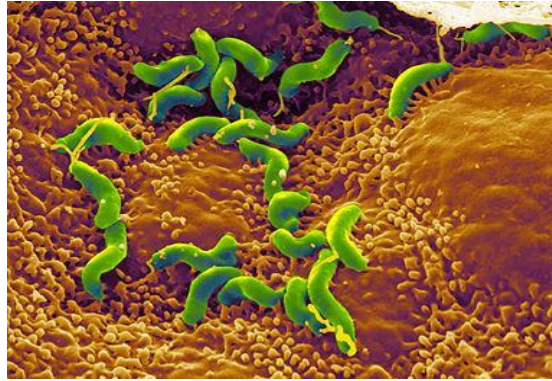




Universidade Católica Portuguesa

Faculdade de Engenharia



**Imunovariabilidade da Proteína Ativadora de Neutrófilos da
*Helicobacter pylori***

Inês Filipa Marçal

**Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Biomédica: Especialização em Engenharia
Biomolecular, de Tecidos e de Órgãos**

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Manuel José Martinho Barata Marques

Vogais: Prof. Doutor António José Leitão das Neves Almeida

Prof^a. Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado (Orientadora)

Março de 2014



Universidade Católica Portuguesa

Faculdade de Engenharia

**Imunovariabilidade da Proteína Ativadora de Neutrófilos da
*Helicobacter pylori***

Inês Filipa Marçal

**Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Biomédica: Especialização em Engenharia
Biomolecular, de Tecidos e de Órgãos**

Júri

Presidente: Prof. Doutor Manuel José Martinho Barata Marques

Vogais: Prof. Doutor António José Leitão das Neves Almeida

Prof^a. Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado (Orientadora)

Março de 2014

Resumo

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza o estômago humano e pode levar ao desenvolvimento de patologias gástricas como a gastrite crônica, úlceras pépticas, linfoma de MALT e o adenocarcinoma gástrico. Devido à sua diversidade genética e à robusta estratégia de infecção, tem sido difícil o desenvolvimento de uma vacina, para prevenir e erradicar a infecção, bem como o desenvolvimento de testes de diagnóstico eficazes. A proteína de ativação de neutrófilos (NAP) da *H. pylori*, constitui um dos principais fatores de virulência, que devido à sua capacidade de ativar neutrófilos, representa um importante papel no processo da infecção crônica. Neste trabalho, observou-se por diversos métodos de bioinformática que a NAP apresenta alguma diversidade genética mas uma sequência proteica conservada, tendo-se estimado as regiões teoricamente mais antigénicas e que devem ser consideradas no desenho de testes de diagnóstico e de vacinas baseado neste antígeno. De forma a avaliar o potencial desta proteína como antígeno na concepção de vacinas e de testes de diagnóstico avaliou-se experimentalmente a imunovariabilidade da NAP. Para isso, foram formuladas duas vacinas, uma proteica e outra de DNA, baseadas na inserção do gene da NAP da estirpe de referência *H. pylori* 26695, no plasmídeo procariota pQE30 e no plasmídeo eucariota pVAX. Observou-se em murghãos imunizados com estas vacinas uma resposta imune equilibrada Th1 e Th2. Observou-se de igual forma, em *Western blots*, o reconhecimento da NAP extraída de diversas estirpes de *H. pylori* obtidas de pacientes de diversos pontos do globo, pelos anticorpos policlonais obtidos da imunização com a NAP da estirpe *H. pylori* 26695. Desta forma, confirmou-se a elevada conservação imunogénica desta proteína, realçando a relevância de utilização deste alvo na concepção de vacinas e de testes de diagnóstico.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*, proteína de ativação de neutrófilos, antígeno, vacina, testes de diagnóstico, imunovariabilidade.

Abstract

Helicobacter pylori is a bacterium which colonizes the human stomach and can lead to the development of gastric pathologies such as chronic gastritis, peptic ulcers, gastric MALT lymphoma and adenocarcinoma. Due to their genetic diversity and robust strategy of infection of this bacterium, the development of a vaccine to prevent and eradicate the infection and the development of efficient diagnostic tests, have been difficult. Protein activation of neutrophils (NAP) of *H. pylori*, constitutes a major virulence factors, which because of its ability to activate neutrophils, plays an important role in the process of chronic infection. In this work, it was observed by several bioinformatics methods that NAP presents some genetic diversity but a protein conserved sequence, having been estimated theoretically the most antigenic regions should be considered in the design of diagnostic tests and vaccine based on this antigen. In order to evaluate the potential this protein as an antigen in designing of vaccines and diagnostic tests is evaluated experimentally the immunovariability of the NAP. For this, two vaccines, of one protein and another DNA, based on the insertion of the gene NAP of reference strain *H. pylori* 26695 in prokaryotic plasmid pQE30 and eukaryotic plasmid pVAX, were formulated. Was observed in mice immunized with these vaccines a balanced Th1 and Th2 immune response. The same way, was observed, in Western blots the recognition of NAP extracted from different *H. pylori* strains obtained from patients from different parts of the globe, for the polyclonal antibodies obtained by immunization with the NAP of *H. pylori* strain 26695. This way, confirmed the high immunogenic conservation this protein, highlighting the relevance of using this target in designing of vaccines and diagnostic tests.

Keywords: *Helicobacter pylori*, neutrophil activation protein, antigen, vaccine, diagnostic tests, immunovariability.

Agradecimentos

Um agradecimento muito especial à minha orientadora, Professora Doutora Cecília Calado, por ter-me dado a oportunidade de realizar este projeto, pela sua valiosa orientação científica e por toda a atenção e disponibilidade a todas as horas, não só ao longo da realização deste projeto, mas também nestes dois anos de mestrado.

À minha co-orientadora Professora Doutora Andreia Couto, pela orientação, confiança e paciência depositada em mim ao longo deste ano. Muito obrigada, por todas as horas de dedicação no laboratório e por toda a aprendizagem que me permitiu a realização deste projeto.

Um muito obrigada à minha co-orientadora Doutora Lídia Gonçalves, pois sem a sua excelente orientação a conclusão deste trabalho não seria possível. Obrigada por toda a paciência, apoio, carinho, dedicação e sobretudo, por todos os conhecimentos transmitidos, que sei que serão muito úteis para a minha vida profissional futura.

Ao Doutor Professor Pedro Sampaio, pela sua preciosa ajuda no crescimento das estirpes de *H. pylori*, que nos permitiu realizar parte do trabalho laboratorial, por toda a ajuda que me proporcionou no laboratório e pelos bons conselhos que deu sempre que precisava.

À Faculdade de Engenharia da Universidade Católica Portuguesa (FEUCP), na pessoa do Professor Doutor Manuel Barata Marques, Diretor da Faculdade, por me ter proporcionado as condições básicas necessárias para a realização deste projeto.

Agradeço a todos os meus colegas de curso por todo o companheirismo e ajuda durante estes dois anos, e em especial, à minha colega de projeto, Sónia Vaz, pelo companheirismo, apoio e, partilha de experiências durante este último ano.

Aos meus pais, irmã, família, amigos e namorado, por todo o apoio, paciência, carinho, amizade e diversão, pois sem eles, todo este meu percurso académico não teria sido possível.

Agradeço à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento deste trabalho através do projecto PTDC/BIO/69242/2006.

Índice

Resumo.....	IV
<i>Abstract</i>	V
Agradecimentos.....	VI
Índice.....	VII
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XIV

CAPITULO I

1. A infecção por <i>H. pylori</i>	1
1.1. Patologias associadas	2
1.2. Prevalência e transmissão.....	3
1.3. Fatores de virulência	4
1.4. Relação com sistema imunitário inato e específico.....	7
1.5. Métodos de diagnóstico.....	10
1.6. Tratamentos	11
1.7. Vacinas	12
1.7.1. Estudos em modelos animais	13
1.7.2. Ensaio clínicos	15

CAPITULO II

2. Proteína de Ativação de Neutrófilos (NAP).....	17
2.1. Estrutura e mecanismos de ação.....	17
2.2. Indicador de doenças gástricas	20
2.3. Antígeno candidato a vacina e testes de diagnóstico	21
2.3.1. Análises proteômicas e imunoproteômicas	21
2.3.2. Estudos de vacinação	23
2.3.3. Estudos de conservação genética	23

CAPITULO III

3. Análise da variabilidade genética e estimativa da imunogenicidade da NAP.....	24
3.1. Materiais e Métodos	24
3.1.1. Seleção e recolha de dados.....	24

3.1.2. Alinhamento das sequências nucleotídicas	25
3.1.3. Análise da variabilidade genética da NAP	25
3.1.4. Análise da antigenicidade.....	25
3.1.4.1. Índice antigénico	26
3.1.4.2. Antigenicidade para os epítomos T	26
3.1.5. Análise da antigenicidade e conservação do epítomo selecionado	26
3.2. Resultados e Discussão	27
3.2.1. Análise da variabilidade genética.....	27
3.2.2. Transições e transversões	30
3.2.3. Análise filogenética.....	31
3.2.4. Análise da antigenicidade.....	33
3.2.4.1. Sequência consenso	33
3.2.4.2. Sequências do gene da NAP de diferentes estirpes de <i>H. pylori</i>	35
3.2.5. Conservação e especificidade dos epítomos.....	37
CAPITULO IV	
4. Análise da Imunovariabilidade da NAP	38
4.1. Materiais e Métodos	38
4.1.1. Construção dos plasmídeos pVAX-NAP e PQE30-NAP.....	38
4.1.1.1. Isolamento do DNA genómico da <i>H. pylori</i> 26695.....	38
4.1.1.2. Amplificação do gene NAP por PCR.....	38
4.1.1.3. Análise por restrição por eletroforese em gel de agarose.....	40
4.1.1.4. Purificação do gene da NAP amplificado por PCR.....	40
4.1.1.6. Clonagem do gene da NAP nos vetores pVAX e PQE30	41
4.1.1.7. Quantificação de DNA	43
4.1.2. Validação das construções	43
4.1.2.1. Validação das construções pVAX-NAP e PQE30-NAP por PCR	43
4.1.2.2. Produção da proteína NAP em células HEK transfetadas com o plasmídico pVAX-NAP.....	43
4.1.2.3. Produção da proteína NAP em <i>E. coli</i> transformada com PQE30-NAP	45
4.1.3. Produção de antígenos para os ensaios <i>in vivo</i> e de <i>Western Blot</i>	47
4.1.3.1. Extração e purificação do pVAX-NAP produzido em <i>E.coli</i>	47
4.1.3.2. Produção da proteína NAP em <i>E. coli</i> transformada com o plasmídeo PQE30-NAP.....	48
4.1.3.3. Crescimento das diferentes estirpes de <i>H. pylori</i>	48
4.1.3.4. Quantificação de proteínas	49
4.1.4. Imunovariabilidade.....	50

4.1.4.1. Imunização de murganhos.....	50
4.1.4.2. Recolha de amostras biológicas e análises ao soro	51
4.1.4.3. Avaliação da produção de anticorpos em murganhos por ELISA	51
4.1.4.4. Avaliação da imunovariabilidade da NAP por <i>Western Blot</i>	51
4.2. Resultados e Discussão	53
4.2.1. Construção dos plasmídeos pVAX-NAP e PQE30-NAP.....	53
4.2.1.1. Amplificação do gene NAP por PCR.....	53
4.2.2. Validação das construções pVAX-NAP e PQE30-NAP	55
4.2.2.1. Por PCR.....	55
4.2.2.2. Produção da proteína NAP em células HEK293T transfetadas com o plasmídeo pVAX-NAP	56
4.2.2.3. Produção e purificação da proteína NAP em de <i>E. coli</i> transformada com o plasmídeo PQE30-NAP.....	57
4.2.3. Imunovariabilidade.....	61
4.2.3.1. Avaliação da produção de anticorpos em murganhos por ELISA	61
4.2.3.2. Avaliação da imunovariabilidade da NAP por <i>Western Blot</i>	63
CAPITULO V	
5. Conclusões	69
CAPITULO VI	
6. Referências Bibliográficas	74

Lista de Figuras

Figura 1.1. Morfologia da <i>H. pylori</i>	1
Figura 1.2. Resultados fisiopatológicos e clínicos da infecção crônica por <i>H. pylori</i>	2
Figura 1.3. Prevalência de infecção por <i>H. pylori</i> no mundo.....	3
Figura 1.4. Colonização e infecção da <i>H. pylori</i> no <i>corpus</i> do estômago humano.....	5
Figura 1.5. Mecanismos de colonização, aderência e interação da <i>H. pylori</i> com a mucosa gástrica e a resposta imune inata e adaptativa desencadeada pelo hospedeiro.....	10
Figura 2.1. Modulação computacional do monômero, trímero e dodecâmero da NAP.....	18
Figura 2.2. Atividade da NAP no desenvolvimento do processo inflamatório associado à infecção por <i>H. pylori</i> e a sua atividade imunomoduladora.....	19
Figura 2.3. Diagrama dos eventos intracelulares envolvidos na ativação dos leucócitos pela NAP.....	20
Figura 3.1. Alinhamento das 51 sequências proteicas do gene da NAP, a sequência consenso obtida e a representação gráfica das zonas mais conservadas do gene.....	30
Figura 3.2. Árvore filogenética do gene da NAP.....	32
Figura 3.3. Determinação das regiões mais antigênicas da proteína consenso NAP pelo programa <i>Lasergene</i> ® <i>Protean</i> TM	34
Figura 3.4. Determinação das regiões mais antigênicas da proteína NAP das estirpes 26695 e P79 pelo programa <i>Lasergene</i> ® <i>Protean</i> TM com indicação das alterações em relação à sequência consenso.....	35
Figura 3.5. Determinação das regiões mais antigênicas da proteína NAP das estirpes Sat464 e Aklavik86 pelo programa <i>Lasergene</i> ® <i>Protean</i> TM com indicação das alterações em relação à sequência consenso.....	36
Figura 3.6. Determinação das regiões mais antigênicas da proteína NAP da estirpe F30 pelo programa <i>Lasergene</i> ® <i>Protean</i> TM com indicação das alterações em relação à sequência consenso.....	36

Figura 4.1. Desenho dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> , com indicação da sequência nucleotídica do gene da NAP (cinza), das enzimas de restrição (vermelho), da <i>tag-FLAG</i> (azul) e das zonas de hibridação (amarelo), para a amplificação do gene da NAP a partir do genoma da estirpe 26695 da <i>H. pylori</i>	39
Figura 4.2. Representação esquemática dos plasmídeos recombinantes pVAX-NAP e PQE30-NAP.....	42
Figura 4.3. Possibilidade de formação de <i>hairpins</i> para o <i>primers forward</i> (A) e <i>reverse</i> (B)....	55
Figura 4.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos após PCR do genoma da estirpe <i>H. pylori</i> 26695 com os <i>primers</i> indicados na secção 4.1.1.2.....	54
Figura 4.5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos após PCR dos plasmídeos pVAX-NAP (A) e pQE30-NAP (B) utilizando-se os <i>primers</i> indicados na secção 4.1.1.2.....	56
Figura 4.6. (A e B) Imagens obtidas por imunofluorescência da transfecção das células HEK293T com o plasmídeo recombinante pVAX-T6' utilizando-se 6 µl de lipofetamina.....	57
Figura 4.7. Imagens obtidas por imunofluorescência das células HEK293T transfetadas com o plasmídeo recombinante pVAX-NAP.....	57
Figura 4.8. Crescimento das células de <i>E. coli</i> NZY5α recombinada com o plasmídeo pQE30-NAP, após indução da expressão proteica através da adição de IPTG quando a OD610nm = 0.600.....	58
Figura 4.9. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-His contra as amostras da cultura de <i>E.coli</i> NZY5α transformadas com o plasmídeo PQE30-NAP após indução com IPTG.....	59
Figura 4.10. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-His contra as amostras da cultura de <i>E.coli</i> NZY5α transformadas com o plasmídeo PQE30-NAP após purificação e <i>desalted</i>	60
Figura 4.11. Valores em absorvância obtidos a 410 nm, relativos ao ensaio de ELISA para determinar a produção de anticorpos específicos anti IgG, IgG1 e IgG2a no pool de soros (n=2) de murganços (BALB/c) imunizados com: pVAX-T6', pVAX-NAP, proteína NAP, proteína T6' e estirpes de <i>H. pylori</i> SS1, J99, 1152, 2669 e Mona.....	62
Figura 4.12. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-NAP (A) e Anti-T6' (B), contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE.....	64

Figura 4.13. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-NAP (A) e Anti-T6' (B), contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE.....	65
Figura 4.14. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-NAP, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE.....	66
Figura 4.15. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-NAP, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE.....	67
Figura 4.16. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-estirpe 26695, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE.....	68
Figura 4.17. <i>Western Blot</i> realizado com soro anti-estirpe 26695, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE.....	68

Lista de tabelas

Tabela 3.1. Representação das diferentes estirpes de <i>H. pylori</i> dos cinco continentes (14 Europeias, 15 Asiáticas, 15 Americanas, 4 Australianas e 3 Africanas) a partir das quais foram obtidas as sequências do gene da NAP.....	24
Tabela 3.2. Diversidade dos genes alvo da NAP obtido de 51 sequências nucleotídicas, considerando-se por cada sequência 432 pares de bases.....	27
Tabela 3.3. Prevalência das substituições por transição e transversão para o gene da NAP.....	31
Tabela 4.1. Condições da reação do PCR para ampliar o gene NAP.....	39
Tabela 4.2. Ciclos do PCR programadas no termociclador para ampliar o gene NAP.....	39
Tabela 4.3. Condições de reação da digestão dos vetores PVAX e PQE30 e do gene da NAP com as enzimas <i>Pst I</i> e <i>Nhe I</i>	41
Tabela 4.4. Condições da reação da clonagem do gene da NAP nos plasmídeos pVAX e PQE30.....	41
Tabela 4.5. Estirpes de <i>H. pylori</i> utilizadas para os ensaios <i>in vivo</i> e <i>Western Blot</i>	49
Tabela 4.6. Grupos de murganhos imunizados com as proteínas recombinantes NAP e 6T', os plasmídeos pVAX-6T' e pVAX-NAP e as estirpes de <i>H. pylori</i> SS1, J99, 1152, 16695 e MONA, por via intramuscular.....	50
Tabela 4.7. Ensaios de <i>Western Blot</i> com as proteínas recombinantes NAP, T6', 6T e 8T, e os extratos proteicos de diversas estirpes de <i>H. pylori</i> , incubadas com os soros, α -NAP, α -T6 e α -26695, obtidos nas imunizações dos ratinhos.....	52
Tabela 4.8. <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene da NAP a partir do genoma da <i>H. pylori</i> 26695 e CCUG 17874 por Sun <i>et al.</i> , (2006), com indicação dos locais de restrição (vermelho), sequencia tag-FLAG (azul) e zona de hibridação (preto).....	55
Tabela 4.9. Título de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 no pool de soros (n=2) e respectivas absorvâncias a uma diluição de 1:200, obtidos após imunização de murganhos (BALB/c) com: pVAX-T6', pVAX-NAP, proteína NAP, proteína T6' e estirpes de <i>H. pylori</i> SS1, J99, 1152, 2669 e Mona.....	62

Lista de Abreviaturas

AG - Adenocarcinoma gástrico

APCs - do inglês, *antigen presenting cells*

BabA - do inglês, *blood group antigen-binding adhesion*

BCA - do inglês, *bicinchoninic acid assay*

BCIP - do inglês, *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*

BGH - do inglês, *bovine growth hormone*

BLAST - *basic local alignment search tool*

BSA - do inglês, *bovine serum albumin*

CagA - do inglês, *cytotoxin-associated antigen A*

cDNA - do inglês, *complementary DNA*

CG - Cancro gástrico

CpG - do inglês *cytosine-phosphate-guanine*

CTLs - do inglês, *cytotoxic T lymphocytes*

DCs - do inglês, *dendritic cells*

DMEM - do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture*

DMEM10 - Meio DNEM suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal

DNA - do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DNU- Dispepsia não ulcerosa

dsRNA - do inglês, *double strain RNA*

EBI - *European Bioinformatics Institute*

EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*

ELISA - do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK - do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*

FBS - do inglês, *fetal bovine serum*

FEUCP - Faculdade de Engenharia da Universidade Católica Portuguesa

FFUL - Faculdade de Farmácia de Universidade de Lisboa

FITC- do inglês, *fluorescein isothiocyanate*

FlaA e FlaB - do inglês, *flagellin genes A and B, respectively*

GC - Gastrite crónica

GroEL - do inglês, *heat shock protein*

GroES - do inglês, *heat shock protein*

HEK- do inglês, *human embryonic kidney*

His - Histidina

HIV - do inglês, *human immunodeficiency vírus*

HpaA - do inglês, *Helicobacter pylori adhesin A*

HspA - do inglês, *heat shock protein A*

IEDB - *Immune Epitope Database*

IFN- γ - do inglês, *interferon gamma*

Ig - do inglês, *immunoglobulin*

IL - do inglês, *interleukin*

IMAC - do inglês, *immobilized metal ion affinity chromatography*

IP3 - do inglês, *inositol trisphosphate*

IPTG - do inglês, *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

kDa – kilodaltons (peso molecular)

LT - do inglês, *heat-labile toxin*

MALT - do inglês, *mucosa-associated lymphoid tissue*

MCS - do inglês, *multiple cloning Site*

MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MHC - do inglês, *major histocompatibility complex*

MLST - do inglês, *multi-locus sequence typing*

mRNA - do inglês, *messenger RNA*

NADPH oxidase - do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

NAP - do inglês, *neutrophil-activating protein*

NBT - do inglês, *nitro-blue tetrazolium chloride*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NJ - *Neighbour-Joining*

NO - do inglês, *nitric oxide*

OipA - do inglês, *outer membrane protein A*

OPD - do inglês, *o-phenylenediamine dihydrochloride*

PaI - do inglês, *cag pathogenicity island*

PAMPs - do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*

Pb - Pares de base

PBS - do inglês, *phosphate buffered saline*

P_{CMV} – promotor do citomegalovírus

PCR - do inglês, *polymerase chain reaction*

PI3K - do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*

PLC - do inglês, *phospholipase C*

PPI - do inglês, *proton-pump inhibitor*

PSM - do inglês, *prestained protein marker*

PVDF - do inglês, *polyvinylidene difluoride*

ROI - do inglês, *reactive oxygen intermediate*

ROS - do inglês, *reactive oxygen species*

Rpm - rotações por minuto

SabA - do inglês, *sialic acid-binding adhesin*

SAT - do inglês, *stool antigen tests*

SDS - do inglês, *sodium dodecyl sulfate*

T4SS - do inglês, *type 4 secretion system*

TAE - Tris-acetato-EDTA

TCR - do inglês, *T-cell receptor*

TGF - do inglês, *transforming growth factor*

Th - do inglês, *T helper cells*

TLRs - do inglês, *toll-like receptor*

TNF - do inglês, *tumor necrosis factor*

Tregs - do inglês, *regulatory T cells*

UBT- do inglês, *urea breath test*

UD - Úlcera duodenal

UG - Úlcera gástrica

UP - Úlcera péptica

UreA e UreB - do inglês, *urease genes A and B, respectively*

VacA - do inglês, *vacuolating cytotoxin A*

1. A infecção por *H. pylori*

A associação da infecção por *H. pylori* a patologias gástricas foi cientificamente descrita em 1982 por Barry Marshall e Robin Warren o que levou à atribuição do prémio Nobel em 2005 a estes investigadores (Marshall e Warren, 1984). A *H. pylori* caracteriza-se morfolologicamente por ser uma bactéria gram-negativa, microaerofílica, com uma forma de espiral e flagelada que coloniza a mucosa gástrica humana (Fig.1.1). A infecção por esta bactéria representa o maior fator de risco para o desenvolvimento de patologias como gastrites e, úlceras gastrointestinais, sendo responsável por 60-80% das úlceras gástricas e 95% das úlceras duodenais. Além disso, a *H. pylori* foi a primeira bactéria a ser classificada como cancerígena de classe I pela Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro da Organização Mundial da Saúde devido à sua relação epidemiológica com o adenocarcinoma gástrico e com o linfoma de MALT (do inglês, *mucosa-associated lymphoid tissue*) (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008; Majumdar *et al.*, 2010).



