2
<i>dupA</i> -	120	57	63	51	32	1	9
<i>s1/m1</i>	103	58	45	54	26	2	4
<i>s2/m2</i>	75	33	42	28	26	0	4
<i>s1/m2</i>	17	10	7	10	4	0	2
<i>s2/m1</i>	1	0	1	0	0	0	0
<i>s1/s2/m1/m2</i>	9	4	5	3	2	0	1
Total	205	105	100	153	13		