Figura 1.1. Morfologia da *H. pylori*. Imagem obtida por microscopia eletrónica de transmissão onde se pode observar a forma flagelada da bactéria. A sua dimensão é de cerca de 1 micrómetro (μm) de largura por 2 a 5 μm de comprimento. Adaptado de Suerbaum e Josenhans (1999).

1.1. Patologias associadas

Mais de 80% dos indivíduos infetados por *H. pylori* permanecem assintomáticos durante toda a vida, no entanto, em alguns casos, e se não for efetuado tratamento adequado, a infeção pode levar ao desenvolvimento de patologias gástricas graves. A condição fenotípica mais comum desencadeada pela persistência da infeção por *H. pylori*, denomina-se por gastrite crónica (Fig.1.2.B). Esta condição caracteriza-se por uma pancreatite leve com pouca interrupção da secreção de ácido gástrico. A grande maioria dos indivíduos com gastrite são assintomáticos e não desenvolvem doença gastrointestinal grave, podendo, no entanto, transmitir a infeção a outros indivíduos. A gastrite pode evoluir para patologias mais severas como úlceras gástricas e duodenais e adenocarcinoma gástrico. Cerca de 15% dos indivíduos infetados por *H. pylori* desenvolvem úlcera duodenal. Esta condição caracteriza-se por uma gastrite antral predominante que surge em consequência da inflamação antral que leva a um aumento produção de ácido nesta região mantendo o *corpus* da mucosa saudável (Fig.1.2.A). Por último, o fenótipo mais grave é o cancro gástrico que afeta cerca de 1% dos indivíduos infetados. O risco aumentado de cancro gástrico surge como resultado da inflamação crónica a longo prazo e o desenvolvimento de gastrite no *corpus* da mucosa (Fig.1.2.C). Esta patologia caracteriza-se por um padrão de gastrite predominante no *corpus* da mucosa e gastrite atrófica multifocal com uma baixa secreção de ácido. Curiosamente, os indivíduos predispostos a desenvolver úlceras pépticas estão efetivamente protegidos de desenvolver cancro gástrico, o que sugere que os dois resultados são mutuamente exclusivos (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008; Majumdar *et al.*, 2010).



Figura 1.2. Resultados fisiopatológicos e clínicos da infeção crónica por *H. pylori*. A- Úlcera duodenal, B- Gastrite, C- Cancro gástrico. Adaptado de Amieva e El-Omar (2008).

Nas últimas décadas a infeção por *H. pylori* tem sido relacionada com o aumento da frequência da doença do refluxo gastroesofágico, da esofagite crónica, do esófago de Barrett e adenocarcinoma esofágico. Estas condições estão associadas à hiperacidez, que tem sido relatada após a cura da infeção por *H. pylori* com antibióticos, uma vez que, a erradicação desta bactéria faz com que o estômago volte a produzir ácido em quantidade suficiente, e logo o

ambiente gástrico é mais ácido. Este facto levou à sugestão de que a infeção por *H. pylori* pode fornecer algum benefício para a humanidade (Revisto em Correa e Piazuolo, 2008).

1.2. Prevalência e transmissão

Ao contrário de muitos outros organismos, a infeção por *H. pylori* está apenas restrita aos seres humanos. O elevado número de pessoas infetadas em todo o mundo sugere que esta bactéria possui uma estratégia muito robusta de transmissão. Estudos epidemiológicos sugerem que a hipótese mais provável de transmissão da *H. pylori* ocorre através do contacto humano, pois não foi provado até hoje, a existência de um reservatório ambiental ou animal significativo. Geralmente a infeção inicia-se durante a infância, pensa-se que através do contacto entre mães e filhos e, se não for efetuado tratamento adequado, a colonização persiste durante toda a vida. A transmissão pode ocorrer pelas vias gastro-oral, oral-oral e fecal-oral, no entanto, todo este tema ainda continua sob investigação (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008; Correa e Piazuolo, 2008; Majumdar *et al.*, 2010).

A infeção por *H. pylori* afeta cerca de metade da população mundial, sendo que, a grande maioria da população infetada está concentrada nos países em desenvolvimento, atingindo uma prevalência de cerca de 80 a 90% da população (Fig.1.3). Nos países mais desenvolvidos, a prevalência da infeção atinge apenas cerca de 10 a 60% da população (Fig.1.3) devido a importantes mudanças socioeconómicas como, a melhoria na higiene e saneamento das casas, diminuição da dimensão do agregado familiar, mudanças de hábitos alimentares, melhorias nos sistemas de refrigeração em casa e nos transportes, existência de equipamentos de controlo de doenças infecciosas e o aumento da utilização de antibióticos (Revisto em Correa e Piazuolo, 2008; Robinson *et al.*, 2007; Majumdar *et al.*, 2010).

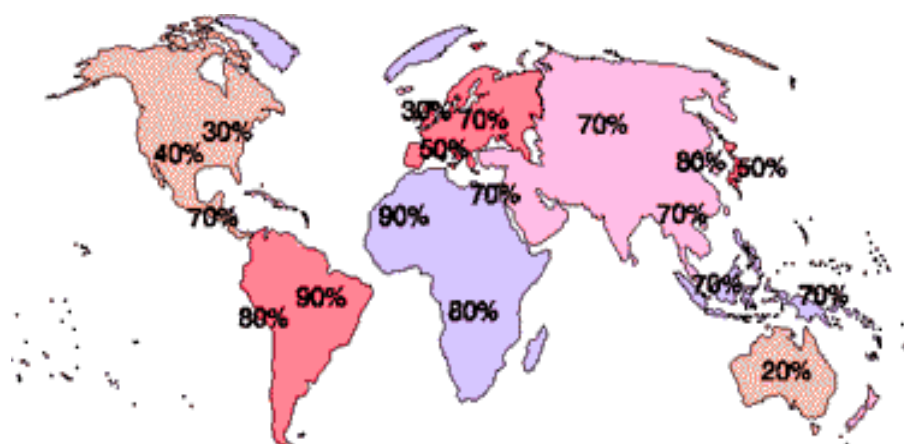


Figura 1.3. Prevalência de infeção por *H. pylori* no mundo. (© *Helicobacter Foundation* 2006).

A gravidade da infecção que determina o desenvolvimento de doença parece estar relacionada com vários fatores como, a suscetibilidade do hospedeiro, fatores ambientais e com a virulência da estirpe que é determinada por vários fatores de virulência presentes na bactéria (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008).

1.3. Fatores de virulência

A *H. pylori* é o único microorganismo conhecido que é capaz de colonizar o ambiente hostil do estômago humano de forma persistente, devido ao desenvolvimento de uma série de mecanismos e fatores de virulência que permitem ultrapassar a barreira epitelial e os mecanismos de defesa imunitária do hospedeiro, garantindo assim a sua sobrevivência. Após a sua entrada na mucosa gástrica, as bactérias tem de sobreviver ao pH extremamente ácido do estômago humano. Para sobreviver, a *H. pylori* gera grandes quantidades de urease, uma enzima associada à superfície da bactéria capaz de neutralizar o ambiente ácido do estômago pela dissociação da ureia em amônia e dióxido de carbono. A urease é constituída por uma estrutura hexapolimérica que compreende 2 subunidades, a ureA e a ureB. Além do seu papel na colonização, a urease pode causar inflamação e danos tóxicos nos tecidos. Além disso, têm sido atribuídos à urease, outros efeitos como a ativação da fagocitose e a indução da apoptose (Revisto em Suerbaum e Josenhans, 1999).

No entanto, mesmo com múltiplos mecanismos de adaptação, a *H. pylori* permanece suscetível ao ácido e apenas sobrevive alguns minutos a pH ácido. Uma das estratégias utilizadas para minimizar a exposição ao pH baixo do lúmen do estômago é a sua permanência na superfície do epitélio onde o pH é quase neutro (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008). Para permanecer na superfície da mucosa a *H. pylori* utiliza os seus filamentos flagelares que lhes fornecem a motilidade. Os flagelos compreendem duas subunidades diferentes, as flagelinas FlaA e FlaB, sendo que a expressão de ambos é necessária para uma motilidade completa da bactéria (Revisto em Suerbaum e Josenhans, 1999). Outro fator importante para a mobilidade e orientação da direção do movimento dos flagelos é a quimiotaxia. Estes mecanismos de persistência da *H. pylori* relatados, estão representados na figura 1.4 (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008).

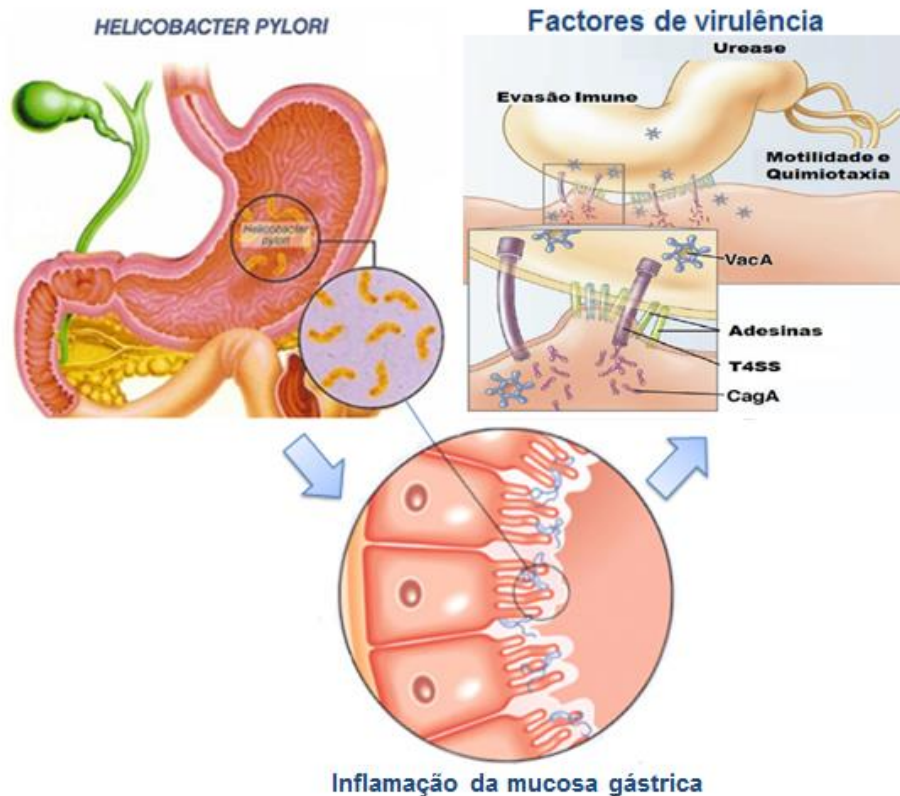


Figura 1.4. Colonização e infecção da *H. pylori* no *corpus* do estômago humano. Adesão da *H. pylori* às células epiteliais, produção de urease e outros de fatores virulência importantes para a sobrevivência da bactéria ao pH ácido do estômago. Para permanecer na superfície da mucosa a *H. pylori* utiliza os seus flagelos e mecanismos de quimiotaxia. Através de adesinas, a *H. pylori* fixa-se à superfície das células hospedeiras que permite a entrega de toxinas como VacA e CagA que desregulam parte das funções das células hospedeiras. Todos estes mecanismos levam a uma consequente resposta inflamatória que origina a gastrite. Adaptado de Amieva e El-Omar (2008).

Um outro mecanismo relevante para a colonização e persistência da infecção da *H. pylori* é a sua aderência às células epiteliais gástricas que, implica danos nas células epiteliais, induz a inflamação e permite a entrega de toxinas (Fig.1.4). Tal como outras bactérias patogénicas, a *H. pylori* liga-se a recetores da célula hospedeira através de adesinas (Revisto em Suerbaum e Josenhans, 1999). As adesinas melhor estudadas são proteínas de membrana externa da bactéria e que se ligam a glicoproteínas da superfície das células hospedeiras. Uma destas é a adesina BabA (do inglês, *blood group antigen-binding adhesin*) que se liga ao antígeno Lewis-b. Outra proteína de membrana externa é a adesina SabA (do inglês, *sialic acid-binding adhesin*) que se liga a glicoproteínas do ácido siálico em particular ao antígeno Lewis-x. Outras proteínas como HopZ e a HopH pertencentes à família de proteínas OipA (do inglês, *outer membrane protein A*), tem sido propostas como adesinas pois estão também envolvidas na aderência da bactéria às células epiteliais gástricas (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008).

Além da adesão, a *H. pylori* estabelece outros tipos de interações com as células epiteliais através da expressão de fatores de virulência muito importantes na patogênese da infecção e que contribuem para os diferentes resultados clínicos. Estes são maioritariamente responsáveis pelo aumento do risco de doença pois promovem a libertação nas células do hospedeiro, de citocinas pró inflamatórias, que causam a infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica que dão origem à resposta inflamatória. Pensa-se que o principal determinante da úlcera péptica e do carcinoma gástrico será a expressão contínua de citocinas pelas células epiteliais que ocorre durante a infecção crónica. Apesar de todas as infeções por *H. pylori* estarem associadas à inflamação gástrica, as associadas a doenças gástricas mais graves estão associadas a níveis mais elevados de inflamação. Os fatores de virulência melhor estudados são a proteína VacA (do inglês, *vacuolating cytotoxin A*), o sistema de secreção do tipo IV (T4SS, do inglês, *Type 4 Secretion System*) e a sua proteína efetora CagA (do inglês, *cytotoxin-associated antigen A*), a catalase, e a NAP (do inglês, *neutrophil-activating protein*), que estão representados na figura 1.4. (Revisto em Robinson *et al.*, 2007).

A toxina VacA atua sobre as células epiteliais gástricas e está presente na sua forma funcional em todas as estirpes de *H. pylori*. Após a sua secreção, aproximadamente 50% da toxina permanece associada à superfície da célula bacteriana. Fora da bactéria, as duas subunidades de VacA (s e m) formam complexos que após exposição ao ambiente ácido, sofrem alterações conformacionais que a tornam totalmente ativa. Na sua forma ativa, a VacA penetra nas membranas das células humanas formando poros que permitem a passagem de pequenas moléculas para o meio extracelular, como nutrientes a utilizar pelas bactérias, perturbando assim o tráfico intracelular da membrana citoplasmática. Além disso, esta toxina induz a morte das células hospedeiras através de apoptose e suprime a resposta das células T. O gene que codifica a expressão de VacA está associado a uma elevada variabilidade genética que dá origem a uma série de proteínas com diferentes níveis de atividades e, por isso, algumas estirpes de bactérias, em função do tipo de gene VacA, apresentam níveis de inflamação diferentes e por consequência, diferentes tipos de virulência (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008; Suerbaum e Josenhans, 1999).

A ilha de patogenicidade cag (PaI, do inglês, *cag pathogenicity island*) é um grupo de cerca de 30 genes, muitos dos quais codificam o sistema de secreção T4SS, que atravessa a membrana das células epiteliais gástricas, permitindo a translocação de produtos patogénicos da bactéria para as células epiteliais. É através deste sistema de secreção que a toxina CagA, é injetada para as células epiteliais. Esta citotoxina está presente em 50-70% das estirpes de *H. pylori* e é reconhecida pelas células epiteliais como uma molécula de sinalização que afeta a estrutura, diferenciação e o comportamento das células epiteliais estimulando-as a expressar grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-8 (IL-8). Daí, pacientes

que estejam infetados com uma bactéria CagA⁺ apresentarem uma maior resposta inflamatória e possuírem um maior risco de desenvolver patologias gástricas como úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008; Suerbaum e Josenhans, 1999; Robinson *et al.*, 2007).

Além dos fatores de virulência já referidos, outras proteínas também produzidas pela *H. pylori*, desempenham funções importantes na patogênese da infecção. Por exemplo, a catalase, uma proteína localizada no citossol e no espaço periplasmático, desempenha um papel importante na proteção da bactéria contra danos oxidativos no ambiente gástrico através da eliminação de peróxido de hidrogénio (Miyashita *et al.*, 2002). Além desta, a proteína citosólica NAP, desempenha uma importante função na estimulação de células do sistema imune para o local da infecção, uma vez que é capaz de promover a adesão de neutrófilos às células endoteliais da mucosa através da produção de intermediários reativos de oxigénio (ROI, do inglês, *reactive oxygen intermediate*) (Satin *et al.*, 2000).

1.4. Relação com sistema imunitário inato e específico

A *H. pylori* desenvolveu várias estratégias de forma a ultrapassar as barreiras do sistema imunitário inato e adaptativo (Revisto em Amieva e El-Omar, 2008). Devido à permanência da *H. pylori* com os seres humanos durante milhares de anos, esta parece ter-se adaptado de forma a evitar a resposta imunitária do hospedeiro e talvez, manipulá-la por regulação, induzindo uma forma robusta de inflamação crónica, evitando assim, a sua própria eliminação e promovendo a sua coexistência com o ser humano durante décadas (Revisto em Robinson *et al.*, 2007; Suerbaum e Josenhans., 1999). Exemplo de duas estratégias que permitiram esta adaptação é o mimetismo bacteriano e a diversidade genética. A diversidade genética surge pela recombinação e mutação do próprio genoma e pela integração do DNA de outras estirpes de *H. pylori* o que pode contribuir para a sua adaptação a diferentes condições gástricas (Revisto em Kusters *et al.*, 2010).

O reconhecimento da *H. pylori* por células do sistema imunitário inato presentes no epitélio gástrico é considerado um determinante importante da doença. A resposta inflamatória do hospedeiro tem um papel fundamental na interrupção da homeostase ácida, que tem impacto direto sobre os padrões de colonização de *H. pylori* e, assim, o grau de gastrite. Muitos mecanismos possíveis para a falha da resposta do hospedeiro têm sido propostos, e estes incluem a apoptose de células epiteliais e macrófagos, atividade inadequada dos macrófagos e células detriticas, a inibição da função das células T por VacA, e o efeito supressor de células reguladoras (Tregs, do inglês, *regulatory T cells*) (Revisto em Wilson e Crabtree, 2007).

O sistema imunitário inato representa a primeira linha de defesa da resposta imune contra a infecção por *H. pylori*. Esta resposta inespecífica conduz a efeitos antimicrobianos e também à inflamação e danos devido à libertação de mediadores como citocinas, espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) e de óxido nítrico (NO do inglês, *nitric oxide*). Após a sua colonização, as células do sistema imune inato reconhecem a *H. pylori* através de estruturas moleculares conservadas denominadas padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*) como lipopolissacarídeos, lipoproteínas, flagelinas, peptidoglicano e ácidos nucleicos. Por sua vez, os PAMPs são reconhecidos por recetores de membrana como os TLRs (do inglês, *Toll-like receptors*) que são expressos em células epiteliais gástricas e por células especializadas apresentadoras de antígenios (APCs, do inglês, *antigen presenting cells*) tais como macrófagos e células dendríticas (DCs, do inglês, *dendritic cells*). A ativação dos TLRs desencadeia várias vias de sinalização, como a ativação da produção de citocinas, que estimulam a migração de neutrófilos, induzem a ativação de macrófagos e a maturação de células dendríticas na mucosa gástrica, que levam ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Revisto em Robinson e Crabtree, 2007; Kindt *et al.*, 2006).

Por sua vez, esta primeira linha de defesa inata, vai interagir com a resposta imune adaptativa por estimulação da apresentação de antígenios pelas APCs (Fig.2.3). As APCs processam e apresentam os antígenios a outras células do sistema imune, através da apresentação dos fragmentos de peptídeos antígenicos ligados à superfície de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*) de classe I e II. Os antígenios intracelulares (como proteínas vírais) são apresentados por moléculas de MHC I, que ativam linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs, do inglês, *cytotoxic T lymphocytes*) enquanto os antígenios extracelulares são endocitados e apresentados às moléculas de MHC II que ativam linfócitos T auxiliares (Th, do inglês, *T helper cells*) CD4⁺ (Kindt *et al.*, 2006).

Os macrófagos são um grupo de APCs que estão envolvidas na amplificação da resposta inflamatória através da produção de citocinas como IL-1, IL-8, IL-12 e TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor*) enquanto as células dendríticas secretam citocinas, como IL-10, IL-23, e as duas em conjunto, secretam citocinas como IL-12. As DCs, após capturar e processar antígenios, que são transportados e ligados a moléculas de MHC de classe I e II, migram para os órgãos linfóides secundários, conduzindo à ativação dos linfócitos T e à diferenciação dos linfócitos B, iniciando-se assim uma resposta imune específica (Revisto em Wilson and Crabtree, 2007).

A libertação das citocinas produzidas pelas APCs irá estimular a activação e o recrutamento de linfócitos e o desenvolvimento da resposta *T helper*. Classicamente, os linfócitos Th CD4⁺ podem diferenciar-se em 2 importantes classes. Os linfócitos Th1, são produzidos na presença de agentes patogénicos intracelulares e medeiam a resposta imune celular, através da produção de um conjunto de citocinas com o interferão gama (IFN- γ), TNF- α e IL-2. Uma vez secretadas, estas citocinas vão ativar os linfócitos CTLs e aumentar a fagocitose que permite a eliminação das células infetadas através de um mecanismo mediado por anticorpos. Por sua vez, os linfócitos Th2, estimulados na presença de agentes patogénicos extracelulares, medeiam a resposta imunológica humoral através da produção de citocinas como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Após a ativação das células Th, estas vão estimular os linfócitos B para a produção das imunoglobulinas IgA e IgG (Revisto em Wilson e Crabtree, 2007; Robinson *et al.* 2007).

Mais, recentemente, muitos estudos tem incidido sobre o papel das células Tregs e Th17 na infeção por *H. pylori*. Pensa-se que as células Tregs desempenham um papel importante na prevenção da auto-imunidade, alergia e doenças inflamatórias do intestino. Quando induzidas, estas células secretam citocinas como IL-10 ou TGF- β (do inglês, *transforming growth factor*) (Revisto em Robinson *et al.*, 2007). Quanto às células Th17, estudos recentes sugerem que estas desempenham um papel importante na patogénese da *H. pylori*, estando fortemente associadas com a inflamação crónica. No entanto, o mecanismo de diferenciação de células T CD4⁺ em células Th17 durante a resposta inflamatória à infeção por *H. pylori* ainda permanece em discussão. Estas células são caracterizadas como produtoras de IL-17, IL-21 e IL-22 (Zhuang *et al.*, 2011). Na figura 1.5 encontram-se representados os principais mecanismos de persistência da *H. pylori* assim como, a resposta imune do hospedeiro descritas até agora.

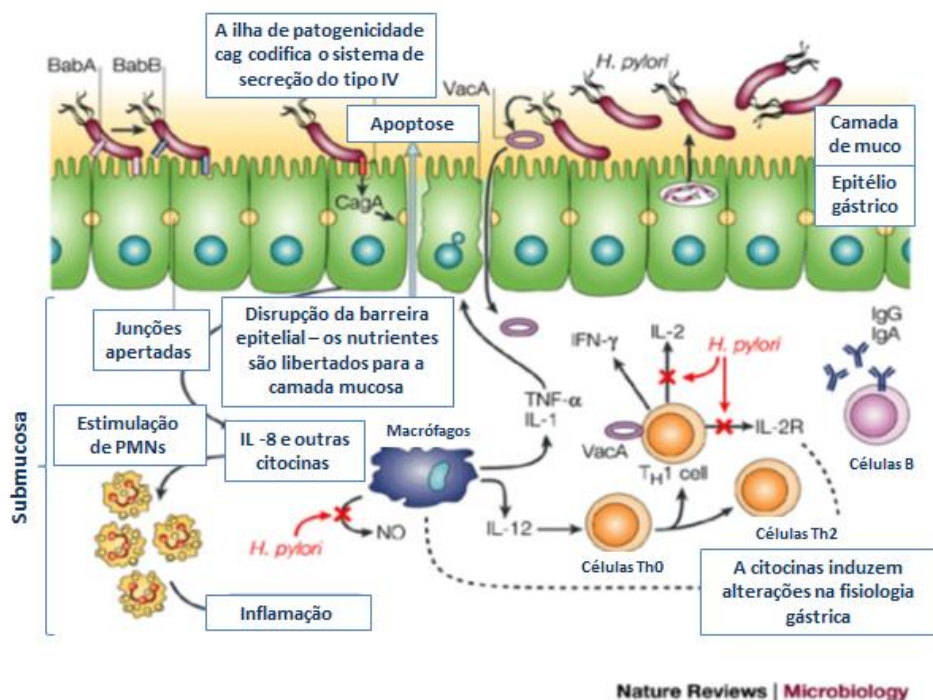


Figura 1.5. Mecanismos de colonização, aderência e interação da *H. pylori* com a mucosa gástrica e a resposta imune inata e adaptativa desencadeada pelo hospedeiro. Adaptado de Monack *et al.* (2004).

1.5. Métodos de diagnóstico

Os métodos para o diagnóstico da infecção por *H. pylori* são classicamente divididos em métodos invasivos e não invasivos. Os métodos invasivos baseiam-se na identificação do microorganismo a partir de amostras de biópsias gástricas, e portanto, é necessária a realização de uma endoscopia. Estes métodos incluem histologia, cultura, teste da urease e testes moleculares. Por outro lado, também estão disponíveis métodos não invasivos tais como, a sorologia, o teste respiratório da ureia (UBT, do inglês, *urea breath test*) e o teste do antígeno fecal (SAT, do inglês, *stool antigen tests*). Os testes serológicos são baseados na detecção de anticorpos específicos IgG anti- *H. pylori* no soro do paciente. Na prática clínica estes testes são os mais utilizados devido à sua precisão, baixo custo e disponibilidade, no entanto, o nível de anticorpos no soro pode permanecer positivo durante anos após a erradicação da *H. pylori* e por isso, este teste não é utilizado para confirmar os resultados do tratamento. A UBT é baseada no princípio da atividade da urease. Este teste é mais preciso do que a sorologia, e por isso é muitas vezes usado como primeira linha de diagnóstico, sendo também bastante útil para confirmar os resultados do tratamento. A UBT foi considerada como o teste não invasivo mais fiável para diagnóstico da infecção por *H. pylori*, uma vez que, revelou elevados níveis de sensibilidade e especificidade antes e pós a terapia. No entanto, o seu custo é relativamente elevado e nem

sempre está disponível pois é necessário pessoal e equipamento especializado. O SAT é um teste recentemente desenvolvido em alternativa à UBT pois é mais barato, simples e fácil de executar, as amostras são obtidas com mais facilidade e os erros de amostragem são menos frequentes pois o antigénio é igualmente distribuído ao longo das fezes. Além disso, este teste também deteta a infeção ativa por *H. pylori*. Este teste pode ser constituído por anticorpos policlonais e monoclonais, no entanto, os testes de anticorpos monoclonais são mais eficazes. Contudo, estes testes são baseados apenas na deteção de um epítipo de um antigénio, geralmente a catalase, para produção de anticorpos monoclonais e, por isso, este teste pode não ser específico o suficiente para a deteção da *H. pylori*. Em consequência disso, estudos de imunoproteómica têm-se focado na deteção de antigénios específicos de *H. pylori* para utilização em testes de diagnóstico mais eficazes. Uma estratégia possível a adotar poderá consistir na seleção adequada de antigénios que visem melhorar o desempenho de testes de diagnóstico como o SAT e método sorológico (Revisto em Ricci *et al*, 2007; Majumdar *et al.*, 2010; Kabir, 2003).

Na generalidade, apesar de todos os testes desenvolvidos até hoje apresentarem alguma precisão no diagnóstico de *H. pylori*, ainda não existe um teste de diagnóstico ideal. Assim sendo, um único teste pode não ser suficiente para fazer o diagnóstico da infeção e por isso, as diretrizes europeias considerem que o diagnóstico deve ser feito por pelo menos dois testes diferentes. Apesar disso, é usual na prática clínica diária utilizar apenas um teste para diagnóstico de infeção, e por isso a escolha do teste certo é o mais importante. A escolha do teste deve ser com base na prevalência da infeção na população, nos sintomas do paciente, tais como a presença de sintomas de alarme, a taxa de probabilidade para um teste positivo e negativo, os custos e a disponibilidade dos testes em diferentes configurações (Revisto em Ricci *et al.*, 2007).

1.6. Tratamentos

Os atuais tratamentos para erradicar a *H. pylori* permitem a eliminação da infeção e contribuem para a cura ou regressão da doença gástrica no caso de gastrites e de úlceras. Estes tratamentos envolvem a combinação de dois antibióticos com um inibidor da bomba de prótons (PPI, do inglês *proton-pump inhibitor*) durante cerca de 1-2 semanas. O PPI suprime a acidez do estômago o que contribui para uma maior atividade do antibiótico e menor irritação do epitélio gástrico lesado. No entanto, cerca de 20 a 30% destes tratamentos falham devido ao aumento da resistência da bactéria aos antibióticos (especialmente contra o metronidazol e a claritromicina) e por isso, em caso de patologia grave, as diretrizes europeias indicam que se deve avaliar a susceptibilidade ao antibiótico antes da medicação dos pacientes. Além disso,

outros fatores como, a falta de adesão do paciente, efeitos secundários, re-infecção e o custo elevado, também podem prejudicar a eficácia dos tratamentos. Sendo assim, existe assim uma crescente necessidade de desenvolver novas estratégias para erradicação da bactéria. Uma estratégia que sem sido amplamente explorada pressupõe a construção de uma vacina preventiva e terapêutica eficaz contra *H. pylori*, que estimula uma resposta humoral e celular, capaz de prevenir e eliminar a infecção (Revisto em Vaira *et al*, 2001; Liu *et al*, 2011; Malfertheiner *et al.*, 2012).

1.7. Vacinas

A estratégia mais lógica para alcançar a prevenção e erradicação da infecção pela *H.pylori*, é a vacinação. Além de apresentar um grande benefício/custo para a saúde pública, a vacinação apresenta outras grandes vantagens, uma vez que evita re-infecções e diminui a resistência a antibióticos que é, no momento, o grande problema associado à terapia com antibióticos. No entanto, a sua pesquisa não tem sido fácil devido à elevada diversidade genética e à robusta estratégia de infecção desta bactéria.

Têm sido realizados vários esforços para o desenvolvimento de uma vacina profilática, para prevenir a infecção, no entanto também é extremamente necessário o seu uso terapêutico na perspectiva de erradicar a infecção já existente. As vacinas terapêuticas surgem como alternativa para os pacientes que já estão infetados, podendo ser utilizadas na "reprogramação" da resposta imune para auxiliar no tratamento com antibióticos e mesmo para eliminar a infecção (Revisto em Robinson *et al.*, 2007).

Estudos de vacinação contra a infecção por *H. pylori* em modelos animais, têm sido fundamentais para o desenvolvimento de estratégias para imunização, sendo que, alguns destes têm mostrado resultados encorajadores, pois foram capazes de induzir uma resposta imunitária protetora que permitiu a redução da colonização gástrica por *H. pylori* (Revisto em Aebischer *et al.*, 2005). Têm sido testadas em modelos animais várias preparações de vacinas contra a *H. pylori*, quer profilaticamente ou terapêuticamente, que na sua maioria, incluem vacinas de *H. pylori* inteiras inativadas ou lisadas, vacinas de antígenos, que são geralmente proteínas antigénicas que podem ser purificadas a partir da *H. pylori* ou produzidas através da tecnologia de DNA recombinante em células hospedeiras como de *Escherichia coli* e, mais recentemente, as vacinas de DNA. Em relação a estes dois últimos tipos de vacinas, tem sido estudados, uma grande variedade de alvos antigénicos com base em estudos de genómica e de proteómica, em função da sua abundância, localização na superfície da bactéria, presença de epítomos de células T, especificidade e sororeatividade. Para mais, dada a variabilidade do genoma de *H. pylori* e a

variabilidade global de alguns antígenos candidatos a vacinas tais como VacA, a construção de uma vacina que contenha múltiplos antígenos e que participem nos diferentes mecanismos envolvidos na patogênese da infecção, pode ter uma eficácia imunogênica muito superior a uma vacina de um único antígeno (Revisto em Wilson e Crabtree, 2007).

De forma a desenvolver-se uma vacina eficiente é primordial entender-se a resposta imunológica associada à infecção e à imunização. Durante a infecção por *H. pylori* deteta-se uma resposta imunitária à infecção maioritariamente do tipo Th1, característica de agentes patogénicos intracelulares (Taylor *et al.*, 2008). No entanto, dada a ineficácia da resposta Th1 na eliminação da bactéria, existe muita controvérsia sobre qual a resposta do sistema imunitário mais adequada para induzir a proteção e a erradicação da bactéria. Há um consenso de que as células T CD4⁺ são fundamentais para induzir proteção contra a *H. pylori* (Ermak *et al.*, 1998). No entanto, a importância das respostas Th1 e Th2 na proteção induzida por uma vacina ainda é muito debatida. Há trabalhos que indicam que a vacina deve desencadear uma resposta imune mista Th1 e Th2 (Chen *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009), enquanto outros sugerem que apenas é necessária a resposta Th1 (Shi *et al.*, 2005; Kamradt *et al.*, 2000) e ainda outros que indicam que apenas a é necessária uma resposta Th2 (Ikewaki *et al.*, 2000; Aebischer *et al.*, 2001).

1.7.1. Estudos em modelos animais

Os primeiros estudos de vacinação contra a *H. pylori* consistiram na administração de células de *H. pylori* mortas inativas e vivas atenuadas. As vacinas de células de *H. pylori* vivas atenuadas teriam a vantagem de conter todos os antígenos de bactérias proporcionando também uma estimulação antigénica contínua, e imunidade celular e humoral semelhantes à eliciada pela infecção natural. No entanto, dada a ineficácia da resposta do sistema imunológico na eliminação da bactéria quando ocorre uma infecção normal, pode-se considerar já excluídas este tipo de vacinas. Para mais, devido à ocorrência de mutações ou uma atenuação ineficaz, pode haver reversão à estirpe virulenta com este tipo de vacinas. Por outro lado, as vacinas de células de *H. pylori* mortas inativas não apresentam o risco de reversão para a estirpe virulenta, no entanto, apenas induzem respostas imunes humorais. Estas vacinas têm revelado alguma eficácia na diminuição da infecção em modelos animais, no entanto, num ensaio clínico em humanos não mostraram qualquer efeito sobre a redução da colonização bacteriana em pacientes infectados com *H. pylori* (Kotloff *et al.* 2001). Por estes motivos estas vacinas, começaram a ser substituídas por vacinas de apenas um antígeno ou uma mistura de alguns antígenos definidos (Revisto em Wilson e Crabtree, 2007; Ingolotti *et al.*, 2010; Bumann *et al.*, 2004).

As vacinas baseadas em antígenos são até agora o tipo mais explorado em estudos com modelos animais, tendo sido testados vários antígenos ou combinações de antígenos como

GroEL, GroES, UreB, NAP, CagA, VaCa, HspA, HpaA em conjunto com diversos adjuvantes, sendo os mais comuns, o adjuvantes das mucosas, LT (do inglês, *Escherichia coli heat labile enterotoxin*) e o hidróxido de alumínio. Na grande maioria destes estudos, foi relatada a eficácia das vacinas, uma vez que estas foram capazes de desencadear respostas imunes humorais e/ou celulares, que levaram à redução significativa da colonização bacteriana (Ferrero *et al.*, 1995; Corthesy-Theulaz *et al.* 1995; Zhou *et al.*, 2009; Nystrom e Svennerholm, 2006; Zhao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2004; Li *et al.* 2012; Wu *et al.* 2008).

Uma outra abordagem de vacinação contra a *H. pylori*, consiste na entrega de antígenos através de vetores vivos tais como por estirpes de *Salmonella typhimurium* atenuada. Neste contexto, alguns trabalhos realizados, baseadas na entrega de antígenos como catalase (Chen *et al.*, 2003), CagA, VacA e UreB (Liu *et al.* 2011) e OipA (Chen *et al.*, 2012), obtiveram resultados promissores na indução de respostas imunes humorais e celulares contra a *H. pylori* e que levaram à redução da infecção.

Mais recentemente, devido a algumas vantagens em relação a outras vacinas, as vacinas de DNA surgiram como uma nova e promissora estratégia de vacinação para a prevenção e/ou erradicação não só da infecção por *H. pylori* mas de outras doenças como HIV (do inglês, *human immunodeficiency virus*), Malária, para as quais também ainda não existe uma vacina eficaz. Uma das grande vantagens das vacinas de DNA é a sua capacidade para induzir respostas imunes humorais e celulares no hospedeiro essenciais para a erradicação de microorganismos como a *H. pylori*. Para mais, estas vacinas apresentam vantagens como, baixo custo, fácil produção e manipulação, elevada segurança e estabilidade, bem como especificidade e flexibilidade pois permitem expressar diferentes tipos de genes de organismos patogênicos pretendidos. No entanto, este tipo de vacinas, apresenta de uma forma geral uma baixa imunogenicidade no hospedeiro humano em comparação com as respostas obtidas em modelos animais de pequeno porte. Neste sentido, é vital desenvolver estratégias para aumentar a expressão dos antígenos assim como a própria imunogenicidade das vacinas de DNA plasmídico. Exemplos deste último tipo de estratégias são a adição de sequências genéticas no DNA plasmídico da vacina para otimizar a expressão do antígeno ou de forma a expressarem outras moléculas que aumentam a imunogenicidade da construção tais como, sequências de direcionamento do antígeno e/ou de sequências pró- ou anti-apoptóticas ou de citocinas ou outros tipos de adjuvantes como sequências de CpG (do inglês *cytosine-phosphate-guanine*). Outros modos de aumento da imunogenicidade são o desenvolvimento de um sistema de entrega do DNA adequado como sistemas de micro- e nano-encapsulação (Carvalho *et al.*, 2010; Greenland e Letvin, 2007).

Até agora alguns investigadores estudaram o efeito de vacinas de DNA na proteção contra a infecção por *H. pylori* em modelos animais, utilizando antígenos como, a catalase (Miyashita *et al.*, 2002) que foram capazes de induzir respostas imunes humorais, HspA e HspB (Todoroki *et al.* 2000) que induziram respostas imunes celulares, e com os antígenos UreB (Dzwoneki *et al.*, 2004; Hatzifoti *et al.*, 2006) e OipA (Chen *et al.*, 2012) que induziram tanto respostas imunes celulares como humorais. Em todos estes trabalhos, foram relatados resultados promissores na redução da infecção pela bactéria.

1.7.2. Ensaios clínicos

Até à data, tem havido relativamente poucos estudos clínicos que testaram a imunogenicidade, segurança e eficácia das vacinas contra a *H. pylori*. Inicialmente, para avaliar a segurança das vacinas contra a *H. pylori*, Kreiss *et al.*, (1997) administraram oralmente a UreB em 12 voluntários saudáveis previamente infetados com *H.pylori*. No entanto, apesar de não se observar resposta protetora, a sua segurança foi provada. Em 1999, foi testada a eficácia das subunidades A e B da urease juntamente com o adjuvante LT, administrada por via oral em voluntários infetados por *H. pylori*. Os resultados indicaram a imunogenicidade da vacina e a redução da carga bacteriana nos grupos de indivíduos vacinados em comparação com o grupo controlo, no entanto, a infecção não foi totalmente eliminada. Além disso, a utilização do adjuvante LT deu origem a efeitos adversos como diarreia severa (Michetti *et al.*, 1999). Mais tarde, observou-se que a administração oral de uma dose mais baixa de LT manteve o seu efeito, mas com efeitos colaterais limitados (Banerjee *et al.* 2002). Noutro estudo, foi também testada a imunogenicidade de uma vacina de células bacterianas inteiras quimicamente inativadas administrada por via oral, com o adjuvante adjuvante LT mutado e destoxificado (LTR192G), em indivíduos com infecção por *H. pylori* e indivíduos não infectados. Nesta experiência, apesar do aumento significativo em anticorpos IgA, não foi possível observar a eliminação da bacteriana (Kotloff *et al.* 2001). Noutro estudo, a administração oral desta vacina conseguiu estimular a produção de células B específicas em indivíduos não infectados (Losonsky *et al.* 2003). Mais recentemente, a administração intramuscular de uma vacina multiantigénica constituída pelas proteínas recombinantes CagA, VacA e NAP, administradas em pacientes por via intramuscular com o adjuvante de hidróxido de alumínio, mostrou ser segura e capaz de estimular respostas imunes humorais e celulares específicas nos indivíduos testados em testes clínicos de fase I (Malfertheiner *et al.*, 2008).

Outra estratégia de vacinação também testada em ensaios clínicos com seres humanos foi a entrega de vacinas de subunidades A e B da urease da *H. pylori* com vetores de *Salmonella* vivos atenuados. Estirpes mutantes como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium com

deleções no gene *phoP/ phoQ*, quando administradas oralmente em oito voluntários adultos saudáveis, não induziu respostas imunes humorais contra a Urease (DiPetrillo *et al.* 1999). Um estudo semelhante, mas utilizando estirpes de *Salmonella enterica* serovar typhimurium, apresentou em 3 de 6 voluntários, a produção de anticorpos IgA contra a UreB da *H. pylori* (Angelakopoulos *et al.*, 2000). Mais tarde, foi testada a pré-imunização com o *S. enterica* serovar Typhi Ty21 e a subsequente administração da vacina com esta estirpe e as subunidades A e B da urease, a qual induziu o aumento das respostas imunes celulares nos voluntários testados (Metzger *et al.*, 2004).

2. Proteína de Ativação de Neutrófilos (NAP)

A proteína de ativação de neutrófilos (NAP, do inglês *neutrophil activating protein*) da *H. pylori*, assim denominada devido à sua capacidade de ativar neutrófilos humanos, é um dos principais fatores de virulência produzidos pela *H. pylori*. Esta proteína, não só representa um importante papel no processo de infecção direto da bactéria mas também, desempenha um efeito imunomodulador que contribui para o desenvolvimento da infecção crônica que pode levar ao desenvolvimento de doenças gástricas.

2.1. Estrutura e mecanismos de ação

A proteína NAP é um dodecâmero em forma esférica, formada por 12 subunidades, cada uma constituída por quatro hélices de 17 kDa. Esta estrutura completa dá origem a uma concha esférica com uma cavidade interna onde o ferro é armazenado (Fig. 2.1). Comparações de sequências de aminoácidos, bem como a estrutura global da proteína, indicam que a NAP pertence à família de proteínas Dps da *E. coli*, que são uma família diversa de proteínas de *stress* bacteriano, cuja expressão é induzida aquando a limitação de nutrientes. Estas proteínas protegem o DNA bacteriano pela sua atividade de ferroxidase e devido à presença de uma carga positiva N-terminal que liga e condensa o DNA. A NAP, não contém uma carga positiva N-terminal, mas, ao contrário dos outros membros da família de proteínas Dps, é caracterizada por uma forte carga positiva na superfície da proteína, que tem sido proposta como a responsável pela ligação e condensação de DNA, o que pode explicar a sua capacidade única para ativar os leucócitos humanos. Além disto, Wang *et al.* (2006) observaram em ratos que a NAP, embora capaz de induzir a liberação de radicais livres de oxigénio, protege a *H. pylori* dos danos oxidativos do DNA induzidos pelo ferro. A NAP é uma ferritina bacteriana (do inglês *bacterioferritin*) e por isso, desempenha um papel importante na fixação do ferro. Esta proteína pode ligar até 500 átomos de ferro por cada dodecâmero e é provavelmente o ferro que desempenha um papel importante na geração da sua estrutura quaternária promovendo a formação de dímeros estáveis que são cruciais para a estrutura em dodecâmero (Revisto em Montecucco *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2010).

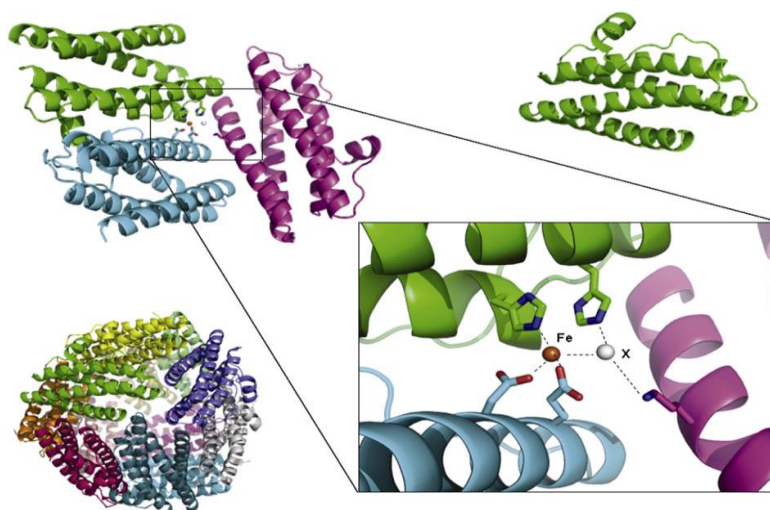


Figura 2.1. Modulação computacional do monômero, trímero e dodecâmero da NAP. Cada subunidade é um feixe de quatro hélices de 17 kDa. Cada três subunidades da NAP ligam-se a um átomo de ferro formando uma estrutura tetraédrica. Por fim, a estrutura final da NAP é um dodecâmero em forma de uma concha esférica com uma cavidade interna onde o ferro é armazenado. Adaptado de Liao *et al.*, (2013).

Tendo em conta que o ferro é um nutriente essencial para o crescimento da maioria das bactérias e sendo o habitat natural da *H. pylori* muito pobre em ferro, todos estes dados indicam que a NAP é importante para a absorção do ferro pela *H. pylori*. No entanto, dados laboratoriais recentes revelam que a NAP é expressa em condições pobres em ferro, e que a sua expressão não é regulada pela presença ou ausência de ferro, sugerindo-se que esta não desempenha nenhuma função na resistência da *H. pylori* aos metais. Uma possibilidade alternativa para a sobrevivência da bactéria, é que a NAP desenvolveu propriedades únicas como uma molécula pró-inflamatória induzindo um estado moderado de inflamação que conduz a alterações das junções epiteliais apertadas (do inglês, *tight – junctions*) e das membranas basais, que possivelmente, promovem o crescimento da *H. pylori* pela liberação de nutrientes no tecido inflamado (Revisto em Montecucco *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2010).

A NAP, localizada no citoplasma da bactéria, é libertada para o meio extracelular, provavelmente após a lise das células, e liga-se à superfície da bactéria, onde pode atuar como uma adesina, mediando a ligação da *H. pylori* às células hospedeiras e à mucosa do estômago, através da interação com glícidos. Uma vez liberada na mucosa gastroduodenal, a NAP atravessa a camada de células endoteliais do estômago onde estimula diretamente a libertação e adesão de leucócitos às células endoteliais. Ao atravessar a camada epitelial, a NAP ativa diferentes fases da resposta inflamatória através da estimulação de mastócitos que produzem citocinas, como IL-6, que por sua vez, ativam neutrófilos e monócitos. Além disso, a NAP pode também atuar diretamente sobre os neutrófilos e monócitos promovendo a ativação e migração para o local de infeção, onde estes sintetizam e libertam várias citocinas e estimulam a

proliferação de mais neutrófilos, monócitos e linfócitos adicionais, essências para a continuação do processo inflamatório. Com isto, a NAP, cria um meio rico em citocinas IL-12/IL-23, que direcionam a diferenciação das células T auxiliares para um fenótipo de tipo Th1, que através da produção de grandes quantidades de IFN- γ e TNF- α e pela ativação de uma cascata citolítica, contribuí fortemente para os danos gástricos. Este subconjunto de células é o mais representado no estômago de indivíduos infetados por *H. pylori* e está associado ao desenvolvimento de doenças gástricas mais graves. Todo este processo encontra-se esquematizado na figura 2.2. (Revisto em Montemurro *et al.*, 2002; Iankov *et al.*, 2011; Choli-Papadopoulou *et al.*, 2001; Montecucco *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2010).

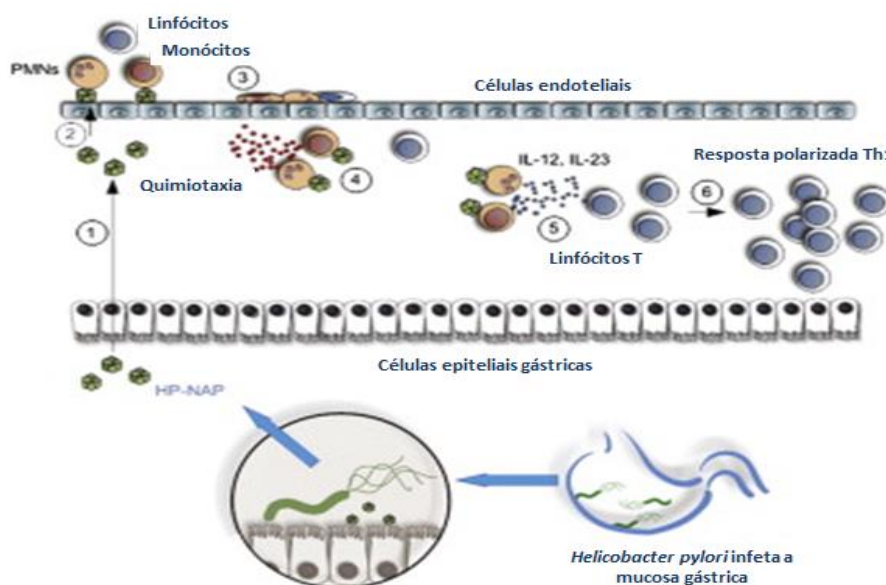


Figura 2.2. Atividade da NAP no desenvolvimento do processo inflamatório associado à infecção por *H. pylori* e a sua atividade imunomoduladora. A NAP, libertada no interior do estômago pela *H. pylori*, atravessa as células epiteliais (1) e o endotélio (2) onde estimula diretamente a adesão e liberação de leucócitos (3). Além disso, esta proteína, uma vez inserida na camada de células epiteliais, ativa neutrófilos e monócitos que segregam citocinas (4). Deste modo, a NAP, ao atuar sobre as células recrutadas, pode contribuir para a manutenção do processo inflamatório. Além disso, a proteína é capaz de criar um meio rico em IL-12/IL-2 (5), que é responsável por induzir a diferenciação das células T auxiliares para um fenótipo de tipo Th1 (6). Adaptado de Bernard *et al.*, (2010).

A ativação de neutrófilos pela NAP induz a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) que são responsáveis pela lesão e inflamação na mucosa gástrica. Este processo envolve uma cascata de eventos de ativação intracelular, como, o aumento da concentração de íons cálcio no citosol e a fosforilação de proteínas do citosol, que leva à formação da NADPH oxidase (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) na membrana plasmática dos neutrófilos. Por sua vez, a NADPH oxidada induz a produção de anião superóxido que é altamente destrutivo para a mucosa gástrica, induz lesões oxidativas no DNA

e leva à lesão da mucosa gástrica e gastrite (Fig. 2.3) (Revisto em Choli-Papadopoulou *et al.*, 2001). Além disso, ao induzir a expressão coordenada de células pró-coagulantes e com atividades antifibrinolíticas, a NAP favorece a deposição de fibrina e por isso, contribui ainda mais para a reação inflamatória da mucosa gástrica provocada pela *H. pylori* (Revisto em Montecucco *et al.*, 2003).

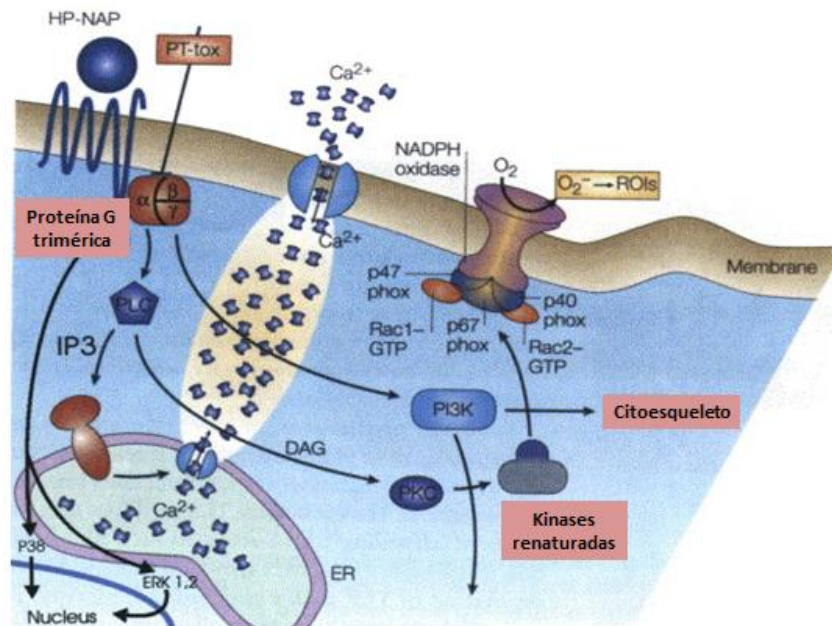


Figura 2.3. Diagrama dos eventos intracelulares envolvidos na ativação dos leucócitos pela NAP. A NAP liga-se a um recetor específico, o qual está acoplado à proteína trimérica G. Com esta interação, a proteína G, ativa a enzima fosfolipase C (PLC) que produz o IP3 (do inglês, *Inositol trisphosphate*), o qual é responsável pela abertura dos canais de cálcio localizados no retículo endoplasmático, permitindo assim a entrada do cálcio nas células pelos canais presentes na membrana plasmática. O recetor da NAP ativado, ativa outra enzima, a quinase PI3K (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*) que em conjunto com aumento na concentração de cálcio no citosol, leva à fosforilação das subunidades citosólicas da NADPH-oxidase e a sua migração para a membrana plasmática. Em consequência, a enzima é ativa e produz o anião superóxido. Rapidamente a NAP ativa as proteínas kinases ERK (do inglês, *Extracellular signal-regulated kinases*) e p38, e esta ativação é essencial para a NAP induzir a formação de aniões superóxido, quimiotaxia e a adesão de neutrófilos humanos. Adaptado de Montecucco *et al.*, (2003).

2.2. Indicador de doenças gástricas

A NAP pode desempenhar um papel importante no processo de carcinogênese gástrica durante a infecção por *H. pylori*. Tendo em conta a sua poderosa ação como estimulante da produção ROS, que causa danos no DNA e consequentemente, aumenta o processo de

renovação celular, pode-se considerar que esta proteína, é um fator de risco para o desenvolvimento de cancro gástrico. Atualmente, é incerto se de facto, a NAP está relacionada com o aparecimento de cancro gástrico, no entanto, entender a relação entre a NAP, o cancro gástrico e os mecanismos moleculares subjacentes, pode levar a melhores abordagens para o controle efetivo do cancro gástrico. Um trabalho recente estudou a positividade de anticorpos específicos da NAP em soros de pacientes com cancro gástrico em comparação com pacientes com gastrite crónica e úlcera péptica. Curiosamente, o valor médio de anticorpos específicos da NAP no soro de doentes com cancro gástrico e úlcera péptica (97,7%) foram significativamente maiores do que em pacientes com gastrite crónica (85,7 %). Estes dados sugerem que a NAP pode ser considerada como um indicador da gravidade da infeção, uma vez que os anticorpos anti-NAP são encontrados na grande maioria dos pacientes com doenças gástricas graves, como cancro gástrico, úlcera péptica e gastrite (Long *et al.*, 2009).

2.3. Antígeno candidato a vacina e testes de diagnóstico

Vários estudos indicam que a NAP pode ser um antígeno relevante na conceção de vacinas e testes de diagnóstico pois, esta proteína, não só já foi identificada em várias estirpes de *H. pylori* (Khoder *et al.*, 2009) mas também revelou ser imunorreativa contra soros de pacientes infetados com *H. pylori* (McAtee *et al.*, 1998). Além disso, vários estudos relatam sobre a elevada imunogenicidade da NAP, tanto em ratos (Satin *et al.*, 2000) como em seres humanos (Malfertheiner *et al.*, 2008), após a infeção por *H. pylori*.

2.3.1. Análises proteómicas e imunoproteómicas

A análise proteómica tem sido muito utilizada para a identificação de biomarcadores característicos de estirpes de *H. pylori*, que estão relacionadas com o desenvolvimento das diferentes patologias gástricas, e que podem ser muito úteis para o desenvolvimento de testes de diagnóstico, bem como permitir a identificação de potenciais antígenos candidatos a vacinas. A imunoproteómica, consiste na combinação da análise proteómica com *Western Blotting* e tem sido amplamente utilizada para investigar a resposta imunitária humoral contra agentes patogénicos como a *H. pylori*. Esta abordagem, ao utilizar soros de pacientes infetados contra estirpes de *H. pylori*, constitui uma ferramenta essencial para detetar os antígenos específicos de *H. pylori* e que podem serem usados no desenvolvimento de terapias, vacinas e métodos de diagnóstico, bem como para investigar possíveis associações entre respostas imunes específicas e as manifestações de doença (Mini *et al.*, 2004).

Em relação à NAP, um estudo a análise do proteoma total de 129 estirpes de *H. pylori* isoladas de pacientes coreanos e colombianos que sofrem de cancro gástrico, úlcera duodenal ou gastrite, identificou 18 proteínas com significância estatística, que podem ser consideradas como biomarcadores discriminantes das diferentes doenças gástricas. Dos 18 biomarcadores, apenas três foram purificados e identificados, sendo estes, a NAP, a *RNA-binding protein* e a *DNA-binding histone-like protein HU* (Khoder *et al.*, 2009). Mais recentemente, num outro estudo, a análise proteómica de 10 estirpes portuguesas isoladas de pacientes colonizados por *H. pylori* (seis com dispepsia não ulcerosa, dois com úlcera péptica e dois com cancro gástrico) e uma estirpe de referência (26695), identificou 23 proteínas, entre as quais a NAP, que foi identificada em cerca de 79% destas estirpes (Vitoriano *et al.*, 2011).

A análise realizada por McAtee *et al.* (1998) de eletroforese bidimensional em gel, para separar e identificar os potenciais antigénios da estirpe ATCC 43504 da *H. pylori*, identificou mais de 30 proteínas, entre as quais a NAP, que regiram fortemente contra um pool de soros provenientes de 14 pacientes infetados. A análise de outras oito estirpes de *H. pylori*, isoladas de pacientes com diferentes patologias gástricas, mostrou que a NAP foi produzida por 7 das 8 estirpes em estudo, sendo que, outros antigénios, como a Urease A e B, as Flagelinas A e B, entre outros, foram produzidos por todas as estirpes. Em semelhança com o estudo anterior, outros investigadores, ao isolar a estirpes G2 da *H. pylori*, verificaram que a NAP era uma das 29 proteínas mais imunorreativas com os soros provenientes de pacientes infetados com *H. pylori* e que sofrem de diferentes patologias gástricas como gastrite, úlcera gástrica ou duodenal, cancro gástrico e linfoma de MALT. Ao compararem os respetivos padrões antigénicos, obtidos com os soros de 16 indivíduos infetados com *H. pylori*, verificou-se que, entre os antigénios mais imunorreativos estava, a Flagelina, que reagiu com os 16 soros testados, em seguida a GroEL com 14, a UreB com 11 e a NAP com 10 (Kimmel *et al.*, 2000). Com um maior número de estirpes, Mini *et al.* (2004) ao sondar 5 soros de pacientes infetados com *H. pylori*, 4 com adenocarcinoma gástrico e 1 com úlcera duodenal, contra as estirpes 328, G39 e 10K da bactéria, observaram que a NAP foi imunorreativa em 3 destes soros. No entanto, antigénios como a proteína ribossomal L7/L12, as Flagelinas A e B e a GroEL, apresentaram melhores resultados uma vez que foram imunorreativos em todos os soros testados. Utilizando análise por ELISA, Satin *et al.*, (2000), testaram amostras de soros de 35 indivíduos infetados com *H. pylori* e observaram que, que 60 % destes continham anticorpos específicos contra o antigénio NAP.

2.3.2. Estudos de vacinação

Satin *et al.* (2000) observaram que, a vacinação oral de murganhos com a NAP juntamente com o adjuvante das mucosas LTK63, foi capaz de induzir uma resposta imune protetora contra a *H. pylori* em 80 % dos murganhos imunizados. Também a vacinação terapêutica intramuscular com proteínas recombinantes como CagA, VacA e NAP e com hidróxido de alumínio induziu uma resposta imune humoral e reduziu a colonização bacteriana e inflamação da mucosa gástrica em cães de raça beagle (Rossi *et al.*, 2004). A segurança e imunogenicidade desta mesma vacina, foi recentemente avaliada num ensaio clínico de fase I e mostrou ser segura e capaz de estimular respostas imunes humorais e celulares específicas nos indivíduos testados (Malfertheiner *et al.*, 2008). Mais recentemente, Sun *et al.*, (2006) utilizando estirpes de *Salmonella typhimurium* atenuada construíram uma vacina com o gene da NAP que, quando administrada por via oral em ratinhos, foi capaz de gerar respostas imunes humorais na mucosa gástrica. Em suma, os resultados destes estudos apontam para a NAP, como um antigénio potencial candidato a vacina, quer isoladamente, quer em conjunto com outros antigénios.

2.3.3. Estudos de conservação genética

A diversidade alélica da NAP também tem sido relatada. Ao analisar as sequências de nucleótidos do gene da NAP de 12 estirpes isoladas de diferentes regiões geográficas, Dundon *et al.* (2001) observaram que a percentagem média de mutações sinónimas, ou seja, alterações em codões que não dão origem a alterações de aminoácidos, e mutações não sinónimas, foram 13,0% e 1,0 %, respetivamente, o que indica a forte conservação da proteína. Além disso, a análise de previsão da estrutura secundária revelou que as poucas alterações nos aminoácidos não alteram a estrutura α – helicoidal da proteína. Neste mesmo estudo, a análise por *Western blot* utilizando um anticorpo monoclonal anti-NAP detetou a proteína em todas as 12 as estirpes em estudo.

Tendo em conta o pequeno número de sequências do gene da NAP analisadas neste artigo, no presente trabalho efetuou-se a análise da variabilidade genética deste gene num número muito mais elevado de estirpes de *H. pylori*, de 51, provenientes dos 4 continentes.

3. Análise da variabilidade genética e estimativa da imunogenicidade da NAP

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Seleção e recolha de dados

As sequências do gene da NAP da *H. pylori* consideradas neste estudo, foram retiradas da base de dados da EMBL - EBI *European Nucleotide Archive* (<http://www.ebi.ac.uk>). No total, foram obtidas 51 sequências, de diferentes estirpes de *H. pylori* provenientes de diferentes localizações geográficas, entre as quais, 14 Europeias, 15 Asiáticas, 15 Americanas, 4 Australianas e 3 Africanas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Representação das diferentes estirpes de *H. pylori* dos cinco continentes (14 Europeias, 15 Asiáticas, 15 Americanas, 4 Australianas e 3 Africanas) a partir das quais foram obtidas as sequências do gene da NAP.

Continente	País	Estirpe	Continente	País	Estirpe
Europa	Espanha	HUP-B14	África		RHP901a
	França	B38		Africa do Sul	SouthAfrica7
	Itália	G27		Gambia	Gambia94/24
		G21	América	Perú	Puno 135
	Holanda	5D			Shi169
		5a			Shi417
		2B			Shi470
		2a			Shi112
	Alemanha	P12			Cuz20
		P79			Sat464
	Rússia	A45			SJM180
	Suécia	HPAG1			PeCan4
	Reino Unido	26695			PeCan18
Lituânia	Lithuania75	USA	J99		
Ásia	China		5060d	8826	
		1811a	Canadá	Aklavik86	
		XZ274		Aklavik117	
		YS39	El Salvador	ELS37	
		YS29		SS1	
		F16		NCTC 11637	
		Austrália			

	Japão	F30			NCTC 11639
		F32			DB2
		F57			
		OK113			
		OK310			
	Coreia do Sul	51			
		52			
	Índia	Santal49			
		Índia7			

3.1.2. Alinhamento das sequências nucleotídicas

O alinhamento das sequências foi efetuado pelo programa *MEGA v6* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) que permite analisar um grande número de sequências em simultâneo com um excelente desempenho e rapidez (Tamura *et al.*, 2007). Neste programa utilizou-se o método *ClustalW* para efetuar alinhamento de sequências de nucleótidos ou de proteínas homólogas.

3.1.3. Análise da variabilidade genética da NAP

A análise da conservação e variabilidade genética da NAP, e de todos os restantes dados genéticos obtidos, baseados nos alinhamentos efetuados no ponto anterior, foi realizada através do programa *DnaSP v5.10* (Librado&Rozas, 2009). De forma a visualizar graficamente as zonas mais conservadas do gene foi utilizado o programa *Jalview* (Clamp *et al.*, 2004). A análise das relações filogenéticas bem como análise das substituições, transições, transversões foi efetuada com o programa *MEGA v6* (Tamura *et al.*, 2007) sendo as árvores filogenéticas desenhadas através do método *Neighbour-Joining* (Saitou&Nei 1987). Nestes estudos não foram consideradas as zonas de gaps ou com ausência de dados, sendo apenas consideradas 432 posições num conjunto total de 438 pares de bases. A região codificante foi definida por utilização do código genético universal.

3.1.4. Análise da antigenicidade

A análise da antigenicidade do gene da NAP foi realizada através de ferramentas bioinformáticas presentes no programa *Lasergene® Protean™* (versão 8, DNASTAR Inc.).

3.1.4.1. Índice antigénico

Para prever as regiões da sequência de aminoácidos mais antigénicas do gene da NAP, efetuou-se o alinhamento das sequências proteicas, pelo mesmo método que os alinhamentos dos genes referido no capítulo anterior, e extraiu-se a sequência consenso da proteína NAP. A sequência consenso obtida foi importada para o programa *Lasergene*® *Protean*TM onde foi utilizado o método Jameson-Wolf (Jameson e Wolf, 1988) para prever potenciais determinantes antigénicos pela combinação de três algoritmos que determinam a estrutura da proteína. Estes três algoritmos são: 1) A hidropatia (algoritmos Kyte-Doolittle e Hoop-Woods), uma vez que, determinantes antigénicos são normalmente encontrados em regiões com um elevado grau de exposição a solventes e que geralmente contêm aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas; 2) A probabilidade de superfície (método de Emini), que dá a probabilidade de uma dada região estar localizada na superfície de uma proteína; e 3) a flexibilidade das proteínas (algoritmo Karplus- Schultz), uma vez que as regiões antigénicas tendem a estar entre as mais flexíveis. Em suma, o "índice antigénico" resultante é uma combinação ponderada destas três medidas e que são úteis para determinar os epítopos B lineares.

3.1.4.2. Antigenicidade para os epítopos T

Para estimar epítopos T, considerou-se o método Rothbard-Taylor que localiza, com uma precisão de cerca de 80%, os potenciais determinantes antigénicos de linfócitos T que contêm motivos de sequências em comum (Rothbard e Taylor, 1988). Para a obtenção de melhores resultados na determinação dos epítopos T, este método foi utilizado em conjunto com dois outros métodos que prevêm a antigenicidade para epítopos *T-helper*, isto é, com elevada afinidade para ligação a moléculas MHC-II. O primeiro, é o método *Sette MHC Motifs* que prevê a antigenicidade para epítopos Th, através da distinção entre diferentes motivos para os haplótipos Ia^d e IE^d (Sette *et al.*, 1989), e o segundo, o método de previsão de anfipaticidade (AMPHI), que utiliza o modelo de Margalit e Berzofsky, para prever também locais antigénicos Th a partir de dados de sequências primárias, com base no facto de que estes locais antigénicos de células T serem compostos de hélices anfipáticas (Margalit *et al.*, 1987).

3.1.5. Análise da antigenicidade e conservação do epítipo selecionado

A análise da conservação do epítipo selecionado foi realizada através das ferramentas do "IEDB Analysis Resource" disponibilizadas pelo IEDB (*Immune Epitope Database*) e do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) através do programa *Mega V6*.

3.2. Resultados e Discussão

3.2.1. Análise da variabilidade genética

A partir do alinhamento das 51 sequências do gene da Nap procedeu-se à análise da conservação e variabilidade genética do gene da NAP através do programa *DnaSP v5.10* (Librado&Rozas, 2009) estando estes resultados representados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Diversidade dos genes alvo da NAP obtido de 51 sequências nucleotídicas, considerando-se para cada sequência 432 pares de bases. Análise genética efetuada aos genes alvo em relação à conservação do gene, número de locais polimórficos (S); número de alelos; diversidade de haplotipo (Hd) determinado pela fórmula de Nei (1987) que implica a substituição de $2n$ por n ; diversidade nucleotídica (π), que representa a média do número de nucleótidos diferentes por local entre duas sequências (Nei, 1987); teste de Watterson ($\theta = 4N\mu$, em que N representa a dimensão da população e μ a taxa de mutação em cada nucleótido por geração) (Watterson, 1975); teste de Tajima (D), para avaliar a hipótese nula de que as mutações são neutras (* indica que os resultados não são significativos: $P > 0,10$) (Tajima, 1989); taxa de recombinação (R) (Hudson, 1987); taxa de recombinação entre locais adjacentes ($r = R/L$, em que L representa a média da distância em nucleótidos entre os locais mais distantes sob recombinação); locais não sinónimos (dN) e o locais sinónimos (dS): razão dN/dS; taxa de substituições sinónimas (K_s) e não sinónimas (K_a).

Dados	NAP (n=51)
Conservação do gene	82.3 %
Nº de locais Polimórficos, S	77 (17%)
Nº de alelos	45
Diversidade do Haplotipo, Hd	0.993
Diversidade Nucleotídica, π	0.03060
Teste de Watterson, θ	0.03962
Teste do Tajima's, D	-1.02921
Recombinações	76,1
R, entre locais adjacentes:	0,1754
Locais sinónimos (dS)	85.64
Locais não sinónimos (dN)	346.36
Razão dN/Ds	4.044
Taxa de substituições sinónimas (K_s)	11 %
Taxa de substituições não sinónimas (K_a)	1 %

O valor obtido da análise da percentagem de identidade, ou seja, o grau de conservação (similaridade) entre as 51 sequências nucleotídicas do gene da NAP foi de 82.3 %. Para mais, a percentagem média de mutações sinónimas (K_s) obtida foi de aproximadamente 11%, e de mutações não sinónimas (K_a), de 1 %. Estes resultados estão de acordo com valores obtidos por Dundon *et al.* (2001) que ao analisar sequências de 12 estirpes obtiveram valores de $K_s=13\%$ e $K_a=1\%$. Suerbaum *et al.* (2008) avaliaram a variabilidade genética do gene VacA de 63 estirpes de *H. pylori* obtidas de isolados pacientes da Alemanha (9), Canadá (33) e África do Sul (21) e obtiveram valores médios de $K_s= 11,6\%$ e $K_a = 2.45\%$ e um grau de conservação de 74,6 %. Estes dados sugerem que, comparativamente ao gene VacA, o gene da NAP é mais conservado o que constitui uma vantagem na conceção de vacinas e testes de diagnóstico em relação ao antígeno VacA.

Da análise anterior, também se observaram 45 alelos, sendo este número quase tão elevado quanto o número de sequências analisadas (51), o que indica alguma variabilidade genética da NAP e que portanto, não existe nenhum alelo predominante na população. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Go *et al.* (1996) que registaram por eletroforese enzimática multi-locus (MLST, do inglês *Multi-Locus Sequence Typing*), 73 perfis alélicos diferentes da *H. pylori* em 74 isolados de estirpes de *H. pylori* obtidas de pacientes com gastrite, úlcera duodenal e gástrica. Outros autores, ao identificarem um elevado número de alelos para outros genes como VacA, flaA, flaB e CagA, indicaram que a *H. pylori* apresenta uma elevada variabilidade genética apresentando uma estrutura clonal apenas durante um curto período após transmissão. Estes autores também sugerem que a origem desta diversidade pode estar relacionada com fatores como, uma elevada taxa de mutação e com mecanismos de reparação e recombinação de DNA (Suerbaum *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1997).

De forma a estimar-se a taxa de mutação, foi efetuado o teste de Watterson (1975) e observou-se que o gene da NAP apresenta uma taxa de mutação (θ) ligeiramente superior, mas muito próxima da diversidade nucleotídica (π). No entanto, os resultados indicam que este gene apresenta uma taxa de recombinação entre locais adjacentes (r) superior à taxa de mutação, o que indica que a variabilidade genética da NAP é provavelmente devida, em maioria, a fenómenos de recombinação. De facto, diversos estudos indicam, que a elevada frequência de eventos de recombinação parecer ser a principal causa para a variabilidade em *H. pylori* (Achtmann & Suerbaum, 2000; Suerbaum *et al.*, 1998). Além disso, estes autores sugerem que pode ocorrer recombinação entre as diferentes estirpes de *H. pylori* quando um paciente está infetado com mais do que uma estirpe durante a infeção crónica por *H. pylori*, e ainda especulam sobre a hipótese de a recombinação poder proporcionar uma vantagem seletiva para a sobrevivência de algumas estirpes de *H. pylori* no estômago humano (Suerbaum *et al.*, 1999). Suerbaum *et al.* (1988), efetuaram um estudo de recombinação em *H. pylori* com os genes flaB,

vacA, flaA onde compararam os resultados com *N. meningitidis*. Neste estudo, conclui-se que *H. pylori* é panmítica, apresenta uma elevada taxa de recombinação e encontra-se em equilíbrio de ligação (do inglês, *linkage equilibrium*).

Para avaliar a hipótese nula da ocorrência de mutações neutras, ou seja, resultante do acaso, recorreremos ao teste estatístico de Tajima, D (1989). Este teste é baseado na diferença entre o número de locais segregados e o número médio da diferença de nucleótidos. Os resultados mostram um valor do teste D negativo (-1.02921), que não tem significado estatístico, e portanto, pode-se especular a possibilidade de estar a ocorrer uma seleção estável ou uma seleção direcional para este gene.

O valor da razão dN/dS obtido foi de 4.044, portanto superior a 1, pelo que podemos concluir que está a ocorrer uma diversificação genética sob uma seleção positiva. Para mais, o número locais não-sinónimos observado (346.36), também indica que provavelmente está a ocorrer uma seleção positiva e direcional. Pode-se especular que esta seleção seja devida à alteração recente dos hábitos de higiene na população humana, que pode tornar alelos que são mais vantajosos em menos vantajosos, redirecionando a seleção de variantes antigénicas.

Após a análise das sequências nucleótídicas do gene da NAP, efetuou-se a tradução das mesmas para sequências proteicas. O resultado do alinhamento das 51 sequências proteicas do gene NAP, a sequência consenso obtida, bem como a representação gráfica das suas zonas mais conservadas, que representam 88,3 % do total da proteína, obtidas através do programa *Jalview* (Clamp *et al.*, 2004), estão a representadas na figura 3.1.

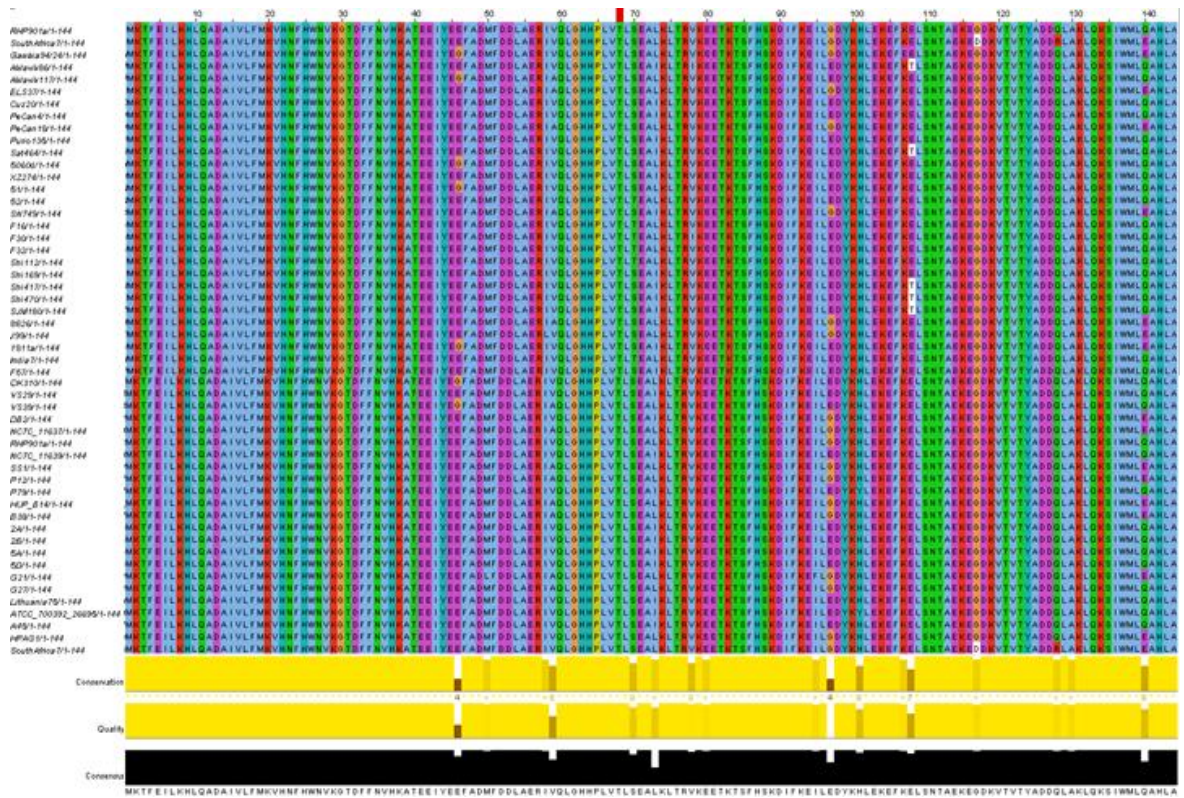


Figura 3.1. Alinhamento das 51 seqüências proteicas do gene da NAP, a seqüência consenso obtida e a representação gráfica das zonas mais conservadas do gene (88,3 %).

3.2.2. Transições e transversões

De acordo com o registado por Wang *et al.* (1999), as taxas de transição são superiores às de transversão, facto que também podemos observar nos resultados obtidos e representados na tabela 3.3. Os valores de K_1 , K_2 e R indicam que, o gene NAP, apresenta variabilidade genotípica e uma predominância das transições das pirimidinas relativamente às purinas.

Tabela 3.3. Prevalência das substituições por transição e transversão para o gene da NAP. Também estão apresentadas as frequências de ocorrência de cada nucleótido e as razões entre as taxas de transição e transversão. Os valores são referentes à probabilidade de substituição de uma base por outra, dada por R, onde $R = [A * G * k1 + T * C * k2] / [(A + G) * (T + C)]$. Todas as posições que contêm gaps e dados em falta foram eliminadas. A substituição de nucleótidos foi estimada pelo método de *Maximum Composite Likelihood* no programa *Mega v6*.

	A	T	C	G
A	-	3.3	2.36	11.36
T	4.43	-	17.83	2.41
C	4.43	24.92	-	2.41
G	20.89	3.3	2.36	-

**Frequência dos nucleótidos: A: 35.43% ; T: 26.41% ; C: 19.26%; G: 18.90%.
Razão entre as taxas de transição em relação às taxas de transversão para as purinas, $k1 = 4.715$, e para as pirimidinas de $k2 = 7.543$. Taxa global de transição/transversão, $R = 2.818$**

3.2.3. Análise filogenética

A elevada variabilidade devido a recombinações na *H. pylori*, pode não permitir detetar relações clonais entre estirpes próximas. No entanto, é possível que entre regiões geograficamente muito afastadas conseguir-se observar relações entre genes, como por exemplo, o observado por Yamazaki *et al.* (2005) nos genes CagA e VacA, em que se conseguiu distinguir claramente as estirpes asiáticas das europeias em árvores filogenéticas, assim como a presença destes genes em patologias mais graves. Estes autores sugerem que estes agrupamentos clonais resultam da seleção de variantes antigénicas que proporcionam uma vantagem seletiva em determinadas regiões geográficas (Revisto em Suerbaum *et al.* 1998). No entanto, análises por MLST em alguns genes de *H. pylori* detetam vestígios de descendências clonais entre ancestrais comuns distantes, o que indica que ainda é possível detetar descendências clonais entre estirpes panmíticas de *H. pylori* (Achman e Suerbaum, 2000).

Como se pode observar na árvore filogenética obtida para o gene da NAP, salvo algumas excepções (como por exemplo o facto de aparecer uma estirpe do Perú no aglomerado das estirpes Asiáticas), observa-se a formação de pequenos aglomerados para algumas estirpes com a mesma origem geográfica, por exemplo para as estirpes Asiáticas, Europeias e Americanas. Neste estudo, não foi avaliado a relação entre a NAP e o risco de doença devido à ausência de informação.

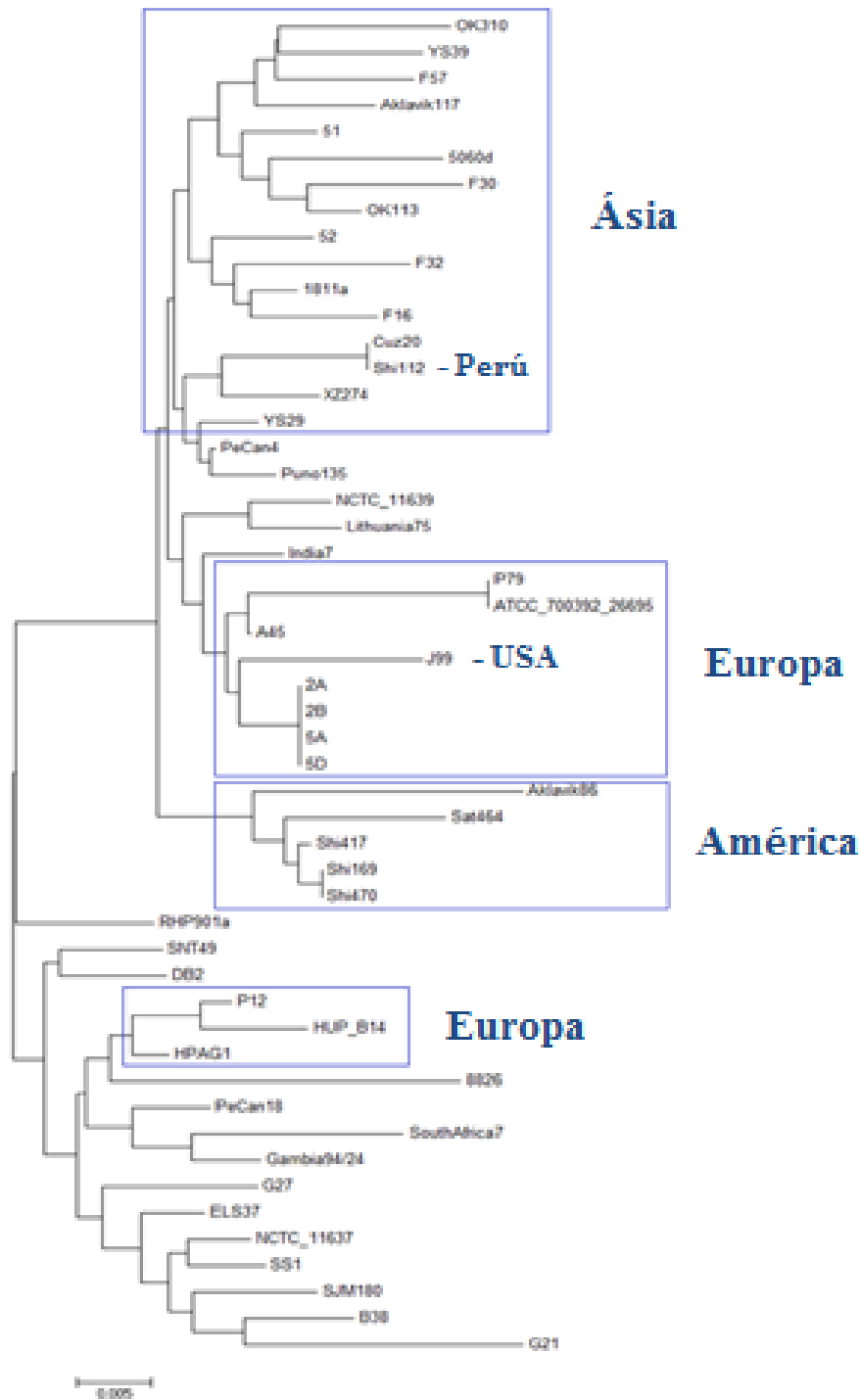


Figura 3.2. Árvore filogenética do gene da NAP. A história evolutiva foi inferida utilizando o método de *Neighbor-Joining*. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos dos ramos nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas, foram calculadas através do método de *Maximum Composite Likelihood* (Tamura *et al.*, 2004), e a unidade representa número de substituições de bases por local.

3.2.4. Análise da antigenicidade

3.2.4.1. Sequência consenso

Para o desenvolvimento de uma vacina proteica ou de DNA multi-antigénica ou de um teste de diagnóstico baseado na NAP, é relevante caracterizar a antigenicidade desta proteína assim como os locais mais antigénicos. Para tal, estimou-se bioinformaticamente a antigenicidade da sequência de aminoácidos consenso da NAP, através dos seguintes métodos: o Índice Antigénico (Jameson-Wolf), que contém os epítomos de células B; os motivos de células T (Rothbard-Taylor), com os epítomos de células T; e os epítomos de células *T helper*, com elevada afinidade para ligação a moléculas MHC-II (Métodos AMPHI e *Sette MHC Motifs*).

Uma das razões que pode levar a baixa eficácia das vacinas e testes de diagnóstico contra a *H. pylori* é a elevada variabilidade genética desta bactéria. Como mostram os resultados anteriores, não existe nenhum alelo predominante na natureza para o gene da NAP, e por isso, de modo a incluir a variabilidade deste gene na construção de uma vacina e de um teste de diagnóstico, é muito importante que a região da sequência de DNA selecionada seja a mais conservada quando possível. Para mais, uma vez que foram determinadas as regiões nos genes onde ocorrem mutações sinónimas e não sinónimas, deve-se tentar selecionar fragmentos com ausência de substituições não-sinónimas e com o menor número de locais de substituições sinónimas possíveis, pois apesar de não se traduzirem numa alteração do aminoácido codificado, sabe-se que se trata de uma região variável do gene. Em suma, para a seleção do fragmento alvo do gene da NAP deve-se ter em conta, não só as regiões mais antigénicas da proteína, mas também, as mais conservadas entre diferentes estirpes de *H. pylori* (Fig. 3.3).

Uma vacina tem por objectivo a prevenção de doença mas pode também atuar como terapêutica. Como mencionado acima (secção 1.7), apesar de ainda não se saber qual o tipo de resposta imune protetora que confere proteção contra infeções de *H. pylori*, existe um consenso de que as células T CD4⁺ são essenciais para essa proteção. Nesta perspectiva, para obter as regiões mais antigénicas da proteína, foram determinadas zonas de ligação aos epítomos B e aos epítomos T com afinidade para ligação a moléculas MHC-II.

Como se pode observar na figura, foi difícil encontrar regiões que fossem, em simultâneo, antigénicas para epítomos B e Th, uma vez que as regiões mais ricas em epítomos B são menos ricas em epítomos T e vice-versa. Além disso, a zona mais conservada do gene, que corresponde aproximadamente aos 45 primeiros aminoácidos, também não corresponde à zona mais antigénica, o que dificultou ainda mais, a escolha de uma zona que fosse em simultâneo

imunogénica para epítomos B e T e conservada. Sendo assim, optou-se pela seleção de uma região com valores menos elevados de antigenicidade B, mas que apresentassem boa antigenicidade em epítomos Th e que fosse moderadamente conservada. Por isso, selecionou-se o fragmento GTDFFNVHKATEEIYEEFADMFDLLAERIVQLGHHPLVTLSEALKLTR VKEETKT de 55 aminoácidos localizado entre os 30 e os 85 resíduos de aminoácidos (Fig. 3.3).



Figura 3.3. Determinação das regiões mais antigénicas da proteína consenso NAP no programa *Lasergene*® *Protean*TM. A representação esquemática inclui: a sequência de aminoácidos; o índice antigénico (Jameson-Wolf) com base nos 3 algoritmos, probabilidade de superfície, hidrofobicidade e regiões flexíveis; os epítomos de células T (Rothbard-Taylor); e os epítomos de células *T helper* com elevada afinidade para ligação a moléculas MHC-II (métodos AMPHI *Sette MHC Motifs*) e as regiões mais conservadas do gene. A região antigénica da NAP selecionada está assinalada por um rectângulo a vermelho.

3.2.4.2. Sequências do gene da NAP de diferentes estirpes de *H. pylori*

De forma a detetar possíveis diferenças entre o perfil de antigenicidade das sequências proteicas da NAP de algumas estirpes de *H. pylori* e o perfil da sequência consenso, introduziu-se algumas sequências proteicas da NAP de diferentes estirpes no programa *Lasergene*® *Protean*TM.

De uma forma geral, observou-se que maioria das sequências apresentam um perfil antigénico semelhante ao da sequência consenso, o que era de esperar, uma vez que a sequência consenso representa os resíduos de aminoácidos mais comuns entre todas as sequências analisadas. No entanto, em algumas estirpes, como por exemplo, nas estirpes europeias de *H. pylori* 26695 e P79 (Fig. 3.4), nas Americanas Sat464 e Aklavik86 (Fig. 3.5) e na Asiática F30 (Fig. 5.6), observou-se pequenas diferenças no perfil antigénico, mais especificamente, nos motivos de células T e nas regiões AMPHI.

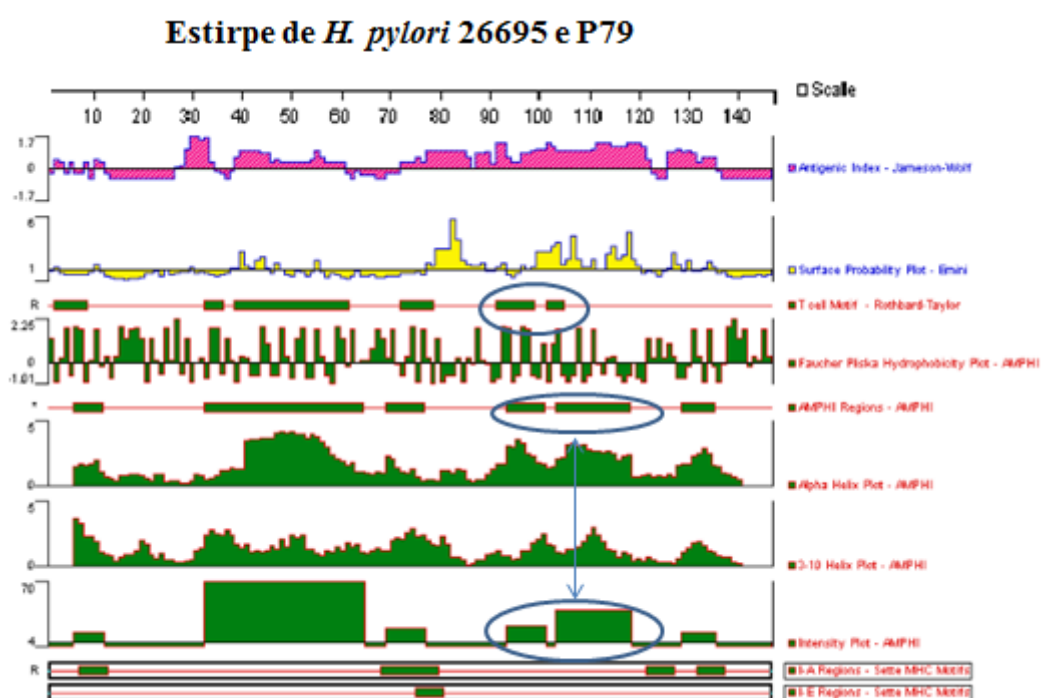


Figura 3.4. Determinação das regiões mais antigénicas da proteína NAP das estirpes 26695 e P79 pelo programa *Lasergene*® *Protean*TM com indicação das alterações em relação à sequência consenso.

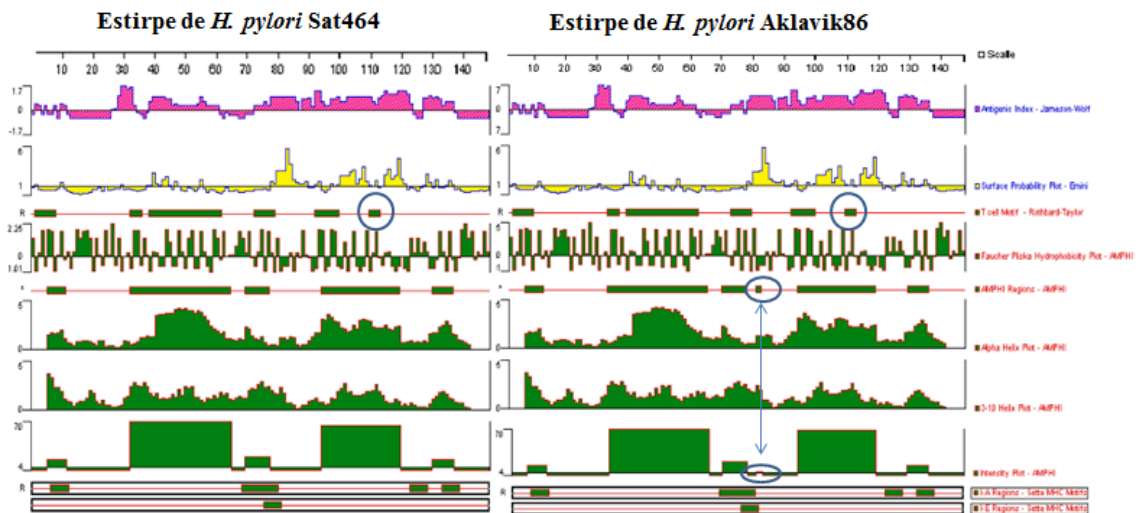


Figura 3.5. Determinação das regiões mais antigênicas da proteína NAP das estirpes Sat464 e Aklavik86 pelo programa *Lasergene*® *Protean*TM com indicação das alterações em relação à sequência consenso.

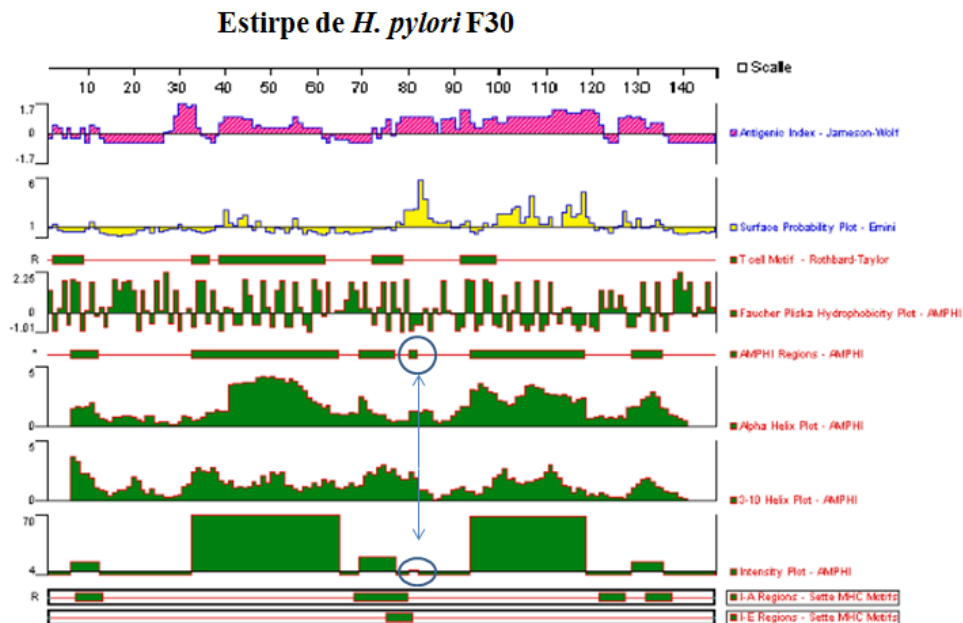


Figura 3.6. Determinação das regiões mais antigênicas da proteína NAP da estirpe F30 pelo programa *Lasergene*® *Protean*TM com indicação das alterações em relação à sequência consenso.

Observa-se na figura 3.4 que as alterações observadas no perfil antigênico nos motivos de células T e nas regiões AMPHI, nas sequências de aminoácidos das estirpes 26695 e P79, podem ser consequência de uma mutação no aminoácido 101, onde ocorreu a substituição do aminoácido histidina por tirosina. Na estirpe F30 (Fig. 3.6), a alteração observada no perfil antigênico das regiões AMPHI deve-se a uma mutação no aminoácido 78 (substituição do aminoácido valina por isoleucina), enquanto nas estirpes Sat464 e Aklavik86, a diferença de

antigenicidade observada nos motivos de células T, deve-se a uma mutação no aminoácido 108 (substituição do aminoácido ácido glutâmico por treonina).

Pelo contrário, observou-se que as mutações não sinónimas nas sequências do gene da NAP das estirpes J99 (substituição nos aminoácidos: 46 - ácido glutâmico por glicina; 140 - ácido glutâmico por glutamina), SS1 (substituição nos aminoácidos: 59 - valina por alanina; 97 - ácido glutâmico por glicina; 140 - glutamina por ácido glutâmico) e OK310 (substituição no aminoácido 46 - ácido glutâmico por glicina), representadas na figura 3.1., não alteraram o perfil de antigenicidade em relação ao da sequência consenso.

3.2.5. Conservação e especificidade dos epítomos

O grau de conservação do fragmento antigénico selecionado, representa um fator crítico para eficácia de uma vacina. Como tal, após a seleção da região mais antigénica e conservada da proteína em estudo, determinou-se o seu grau de conservação, através da ferramenta “*Epitope Conservancy Analysis*” pelo método de análise “*Epitope linear sequence conservancy*” por comparação com todas as sequências usadas. Esta mesma análise foi também efetuada por comparação com sequências equivalentes de diferentes estirpes de *H. pylori* presentes na base de dados “*Nucleotide collection*” do programa BLASTN do NCBI utilizando o programa MEGA v6. Verificou-se em ambas as análises, que a percentagem de similaridade foi superior a 95 %, o que indica um elevado grau de conservação. Além disso, de forma a evitar desencadear respostas imunitárias contra microrganismos não patogénicos e que podem fazer parte da flora microbiana normal do hospedeiro, é de extrema relevância que a proteína antigénica selecionada seja específica da *H. pylori*. Para isso, avaliou-se a especificidade do fragmento escolhido através da análise da sua homologia com proteínas de todos os outros microrganismos, usando a base de dados “*Microbial DataBase*” através da ferramenta “*genomic BLAST*” do programa BLASTN do NCBI, a qual não revelou nenhuma correspondência. Por fim, é também relevante que a sequência escolhida não apresente homologia com as sequências humanas, que poderia ser responsável pelo desenvolvimento de respostas auto-imunes. Para isso, procedeu-se à análise do fragmento antigénico selecionado pela ferramenta “*BLAST Human Sequences*” do NCBI por BLASTN com a base de dados “*RefSeqgenomic*”, a qual não revelou nenhuma homologia.

4. Análise da Imunovariabilidade da NAP

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Construção dos plasmídeos pVAX-NAP e PQE30-NAP

4.1.1.1. Isolamento do DNA genómico da *H. pylori* 26695

A estirpe de *H. pylori* 26695 foi crescida em placas com meio Columbia (OXOID, Campygen™, Reino Unido) com 5% de sangue de cavalo (Nalgene, USA) e incubadas a 37 °C durante 48-72 horas dentro de caixas com saquetas de microaerofília (1 saqueta/2,5 L de volume) (OXOID, Campygen™, Reino Unido). Após crescimento, a biomassa foi recolhida com 50% PBS (do inglês, *Phosphate buffered saline*) (GIBCO®, LifeTechnologies™, Portugal) e as células separadas por centrifugação (13.000 rpm, 1 min, 22 °C) (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha). O isolamento do DNA genómico foi efetuado em colunas de sílica utilizando um kit de extração de DNA genómico (NZYTech, Portugal), segundo o protocolo descrito pelo fabricante (*NZY Tissue gDNA Isolation Kit protocol*). Este kit utiliza tampões de lise que contêm a enzima proteinase K e SDS (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*), que permite libertar o DNA das células. Depois, o DNA é seletivamente absorvido pela coluna e as impurezas, tais como proteínas e sais, são removidas durante os passos de lavagem. Após isolamento, o DNA foi quantificado segundo o protocolo descrito em 4.1.1.7.

4.1.1.2. Amplificação do gene NAP por PCR

Com o objetivo de extrair o gene da NAP do DNA genómico da *H. pylori* 26695, obteve-se a sequência do genoma completo da estirpe de *H. pylori* 26695 e do respetivo gene da NAP, através da base de dados *GeneBank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Estas sequências foram inseridas no programa *Jellyfish 3.3.1* para a obtenção dos *primers* desenhados de acordo com a figura 4.1.:

- **Forward** - cuja extremidade 5' inclui a sequência sinal peptídica hidrofílica DYKDDDDK, designada por *tag-FLAG* e o local de restrição para a enzima *Pst I*: 5'-CTA GCT AGC GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG TAG ATG AAA ACA TTT GAA ATT C -3';
- **Reverse** - com o local de restrição para a enzima *Nhe I*: 5'- AAC TGC AGT TAA GCC AAA TGG GCT TGC -3'.

A presença do *tag* - FLAG permite mais tarde confirmar a presença do *insert* (FLAG-NAP) por imunofluorescência, através do seu reconhecimento específico por um anticorpo anti-FLAG produzido em rato (Sigma Aldrich, Alemanha).

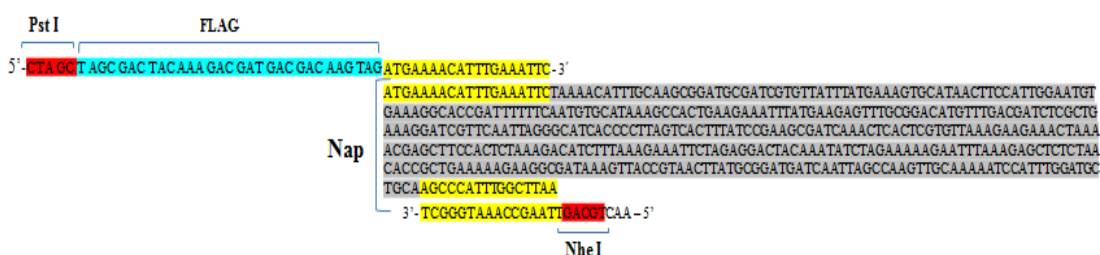


Figura 4.1. Desenho dos *primers forward* e *reverse*, com indicação da sequência nucleotídica do gene da NAP de 435pb (cinza), das enzimas de restrição *Pst I* e *Nhe I* (vermelho), da *tag*-FLAG (azul) de 31pb e das zonas de hibridação (amarelo), para a amplificação do gene da NAP a partir do genoma da estirpe 26695 da *H. pylori*.

A partir do DNA obtido no ultimo passo (secção 4.1.1.1.), o gene da NAP da *H. pylori* 26695 foi amplificado num termociclador (Biometra® Tpersonal, Alemanha) utilizando os *primers forward* e *reverse*, nas condições de PCR (do inglês, *Polymerase chain reaction*) indicadas nas tabelas 4.1. e 4.2.

Tabela 4.1. Condições da reação do PCR para ampliar o gene NAP.

Primers (NZYTech, Portugal)	20 pmol
DNA genómico da <i>H. pylori</i> 26695	0, 258 µg
NZYTaq 2 × Green Master Mix (NZYTech, Portugal)	25 µl
H₂O ultrapurificada	até 50 µl

Tabela 4.2. Ciclos do PCR programadas no termociclador para ampliar o gene NAP.

Passos	Temperatura (°C)	Tempo	Nº Ciclos
Desnaturação inicial	95	5 min.	1
Desnaturação	95	30 s	30
<i>Anneling</i>	58 °C	30 s	
Extensão	72 °C	40 s	
Extensão final	72 °C	10 min.	1

4.1.1.3. Análise por restrição por eletroforese em gel de agarose

Para confirmar a amplificação do gene NAP de 479 pb (FLAG-Nap), foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose 1% (NZYTech, Portugal) dissolvido por aquecimento em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) (1,14 ml de ácido acético glacial, 2ml de EDTA 0,5 M e 4,8 g/l de Tris-base, pH 8,0). A esta solução foi adicionado 5 µl de *Green Safe Premium* (NZYTech, Portugal), que permite a detecção do DNA por emissão de fluorescência verde quando ligado ao DNA ou RNA. Como marcador de peso molecular usou-se o *NZYDNA Ladder III* (NZYTech, Portugal). Seguiu-se a corrida das amostras com uma voltagem constante de 85V durante 30 minutos utilizando o sistema de fornecimento de energia *Power Pack 300* (Bio-Rad, Portugal). Para a visualização do DNA utilizou-se o transluminador *Gel Logic 100 Imaging System Kodak* (UVitec, Cambridge, Reino Unido) e a imagem foi processada com o programa *Molecular Imaging v.4.0.3 Kodak MI* (UVitec, Cambridge, Reino Unido).

4.1.1.4. Purificação do gene da NAP amplificado por PCR

Após confirmação da banda de 479 pb por comparação com o padrão molecular, a amostra foi purificada através do kit de purificação de DNA *NZYGelpure* (NZYTech, Portugal) segundo o protocolo de purificação de amostras após PCR e reações enzimáticas, sugerido pelo fabricante (*Protocol for PCR clean-up or DNA purification from enzymatic reactions*). Este kit utiliza uma membrana de sílica em gel que adsorve seletivamente até 20 µg de fragmentos de DNA na presença tampões de ligação específicos, e as impurezas que não se ligam à membrana são lavadas. Em seguida, o DNA obtido foi quantificado segundo o protocolo de quantificação de DNAs descrito em 4.1.1.7.

4.1.1.5. Digestão do gene da NAP e dos vetores pVAX e PQE30 com as enzimas *Pst I* e *Nhe I*

Para fins de clonagem, o gene NAP e os vetores pVAX, vetor de expressão em células eucariotas (Invitrogen, Reino Unido) e PQE30, vetor de expressão em células procariotas (Qiagen, Alemanha) representados na figura 4.2., foram digeridos com as enzimas de restrição *Pst I* e *Nhe I* (NZYTech, Portugal) nas condições de reação indicadas na tabela 4.3. e a mistura reacional submetida, a uma temperatura de incubação de 30 minutos a 37 °C e 20 minutos a 80 °C, para inativação das enzimas.

Tabela 4.3. Condições de reação da digestão dos vetores PVAX e PQE30 e do gene da NAP com as enzimas *Pst I* e *Nhe I*.

Enzimas (<i>Pst I</i> e <i>Nhe I</i>)	1 µl
DNA	3 µg
NZYSpeedyBuffer Orange 10x (NZYTech, Portugal)	2 µl
H₂O ultrapurificada	20 µl

Para confirmar o sucesso da digestão, as amostras foram corridas num gel com 1% de agarose, descrito na secção 4.1.1.3, e purificadas através do kit de purificação de DNA *NZYGelpure* (NZYTech, Portugal) descrito em 4.1.1.4. Após purificação, as amostras foram quantificadas segundo o protocolo descrito em 4.1.1.7.

4.1.1.6. Clonagem do gene da NAP nos vetores pVAX e PQE30

Com os DNAs obtidos no último passo, efetuou-se a clonagem do gene NAP em ambos os vetores de clonagem pVAX e PQE30 nos locais de restrição *Nhe I* e *Pst I* (Fig.4.2) com a enzima *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher Scientific, Portugal) nas condições de reação indicadas na tabela 4.4., seguindo-se uma incubação de 16 °C, durante a noite, e 10 minutos a 65 °C, para inativação da enzima.

Tabela 4.4. Condições da reação da clonagem do gene da NAP nos plasmídeos pVAX e PQE30.

Vetor	50 ng
Gene NAP	224,8 ng
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
H₂O ultrapurificada	Até 20 µl

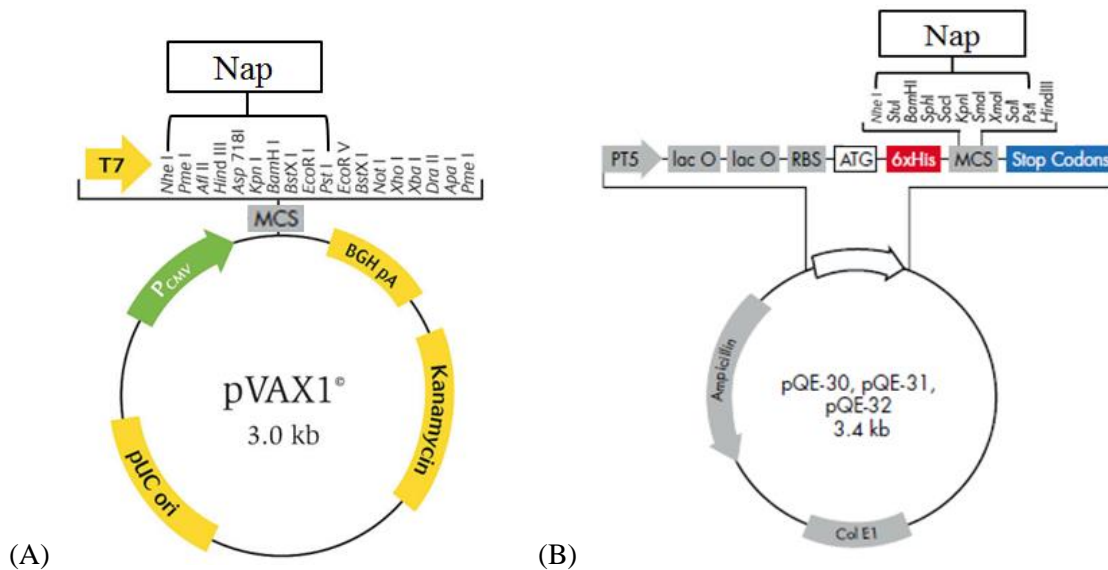


Figura 4.2. Representação esquemática dos plasmídeos recombinantes pVAX-NAP e pQE30-NAP. (A) pVAX de 3.0 kb com os elementos: P_{CMV} - Promotor de citomegalovírus humano, para uma elevada expressão de proteínas em células de mamíferos; BGH pA- Hormona de crescimento bovino-sinal de poliadenilação, para uma eficiente terminação da transcrição e poliadenilação do RNA; Gene de resistência a canamicina para seleção em *E. coli* ; pUC ori – Origem de replicação, para elevados rendimentos de produção; Promotor T7 –para a transcrição *in vitro* e sequenciação através do *insert*; MCS- *Multiple cloning Site*, para a inserção de genes. (B) pQE30 de 3.5 kb com os elementos: PT5- Promotor T5; lac O – operação da lactose para o transporte e o metabolismo da lactose em *E. coli*; 6xHis- Cauda de 6 histidinas, para purificação da proteína expressa; MCS; Col E1 – Origem de replicação; Gene de resistência a ampicilina.

Em seguida, as células de *Escherichia coli* NZY5α (NZYTech, Portugal) tornadas competentes segundo o protocolo de transformação em células competentes Ca⁺⁺, foram transformadas pelo método de choque térmico com os dois plasmídeos pQE30-NAP e pVAX-NAP (10 µl da mistura da reação de ligação foi incubada em 100 µl células). Do *pellet* obtido da centrifugação, as células transformadas foram ressuspensas em 200µl de meio SOC e plaqueado em meio 2×TY, suplementados com 100µg/ml de canamicina (NZYTech, Portugal) para o pVAX-NAP, e 100µg/ml ampicilina (NZYTech, Portugal) para o pQE30- NAP de modo a se selecionar os clones transformados. O meio 2×TY foi utilizado como meio sólido, uma vez que este, sendo mais rico em nutrientes que o meio LB-agar sólido (SigmaAldrich, Alemanha), proporciona um ambiente mais apropriado para o crescimento dos clones e expressão dos plasmídeos. Os clones positivos foram expandidos em 10 ml de meio LB suplementado com 100 µg/ml ampicilina (para o pVAX) e canamicina (para o pQE30) e foi produzido um *stock* de células preservadas com 50 % de glicerol a - 80 °C. Cada produção de proteína foi obtida a partir do mesmo *stock* de células. O DNA plasmídico (pVAX-NAP e pQE30-NAP) foi extraído

através de um kit de purificação de plasmídeos *NZYminiprep* (NZYTech, Portugal) segundo o protocolo descrito pelo fabricante e quantificado segundo o descrito na secção 4.1.1.7.

4.1.1.7. Quantificação de DNA

A quantificação de DNAs foi realizada utilizando o kit de ensaio *Quant-iT™dsDNABroad-Range* (Molecular Probes™, Invitrogen, Reino Unido) de acordo com as instruções do manual (*Quant-iT™dsDNABroad-Range Assay Kit*) e as leituras foram realizadas no *Qubit™ Fluorometer* (Invitrogen, Reino Unido). Este kit é seletivo para DNA de cadeia dupla, e na gama de 2-1000 ng, o sinal de fluorescência é linear com o DNA. Assim, o fluorocromo presente no Kit, ao ligar-se seletivamente ao dsDNA, irá tornar-se proporcionalmente fluorescente à medida que aumenta a concentração de dsDNA em solução.

4.1.2. Validação das construções

4.1.2.1. Validação das construções pVAX-NAP e PQE30-NAP por PCR

Com o DNA plasmídico obtido na secção 4.1.1.6. realizou-se a validação das construções, através da reação de PCR descrita em 4.1.3., efetuando-se em seguida um gel com 1 % de agarose descrita em 4.1.1.3 para visualização da banda de 479 pb correspondente ao gene da NAP (Nap + tag-FLAG).

4.1.2.2. Produção da proteína NAP em células HEK transfetadas com o plasmídico pVAX-NAP

a) Cultura de células

As linhas celulares de rim embrionário humano (HEK293T, do inglês *human embryonic kidney*) (CRL-11268 ATCC[®], VA, USA) foram previamente cultivadas em *T-flasks*, numa incubadora (Binder, Germany) a 37 ° C com 5% de CO₂ numa atmosfera humidificada, com meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Hyclone, Thermo Scientific) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *fetal bovine serum*) (Hyclone, Thermo Scientific) e 1% (v/v) de L-glutamina, penicilina e estreptomicina (Hyclone, Thermo Scientific) designado abreviadamente DMEM-10.

b) Determinação da quantidade de lipofetamina necessária para a transfecção

Realizou-se um ensaio de transfecção das células HEK293T com o plasmídeo recombinante pVAX-T6' e posterior análise por imunofluorescência (como descrito nos seguintes tópicos 4.4.3 e 4.4.4) utilizando-se quatro quantidades de lipofetamina diferentes: 6, 9,

12 e 15 µl. O plasmídeo pVAX-T6', contém o gene recombinante T6' que foi sintetizado anteriormente no nosso laboratório. Após ser determinada a quantidade de lipofetamina necessária, procedeu-se com o ensaio de transfeção das células com o plasmídeo pVAX-NAP.

c) Ensaio de transfeção das células HEK com o plasmídeo pVAX-NAP

Para o ensaio de transfeção, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (Costar®, USA) com lamelas, e foi adicionado em cada poço 2 ml de meio DMEM-10. De seguida, adicionou-se o volume necessário de suspensão celular correspondente a 500000 células no poço (aproximadamente 300 µl), de modo a atingir-se uma confluência de 70-80%, após incubação durante a noite. No dia seguinte, o meio foi retirado e a transfeção foi realizada em meio DMEM 0 (com antibióticos e sem soro) e com 6µl lipofetamina (Invitrogen, Reino Unido) segundo o protocolo *Lipofectin® LTX and Plus Reagent protocol*, utilizando 2 µg de DNA (pVAX-NAP). Do mesmo modo, foram também efetuados dois controlos, o controlo de células, apenas com células, e o controlo da transfeção, com lipofetamina, ao qual não se adicionou DNA. Após 4 horas da transfeção foi adicionado aos poços 1ml de DMEM e após 24 horas o meio foi novamente mudado.

d) Análise por imunofluorescência

48 horas após a transfeção das células, o meio foi retirado e as células HEK293T foram lavadas com PBS 1X (GIBCO, Portugal) e fixadas durante 15 minutos com 4% (v/v) de paraformaldeído (Panreac, Espanha) em solução de PBS 1X. Após três lavagens com PBS 1X, durante 5 minutos cada, as células foram bloqueadas com 5% (w/v) de albumina de soro bovino (BSA, do inglês, *bovine serum albumin*) (Albumin fraction V, Merck, Alemanha) em PBS 1X durante 1 hora. Depois, as células foram incubadas durante a noite a 4 ° C, com o anticorpo anti-FLAG produzido em rato (Sigma Aldrich, Alemanha) (diluição de 1:500 em 1% (w/v) de BSA em PBS). Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X durante 5 minutos, e incubou-se durante 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de ratinho produzido em cabra conjugado com fluorocromo FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*) (Sigma Aldrich, Alemanha) (diluição de 1:500 em 1% (w/v) de BSA em PBS) e lavadas novamente três vezes com PBS 1X.

Em seguida, as lamelas foram retiradas e fixadas em lâminas com reagente *ProLong® Gold antifade* (Merck, Alemanha) incubadas durante a noite à temperatura ambiente protegidas da luz. A imunofluorescência foi observada e registada num microscópio de fluorescência *Axiovert 40CFL* (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) numa ampliação de 10 x ocular e 100 x objetiva,

equipado com uma câmara *AxioCam MRC5* (Carl Zeiss). As imagens foram processadas com o programa *AxioVision Rel. 4.6.3* (Carl Zeiss).

4.1.2.3. Produção da proteína NAP em *E. coli* transformada com PQE30-NAP

O plasmídeo PQE30 - NAP contém uma sequência de 6 histidinas NH₂-terminal (*tag-His*) que permite a purificação da proteína recombinante através de colunas de afinidade à base de níquel (GE Healthcare, Reino Unido).

a) Determinação do tempo de produção máxima da proteína

As células *E. coli* NZY5 α que expressam o vetor recombinante PQE30-NAP foram inoculadas em *erlenmeyers* com 1L de meio de cultura LB (Sigma-Aldrich, Alemanha), com 100 μ g/ml de ampicilina, a 37 ° C, sob agitação. Na fase exponencial de crescimento ($Abs_{610nm} = 0,600$) a cultura foi induzida com 1 mM de IPTG (do inglês, *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) (NZYTech, Portugal). Para seguir a expressão da proteína, foram retiradas amostras após 0, 1, 2, 3, 4, e 20 horas após a indução com IPTG. Em relação a estas amostras, as células foram separadas por centrifugação (4800 rpm, 10 min, 4°C) e homogeneizadas em tampão de ligação sob condições desnaturantes (ureia 8 M, NaCl 500 mM, Tris HCl 20mM, β -mercaptoetanol 1mM, imidazole 5 mM, pH 8.0). As células foram lisadas com um sonicador (*Sonics Vibra CellTM*, USA) e o sobrenadante foi recolhido após centrifugação (4800 rpm, 1 hora, 4°C).

A expressão da proteína NAP foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, do inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) seguido de *Western Blot* tal como descrito na secção 4.1.2.3. c) e d).

b) Expressão

As *E. coli* NZY5 α , transformadas com o plasmídeo pQE30-NAP foram crescidas em 1L de meio de cultura LB suplementado com 100 μ g/ml de ampicilina, a 37 ° C, durante a noite, até obtenção da fase exponencial de crescimento ($Abs_{610nm} = 0,600$). Na fase exponencial efetuou-se a indução da expressão e recolheram-se as células após 3 horas da indução. As células foram separadas por centrifugação (4800 rpm, 10 min, 4°C) e congeladas para uso posterior. Para cada ensaio, 1 g (peso húmido) de células sedimentadas foram ressuspensas em 10 mL de tampão de ligação sob condições desnaturantes (ureia 8 M, NaCl 500 mM, Tris HCl 20mM, β -mercaptoetanol 1mM, imidazole 5 mM, pH 8.0) para que ocorra uma maior exposição da cauda de histidinas, permitindo assim, a ligação das histidinas ao níquel da coluna

de purificação por afinidade. Em seguida as células foram lisadas por sonicação durante 10 ciclos de um 1 minuto cada, e o material insolúvel foi separado por centrifugação (4800 rpm, 1 hora, 4°C). Antes da purificação a sobrenadante foi filtrado com um filtro de 0,45 µm não estéril, para eliminar possíveis restos celulares. Seguiu-se com a purificação por cromatografia de afinidade numa coluna *HisGraviTrap HP* (GE Healthcare, Reino Unido) com níquel.

c) Purificação

Após o equilíbrio da coluna com 10 ml de tampão de ligação, a proteína foi carregada na coluna, e lavada com 10 ml de tampão de ligação. As baixas concentrações de imidazol presentes neste tampão permitem a eluição de proteínas não específicas. Em seguida, as proteínas retidas na coluna foram eluídas com tampão de eluição com elevadas concentrações de imidazol (ureia 8 M, NaCl 500 mM, Tris HCl 20mM, β-mercaptoetanol 1mM, imidazole 500 mM, pH 8.0) pois, como o imidazol e a histidina contêm afinidade semelhante para o níquel, as elevadas concentrações de imidazol presentes no tampão permitem que, por competição, as proteínas retidas na coluna sejam libertadas.

A proteína purificada a partir desta última coluna, foi renaturada, por remoção do tampão desnaturante, numa coluna PD-10 (GE Healthcare, Reino Unido) com 3,5 ml de tampão de eluição (NaCl 100 mM, Tris 20mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4). Estas colunas permitem a separação de substâncias com alto peso molecular ($M_r = 5000$ Da) a partir de substâncias com baixo peso molecular ($M_r = 1000$ Da). Nesta coluna, moléculas pequenas como sal, histidinas livres e outras impurezas são eficientemente separadas da proteína de interesse, com base nas diferenças de dimensão das moléculas. As moléculas maiores que os poros são as primeiras a ser eluídas, enquanto as menores ficam retidas no interior dos poros onde são eluídas após a eluição das moléculas de interesse.

Após este processo, as proteínas obtidas foram congeladas com 10% de trealose e depois liofilizadas no liofilizador (Afla1-4, Christ, Alemanha). Esta foi a proteína utilizada para os ensaios *in vivo*, ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e *Western Blot*.

Para confirmar a presença da proteína recombinante nas diferentes soluções filtradas, foi efetuada uma eletroforese SDS-PAGE e *Western Blot* de acordo com o descrito nas seguintes secções.

d) SDS-PAGE

Para confirmar a presença de proteína recombinante NAP nas diferentes soluções filtradas, as proteínas eluídas ao longo dos passos de purificação foram separadas por eletroforese SDS-PAGE 12 % (w/v) (NuPAGE®, Invitrogen, Reino Unido)

aplicando-se uma voltagem constante de 200 V durante 35 minutos através de um sistema de fornecimento de energia para eletroforeses 3501XL EPS (GE Healthcare Life Science, EUA) sob condições desnaturantes, por comparação com os marcadores moleculares pré-corados na gama de 6-180 kDa (PSM, do inglês, *Prestained Protein Marker*) (BenchMarck™, Invitogen, Reino Unido). Após a migração, as proteínas foram visualizadas por solução *SimplyBlue™ SafeStain* (Invitrogen, Reino Unido).

e) Western Blot

As amostras foram transferidas do gel de poliacrilamida para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene difluoride*) onde se utilizou um sistema de transferência semi-seca (Hofer Semiphor Amersham, GE Healthcare Life Science, EUA) durante 1 hora a 0,8 mA/cm² de membrana. A membrana foi lavada e bloqueada por incubação com 10% (w/v) de leite em pó desnatado (Merck KGaA, Alemanha) dissolvida em TPBS (10 mM a pH 7,4 com 0,05 % (v/v) de Tween 20) (Sigma Aldrich, Alemanha), durante 1 hora, sob agitação constante num agitador orbital (100 rpm). A membrana foi depois incubada durante 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo primário anti-His, produzido em rato (GE Healthcare Life Science, EUA) diluída no tampão de bloqueio (1:1700), sob agitação constante. Após a lavagem, a membrana foi incubada com um anticorpo secundário anti-IgG de ratinho, produzido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich, Alemanha), diluída em tampão de bloqueio (1:2000) durante 1 hora à temperatura ambiente. A capacidade do anticorpo de rato anti-His reconhecer a proteína recombinante NAP foi revelada calorimetricamente com o kit do substrato da fosfatase alcalina SIGMA FAST™ BCIP (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*) e NBT (do inglês, *nitro-blue tetrazolium chloride*) (Sigma Aldrich, Alemanha), de acordo com as instruções do kit.

4.1.3. Produção de antígenos para os ensaios *in vivo* e de *Western Blot*

4.1.3.1. Extração e purificação do pVAX-NAP produzido em *E. coli*

As células *E. coli* NZY5a que expressam o plasmídeo recombinante pVAX-NAP foram inoculadas em 500 ml de meio LB (Sigma-Aldrich, Alemanha) com 100 µg/ml de canamicina (NZYTech, Portugal), a 37 °C com agitação até 10-12h de crescimento, o qual geralmente corresponde à transição da fase logarítmica para a fase estacionária do crescimento. As células foram separadas por centrifugação (6.000g, 10 min, 4 °C) seguindo-se a extração e purificação do DNA plasmídico realizada de acordo com o protocolo do Kit de purificação de plasmídeos *NZYMaxiprep* (NZYTech, Portugal). Este protocolo é baseado na lise alcalina das células bacterianas seguindo-se a ligação seletiva do DNA plasmídico às colunas, carregadas com uma

resina aniónica à base de sílica. A remoção de todos os contaminantes, tais como RNA, proteínas, nucleótidos, sais e oligonucleótidos, é efetuada em primeiro lugar, através da lavagem por fluxo de gravidade. No passo de eluição, a carga positiva da resina é neutralizada por uma mudança do pH a condições ligeiramente alcalinas e o DNA plasmídico puro é eluído num tampão de eluição de alto teor salino. A dessalinização foi realizada através da precipitação com isopropanol e o *pellet* de DNA dissolvido em tampão TE (TRIS 10mM, EDTA 1mM, pH 8). A quantificação do DNA plasmídico foi efetuada segundo os procedimentos descritos na secção 4.1.1.7.

4.1.3.2. Produção da proteína NAP em *E. coli* transformada com o plasmídeo PQE30-NAP

A produção e purificação da proteína NAP para os ensaios *in vivo* e *Western Blot* foram efetuadas segundo o protocolo descrito na secção 4.1.2. 3. b) e c) e quantificada de acordo com o descrito em 4.1.1.7 , sendo confirmada a presença da proteína recombinante por eletroforese SDS-PAGE e *Western Blot* como indicado nas secções 4.1.2.3. d) e e).

4.1.3.3. Crescimento das diferentes estirpes de *H. pylori*

Na totalidade, foram utilizadas para os ensaios *in vivo* e *Western Blot* 15 estirpes de *H. pylori* (Tabela 4.5.), algumas pertencentes à coleção do Laboratório de Eng. Biomédica da FEUCP e outras cedidas pela FFUL. Destas 15, apenas as estirpes 26695, J99, SS1, MONA e 1552/04 da *H. pylori* foram usadas para os ensaios *in vivo*.

Para o crescimento das diversas estirpes de *H. pylori*, estas foram inoculadas em placas agar com meio Columbia (OXOID, Campygen™, Reino Unido) e 5% de sangue de cavalo (Nalgene, USA) e incubadas a 37 ° C durante 48-72 horas dentro de caixas com saquetas de microaerofilia (1 saqueta/2,5 L de volume) (OXOID, Campygen™, Reino Unido). Após crescimento, a biomassa foi recolhida com 50% PBS (GIBCO, LifeTechnologies™, Portugal), as células foram separadas por centrifugação (13.000 rpm, 1 min, 4°C) e ressuspensas em tampão (0.02% Triton X100, 1% tween 20 em PBS 1X, pH 7.4). Cada 1 g (peso húmido) de células sedimentadas foram ressuspensas em 10 mL de tampão e lisadas por sonicação (Sonics Vibra Cell™, USA) durante 10 ciclos de um 1 minuto cada. O material insolúvel foi separado por centrifugação (13.000 rpm, 20 min, 4°C) e o sobrenadante guardado a - 80 ° C. Antes da realização dos ensaios os extratos proteicos foram quantificados pelo método descrito na secção 4.1.3.4.

Tabela 4.5. Estirpes de *H. pylori* utilizadas para os ensaios *in vivo* e *Western Blot*. Das 15 estirpes, apenas as estirpes 26695, J99, SS1, MONA e 1552/04 foram utilizadas para os ensaios *in vivo*. O símbolo ? indica que se desconhece a informação. Os sinais + e – indicam genótipo vacA s1 e s2, respetivamente, e a presença ou ausência de cagA, respetivamente. CG- Cancro gástrico, DNU- Dispepsia não ulcerosa, UD – Úlcera duodenal, UG- Úlcera Gástrica, UP - Úlcera Péptica.

<i>H. pylori</i>			Paciente	
Estirpe	CagA	VacA	Doença Gástrica	Origem Geográfica
B23/99	+	+	CG	Portugal
A3/90	+	+	CG	Portugal
1152/04	+	+	DNU	Portugal
655/99	-	+	DNU	Portugal
173/00	-	+	DNU	Portugal
1198/04	+	+	DNU	Portugal
26695	+	+	Gastrite	Inglaterra
Mex 288	?	?	Gastrite	México
Arg 54	?	?	Gastrite	Argentina
499/02	+	+	UP	Portugal
J99	+	+	UD	EUA
SS1	+	+	UG	Austrália
EN32	?	?	Úlcera	Inglaterra
MONA	?	?	UP	Egipto
583	?	?	UP	Suécia

4.1.3.4. Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas purificada e dos extratos proteicos de *H. pylori* foi feita pelo método BCA (do inglês, *Bicinchoninic acid assay*) (*Protein Assay kit*, Pierce, EUA), que utiliza como proteína padrão, a albumina de soro bovino (BSA), a 1mg/ml. As diluições sucessivas (diluição inicial de 1:2) foram efetuadas em placas de 96 poços com BCA, que foram incubadas 30 minutos a 37 ° C. O ensaio da proteína BCA é baseado na redução do Cu²⁺ em Cu¹⁺ por proteínas que estão em meio alcalino. O íon Cu¹⁺ reage com o ácido bicinconínico e forma um produto da reação de cor púrpura intensa. Ao dar-se esta reação, as absorvâncias são detetadas a 565nm à medida que aumenta a concentração de proteína no espectrofotómetro (Infinito M200, Tecan, Áustria). Para calcular a concentração final de proteína em mg/ml de

amostra, os valores de absorvância obtidos foram comparados com a curva padrão da proteína BSA.

4.1.4. Imunovariabilidade

4.1.4.1. Imunização de murganhos

Para os estudos *in vivo*, foram utilizados nove grupos de murganhos BALB/c (fêmeas, n = 2/grupo), em estrita conformidade com a Diretiva de 24 de Novembro (m ° 86/609 CEE), as leis portuguesas DR n ° 31/ 92, D.R. 153 I- A 67 /92 e seguindo toda a legislação.

A primeira imunização dos murganhos foi efetuada no dia 1 e os reforços foram dados no dia 17 e 45, ambos por via intramuscular, e com 50µg de proteína purificada, DNA ou cerca de 50-100µg de extratos de proteínas de 5 estirpes de *H. pylori*. Respetivamente, os grupos 1 e 2 receberam os plasmídeos, pVAX-T6' e pVAX-NAP, os grupos 3 e 4 receberam as proteínas recombinantes purificadas NAP e T6', e os restantes grupos 5, 6, 7, 8, 9, receberam respetivamente, as estirpes de *H. pylori* SS1, J99, 1152, 26695 e Mona. Todas as doses foram preparadas em 10 mM PBS estéril (pH 7,4), sob condições assépticas, antes de doseamento dos animais e o reforço. Os murganhos foram imunizados de acordo com os dados indicados na tabela 4.6.

Tabela 4.6. Grupos de murganhos imunizados com as proteínas recombinantes NAP e 6T', os plasmídeos pVAX-6T' e pVAX-NAP e as estirpes de *H. pylori* SS1, J99, 1152, 16695 e MONA, por via intramuscular.

Grupo	Antigénios	Dose	Via
1	pVAX-T6'	3x50µl (3x50µg)	Intramuscular
2	pVAX-NAP		
3	Proteína NAP		
4	Proteína T6'		
5	Estirpe SS1	3x50µl (3x50-100 µg)	
6	Estirpe J99		
7	Estirpe 1152		
8	Estirpe 26695		
9	Estirpe MONA		

4.1.4.2. Recolha de amostras biológicas e análises ao soro

As amostras de sangue de cada ratinho foram recolhidas através da veia da cauda, 67 dias após a primeira imunização. Estas foram centrifugadas (12000g, 20 min, 4 ° C) e os soros foram recolhidos e armazenados a -20 ° C até à análise. Os níveis de anticorpos no soro foram determinados por ELISA, com as proteínas recombinantes purificadas NAP e os extratos proteicos das estirpes de *H. pylori*.

4.1.4.3. Avaliação da produção de anticorpos em murganhos por ELISA

As respostas de anticorpos específicos (IgG, IgG1 e IgG2a) às proteínas recombinantes NAP e T6' e os plasmídeos, pVAX- NAP e pVAX-T6', foram determinados de acordo com um método previamente descrito (Cadete *et al.*, 2012a). As placas de ELISA (Microlon®, placas de fundo plano de elevada ligação, Greiner, Alemanha) foram revestidas durante a noite com 10 µg/mL com os antigénios recombinante NAP e T6' e com 20 µg/mL os extratos proteicos das estirpes de *H. pylori*, em 100 mM de tampão de carbonato de sódio (pH 9,6), lavadas e depois bloqueadas com a 5 % (w/v) de leite em pó desnatado (Merck KGaA, Alemanha) dissolvida em PBS (10 mM, pH 7,4 com 0,05 % (v/v) de Tween ® 20) (TPBS, Sigma Aldrich, Alemanha). As placas foram novamente lavadas e o pool de soros foram testados por diluições em série. Como anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos anti-IgG de ratinho produzido em cabra (Aldrich, Pool Dorset, Reino Unido) (diluído a 1:1000), IgG1 e IgG2a (Serotec, Reino Unido) (diluído a 1:2000), conjugados com peroxidase. Por fim, para a reação de coloração, foi utilizado como substrato, o OPD (do inglês, *o-Phenylenediamine dihydrochloride*) (Kit SigmaFAST™ OPD, Sigma Aldrich, Alemanha), sendo esta parada após 15 minutos, por adição de 2,5 NH₂SO₄ aos poços, e a absorvância foi lida a 410 nm num leitor de microplacas (*FLUOstar Omega*, BMG Labtech, Alemanha).

4.1.4.4. Avaliação da imunovariabilidade da NAP por Western Blot

Os ensaios de SDS-PAGE e *Western Blot* com os soros obtidos dos ensaios de imunização, foram realizados de acordo com os protocolos já descritos anteriormente, nas secções 4.1.2.3. d) e e).

No 1º e 2º ensaio, as proteínas recombinantes NAP, T6', T6 e T8, bem como os extratos proteicos das estirpes de *H. pylori* SS1, J99, 1152, 26695 e Mona, foram corridas no gel de poliacrilamida e depois transferidas para a membrana para a membrana de PVDF. Após transferência, a membrana foi incubada durante 2 horas com o soro anti-NAP e anti T6'

respetivamente obtidos das imunizações dos murganhos com a proteína NAP e T6, diluído no tampão de bloqueio (diluição 1:500). Para ensaio nº 3, foram corridos no gel, as proteínas recombinantes NAP e T6' e os lisados proteicos provenientes das estirpes de *H. pylori* indicadas na tabela 4.5. e incubadas com o soro anti-NAP (diluição 1:500) obtido dos murganhos imunizados com a proteína NAP. Por fim, para o ensaio nº 4, as proteínas recombinantes NAP, T6', 6T e 8T e os lisados proteicos provenientes das estirpes de *H. pylori* corridas no gel, foram incubadas com o soro produzido pelos murganhos imunizados com a estirpe 26695 (diluição 1:100). Em todos os ensaios, após a incubação com os soros, as membranas foram lavadas e incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG de ratinho, produzido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich, Alemanha), diluída em tampão de bloqueio (1:2000) durante 1 hora. Todos os ensaios de *Western Blot* referidos, estão esquematizados na seguinte tabela.

Tabela 4.7. Ensaios de *Western Blot* com as proteínas recombinantes NAP, T6', 6T e 8T, e os extratos proteicos de diversas estirpes de *H. pylori*, incubadas com os soros, α -NAP, α -T6 e α -26695, obtidos nas imunizações dos ratinhos.

<i>Western Blot</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Soro
1	PSM	NAP	T6'	6T	8T	-	-	-	-	-	α -NAP
2	PSM	NAP	T6'	6T	8T	-	-	-	-	-	α -T6'
3	PSM	NAP	T6'	B23/99	26695	J99	499/02	1198/04	Mona	583	α -NAP
	PSM	T6'	173/00	A3/90	SS1	EN32	655/99	Mex 288	Arg 54	1152/04	
4	PSM	NAP	T6'	6T	8T	B23/99	26695	J99	499/02	1198/04	α -26695
	PSM	Mona	583	173/00	A3/90	SS1	EN32	655/99	Mex 288	Arg 54	

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1. Construção dos plasmídeos pVAX-NAP e PQE30-NAP

A NAP constitui um dos principais fatores de virulência produzidos pela *H. pylori* devido à sua capacidade de ativar neutrófilos e monócitos humanos e que por isso desempenha um papel importante na indução da resposta imune na mucosa gástrica (Choli-Papadopoulou *et al.*, 2001). Construíram-se os plasmídeos recombinantes pQE30 e pVAX com a sequência completa do gene da NAP da estirpe 26695 da *H. pylori*. O vetor plasmídico pQE30 é um vetor procariótico que permite a expressão da proteína em células procariotas como *E. coli*, enquanto o pVAX1, é um vetor eucariota que permite uma elevada expressão da proteína antigénica em células animais.

4.2.1.1. Amplificação do gene NAP por PCR

Para amplificação da sequência do gene da NAP da estirpe 26695 da *H. pylori* os *primers forward* e *reverse* foram desenhados através do programa *Jellyfish 3.3.1* e de acordo com os critérios descritos por Coyne *et al.*, (2001). Segundo este autor, existem uma série de fatores críticos que podem afetar uma reação de PCR, como por exemplo, a temperatura e o tempo de desnaturação e de alongamento, a temperatura de *annealing*, o desenho do *primer*, o comprimento do *primer* e a existência de *primers* degenerados. A degeneração dos *primers* pode induzir a formação de *hairpins*, que conseqüentemente, reduz a sua especificidade com a sequência alvo, bem como a diminuição da sua concentração em solução, o que pode prejudicar o sucesso da reação de PCR. Para confirmar possibilidade da formação de *hairpins* nos *primers* desenhados, estes foram inseridos no programa *OligoAnalyser* (Integrated DNA Technologies[®]), onde se observou a possibilidade de formação de *hairpins*. Para o *primer forward* foram obtidas 9 estruturas diferentes e para o *primer reverse*, 5 estruturas diferentes (Fig.4.3. A e B).

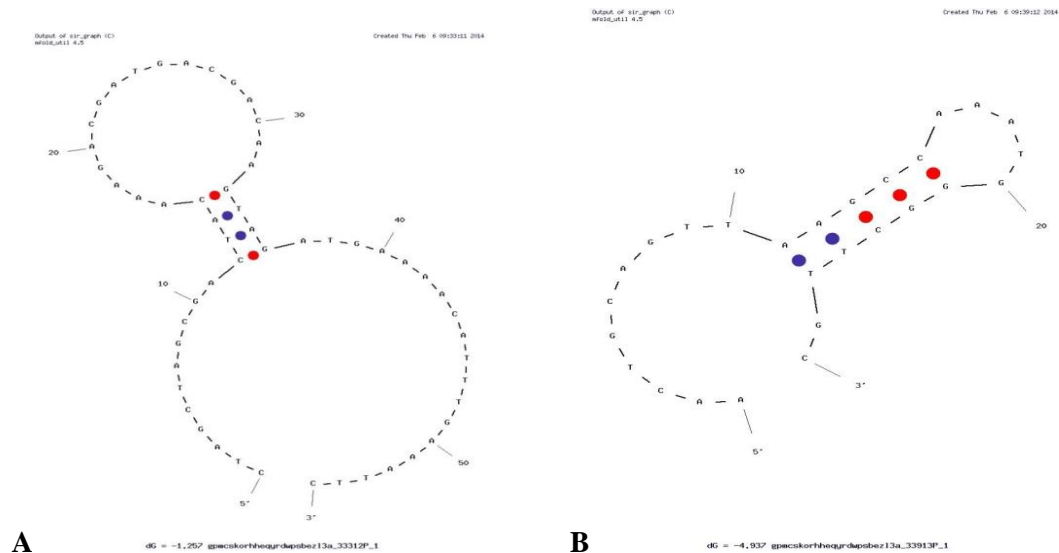


Figura 4.3. Possibilidade de formação de *hairpins* para o *primers foward* (A) e *reverse* (B). Para o *primer foward* está representada 1 das 9 diferentes estruturas obtidas e para o *primer reverse* está representada 1 das 5 estruturas obtidas.

Através destes *primers*, e apesar da possibilidade de formação destas estruturas secundárias, conseguiu-se efetuar a ampliação do gene NAP por PCR. Tal como indicado no gel de eletroforese (Fig. 4.4), observa-se presença do fragmento de 479 pb referente à FLAG-NAP. Neste mesmo gel, não estão presentes outras bandas inespecíficas que não correspondem ao fragmento do gene de interesse e que poderiam ser resultantes da formação de *hairpins*.

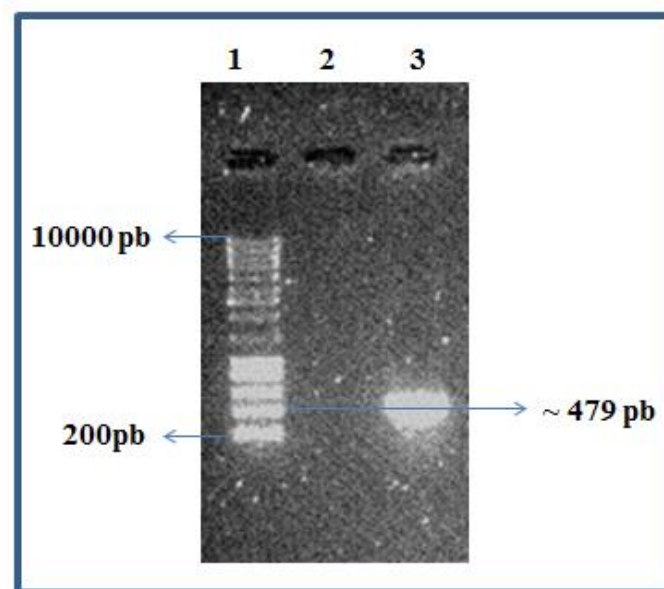


Figura 4.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos após PCR do genoma da estirpe *H. pylori* 26695 com os *primers* indicados na secção 4.1.1.2. O fragmento de 479 pb corresponde à dimensão do gene da NAP. Poço 1 : Padrão molecular 200pb (*NZYDNA Ladder III*); poço 2 : controlo do PCR (branco), poço 3: produto de PCR do gene da NAP.

4.2.2. Validação das construções pVAX-NAP e PQE30-NAP

4.2.2.1. Por PCR

Após a amplificação por PCR do gene da NAP, este foi clonado nos plasmídios pVAX, e PQE30 nos locais de restrição *Pst I* e *Nhe I*, utilizando a enzima *T4 DNA Ligase*. Após a transformação de células *Escherichia coli* NZY5α com estes plasmídeos, selecionaram-se os respectivos clones positivos. Para confirmar se os clones isolados apresentavam plasmídeos com o gene NAP, foi efetuado novamente um PCR dos plasmídeos extraídos destes clones, com os *primers forward* e *reverse* indicados na secção 4.1.1.2. Observou-se por eletroforese a presença de um fragmento ampliado por PCR com a dimensão da NAP (Fig. 4.5). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Sun *et al.*, (2006), que clonaram o gene na NAP da estirpe CCUG 17874 da *H. pylori* no vetor de expressão eucariótica pIRES. A tabela 4.8. compara os *primers* utilizados para a amplificação do gene da NAP no presente estudo com o estudo efetuado por Sun *et al.*, (2006).

Tabela 4.8. *Primers* utilizados para amplificação do gene da NAP a partir do genoma da *H. pylori* 26695 e CCUG 17874 por Sun *et al.*, (2006) com indicação dos locais de restrição (vermelho), sequencia tag-FLAG (azul) e zona de hibridação (preto).

<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	Estipe de <i>H. pylori</i>
5'- CTA GCT AGC GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG TAG ATG AAA ACA TTT GAA ATT C -3'	5'- AAC TGC AGT TAA GCC AAA TGG GCT TGC -3'.	26695
Locais de restrição <i>Pst I</i> + tag-FLAG	Local de restrição <i>Nhe I</i>	
5'-GTC CTC GAG ATG AAA ACA TTT GAA ATT TTA AAA CAT TTG CAA GCG-3'	5'-GTC ACG CGT TTA AGC CAA ATG GGC TTG CAA CAT CC-3'	CCUG 17874 Sun <i>et al.</i> , (2006)
Local de restrição <i>Xho</i>	Local de restrição <i>Mlu</i>	

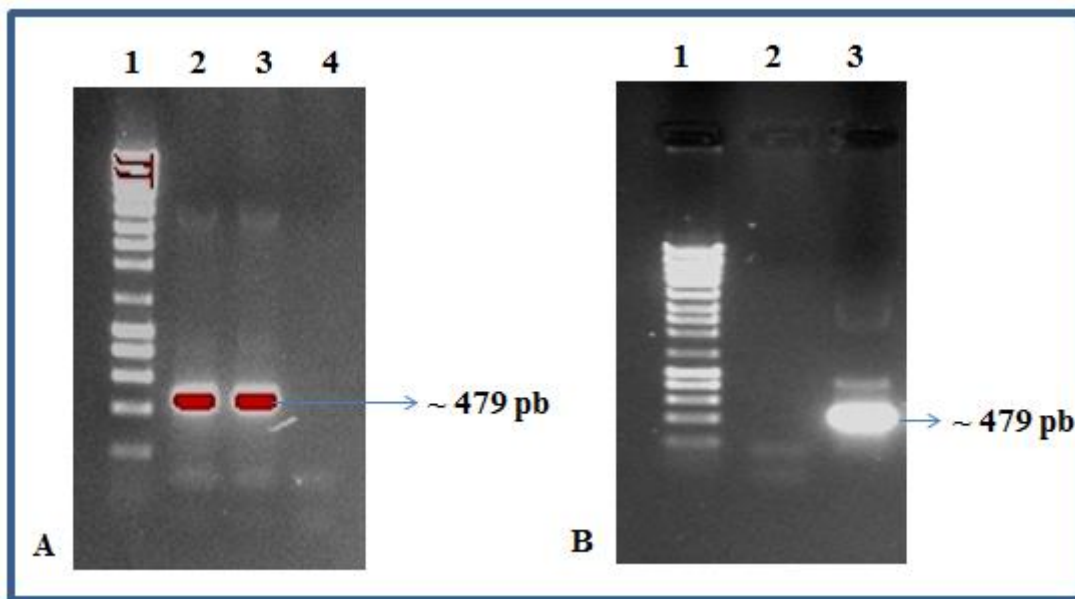


Figura 4.5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos após PCR dos plasmídeos pVAX-NAP (A) e pQE30-NAP (B) utilizando-se os *primers* indicados na secção 4.1.1.2. (A) Poço 1: Padrão molecular 200pb (*NZYDNA Ladder III*); poços 2 e 3: produto de PCR do plasmídeo pVAX-NAP; poço 4: controlo do PCR (branco). (B) Poço 1: Padrão molecular 200pb (*NZYDNA Ladder III*); poço 2: controlo do PCR (branco); poço 3: produto de PCR do plasmídeo pQE30-NAP.

4.2.2.2. Produção da proteína NAP em células HEK293T transfetadas com o plasmídeo pVAX-NAP

De forma a identificar-se a proteína recombinante NAP efetuou-se a fusão da sequência peptídica hidrofílica designada por *tag-FLAG*, DYKDDDDK, à parte N terminal da NAP no plasmídeo pVAX-NAP. Devido ao seu caráter hidrofílico, a *tag-FLAG* fica mais exposta à superfície da proteína, o que lhe permite ficar mais acessível aos anticorpos, facilitando-se a sua deteção através de anticorpos anti-FLAG em ensaios como *Western Blot*, imunocitoquímica, citometria de fluxo, etc (Terpe, 2003).

Para estimar a quantidade ótima do reagente de transfeção, lipofetamina, para transferir as células de rim embrionário humano (HEK293T) com o plasmídeo pVAX, efetuou-se um ensaio prévio de transfeção em placas de 6 poços em que se usou diferentes quantidades de lipofetamina: 6, 9, 12, 15 μ l. No ensaio utilizou-se um anticorpo primário anti-FLAG e um anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com fluorocromo. Observou-se por imunofluorescência uma eficiência de transfeção semelhante independentemente da quantidade de lipofetamina usada (Fig.4.6), pelo que no ensaio de transfeção de HEK293T com o plasmídeo pVAX-NAP usou-se 6 μ l de lipofetamina. Desta forma observou-se a expressão do gene NAP em células HEK293T (Fig.4.7).

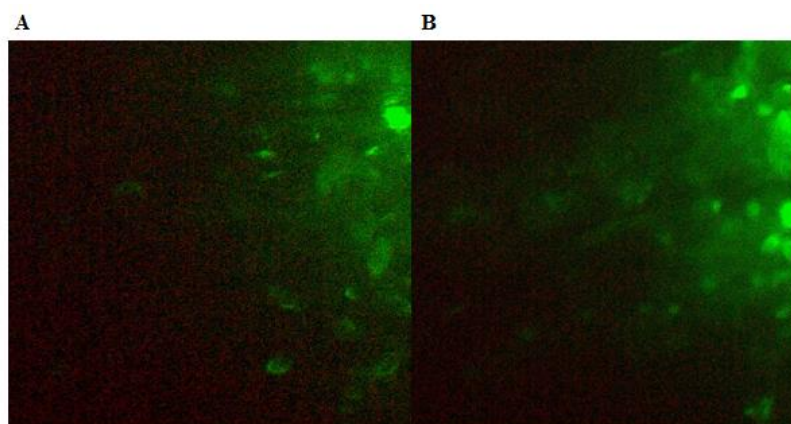


Figura 4.6. (A e B) Imagens obtidas por imunofluorescência da transfeção das células HEK293T com o plasmídeo recombinante pVAX-T6' utilizando-se 6 µl de lipofetamina.

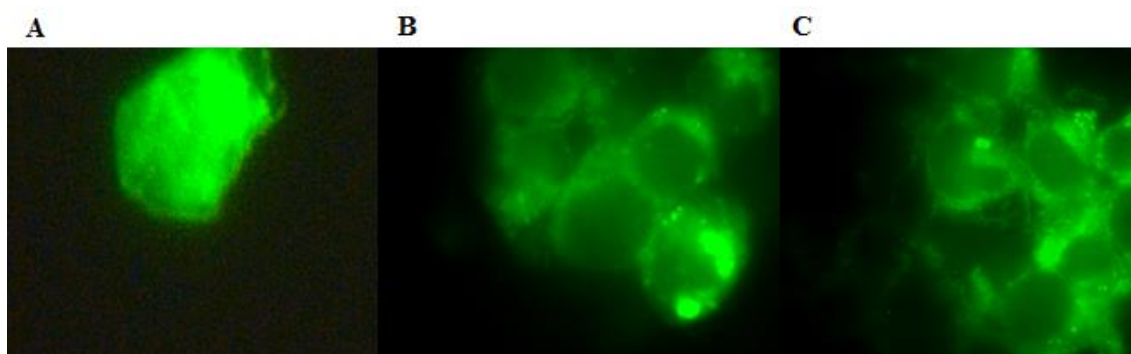


Figura 4.7. Imagens obtidas por imunofluorescência das células HEK293T transfetadas com o plasmídeo recombinante pVAX-NAP. (A, B e C) Imagens das células HEK293T transfetadas com pVAX-NAP, aproximadamente 95 horas após a transfeção com lipofetamina e analisadas por imunofluorescência, com uma ampliação de 100x ocular e 100x objetiva, utilizando o anticorpo primário anti-FLAG e o anticorpo secundário anti-IgG de ratinho conjugado com fluorocromo.

4.2.2.3. Produção e purificação da proteína NAP em de *E. coli* transformada como plasmídeo PQE30-NAP

Os níveis de expressão de uma proteína recombinante são muito específicos para cada sistema de produção, das propriedades bioquímicas da proteína, da estirpe hospedeira e das condições de cultura. Por isso, para cada proteína e para cada cultura é necessário otimizar o melhor protocolo. No caso do sistema de expressão de células *E. coli* NZY5α transformadas com o plasmídeo pQE30-NAP, é necessário adicionar o indutor da expressão da proteína recombinante, IPTG, o qual deve ser adicionado à cultura logo no início da fase exponencial. Desta forma haverá ainda nutrientes necessários que permitem quer o crescimento quer a produção da proteína (Olaofe *et al.*, 2010). Tendo em conta o sistema de expressão e as condições de cultura utilizadas, o início da fase exponencial correspondeu a uma OD610 da

cultura de 0.600 (Fig.4.8). O IPTG é um análogo da lactose, que induz a transcrição genética por aumento da síntese da enzima T5 RNA polimerase que se liga ao promotor T5, iniciando assim a expressão do cDNA de interesse. Este é o sistema procariótico mais utilizado (Weng *et al.* 2006). Foi utilizado uma concentração de IPTG de 1mM para efetuar a indução da expressão de acordo com Olaofe *et al.* (2010), Donovan *et al.* (1996) e Teich *et al.* (1998).

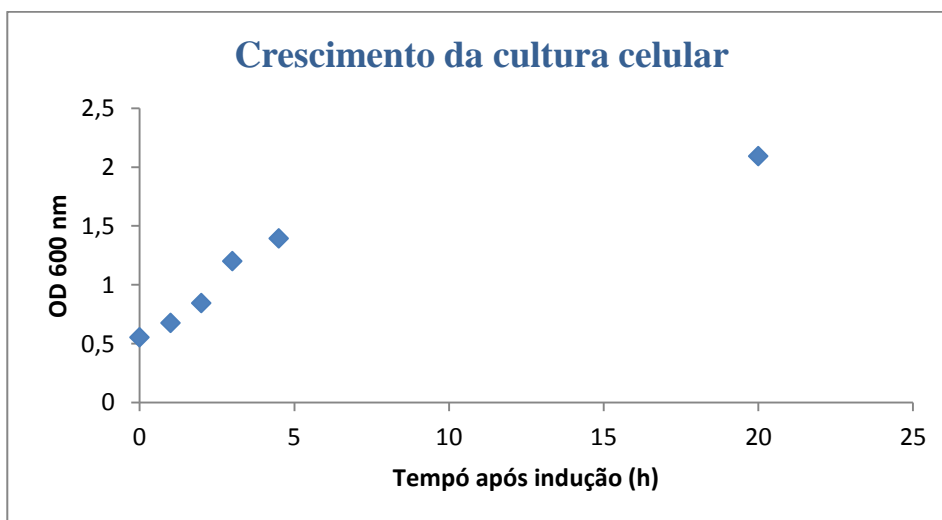


Figura 4.8. Crescimento das células de *E. coli* NZY5a recombinada com o plasmídeo pQE30-NAP, após indução da expressão proteica através da adição de IPTG quando a OD610nm = 0.600.

Para determinar qual a fase da cultura em que há maior produção de proteína recombinante, e após indução da produção no início da fase exponencial recolheram-se amostras da cultura após 0, 1, 2, 3, 4, e 20 horas da indução com IPTG (Fig.4.8). Estas amostras foram subsequentemente analisadas por SDS-PAGE e *Western Blot* (Fig.4.9).

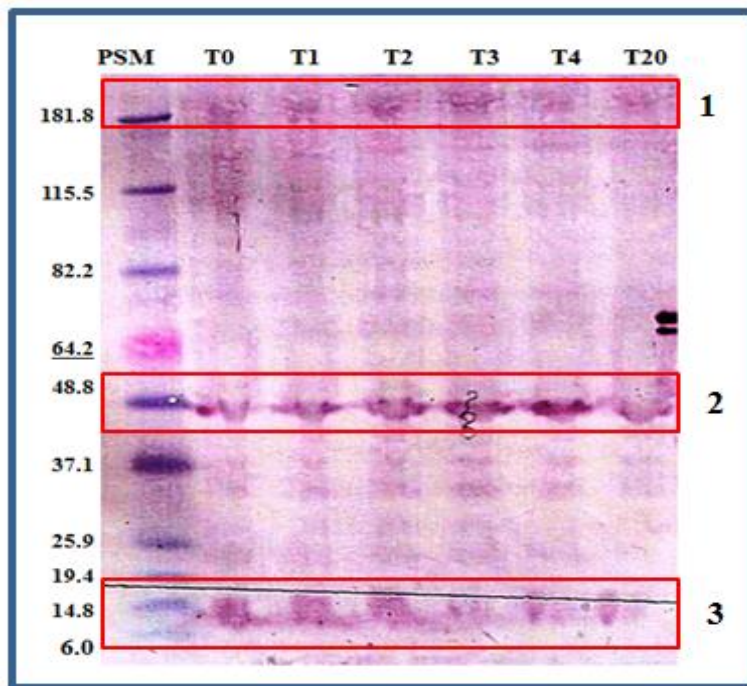


Figura 4.9. *Western Blot* realizado com soro anti-His contra as amostras da cultura de *E.coli* NZY5 α transformadas com o plasmídeo PQE30-NAP após indução com IPTG. PSM; T0 – amostra no momento da indução; T1- 1 hora após indução; T2 - 2 horas após indução, T3 - 3 horas após indução; T4 - 4 horas após indução; T20 – 20 horas após indução.

Observa-se no *Western Blot* obtido (Fig.4.9), a presença de três bandas proteicas, cujos pesos moleculares correspondem aproximadamente a 185 kDa (banda 1), 48 kDa (banda 2) e 10 kDa (banda 3). Apesar de nenhuma das proteínas corresponder exatamente à dimensão da NAP de aproximadamente 19 kDa (17 kDa correspondentes ao monómero da Nap + 1.01 kDa correspondente às 6 histidinas + 0.08 kDa correspondente à *tag*-FLAG), estas proteínas podem representar multímeros da NAP insolúveis e fragmentos hidrolisados de NAP. A elevada produção de proteínas heterólogas em *E. coli* resulta regra geral na formação agregados insolúveis, sob a forma de corpos de inclusão, sendo que alguns deles são difíceis de desnaturar mesmo na presença de concentrações elevadas de ureia como 8M, tal como observado por exemplo por Han *et al.* (2011). Como descrito no capítulo 2 secção 2.1., a NAP existe na sua forma nativa como um dodecâmero de 17 kDa e por isso tem uma tendência natural a formar multímeros de elevado peso molecular o que justifica a presença das bandas 1 e 2. Pelo contrário, a banda 3 de baixo peso molecular, pode corresponder a um fragmento da NAP incompleto resultante da expressão parcial do gene NAP ou da hidrólise da NAP.

A expressão basal de NAP detetada no tempo inicial da indução (T0) pode ser devida à ativação do promotor através de outras vias como indicado por Weng *et al.* (2006). Por observação dos níveis de proteína produzidos após indução, observa-se a produção máxima de

proteína após 3 horas da indução (Fig.4.9) de acordo com o observado por outros autores em sistemas de expressão idênticos (Teich *et al.*, 1998).

Devido ao grande interesse da indústria farmacêutica em produzir proteínas recombinantes purificadas em grande escala e usando-se sistemas de purificação simples, foram desenvolvidos os sistemas de *affinity-tag*. Um dos sistemas mais utilizados deste tipo é baseado na adição genética à proteína de interesse de uma cauda de resíduos de 6 histidinas, a qual não apresenta imunogenicidade per si, e que permite a obtenção de graus de purificação elevados (com por exemplo, 95% de grau de pureza) através de uma cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC, do inglês *Immobilized metal ion affinity chromatography*) (Terpe, 2003). Este é o caso do sistema pQE30 utilizado. A purificação da proteína foi efetuada através de colunas *HisGraviTrap HP* com níquel, sob condições desnaturantes, de forma a aumentar-se o rendimento de purificação uma vez que nestas condições a cauda de histidinas se encontra mais exposta diminuindo assim a sua agregação e mantendo a estabilidade entre a cauda de histidina e o níquel (Ramos *et al.* 2004; Terpe, 2003). Seguiu-se o *refolding* da proteína através de colunas dessalinização. Uma vez purificadas e quantificadas, as proteínas foram detetadas através de *Western Blot* (Fig.4.10).

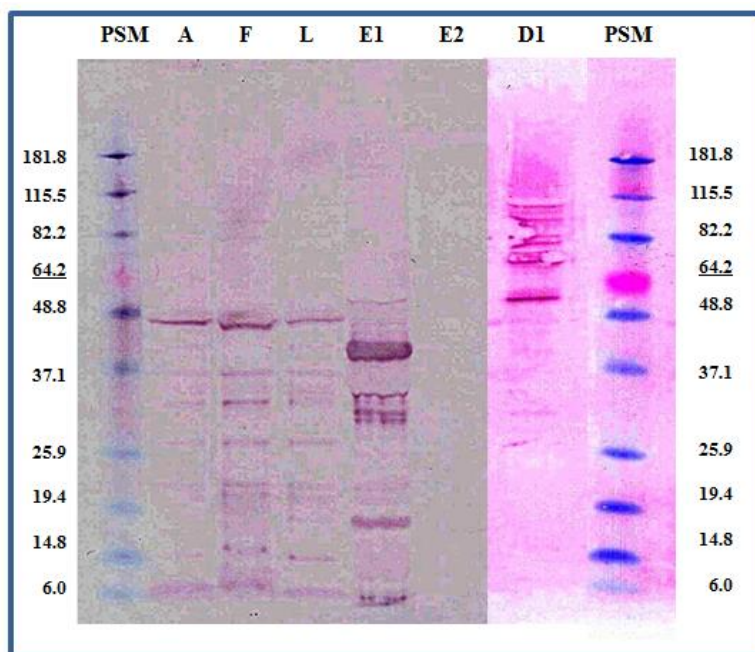


Figura 4.10. *Western Blot* realizado com anticorpo anti-His contra as amostras da cultura de *E.coli* NZY5 α transformadas com o plasmídeo pQE30-NAP após purificação e *desalted*. PSM; A- amostra; F – Fluxo; L – Lavagem; E1 – Eluição 1; E2 – Eluição 2; D1- *Desalted* 1, PSM.

Após a purificação da proteína as amostras obtidas nas várias etapas de purificação foram analisadas por SDS-PAGE e *Western Blot* para identificação da presença da proteína através dos anticorpos anti-His (Fig.4.10). Nas linhas A (amostra), F (fluxo) e L (lavagem), não se observa a banda de 19 kDa, correspondente à NAP, mas sim várias bandas com diferentes pesos moleculares que possivelmente correspondem a multímeros insolúveis da NAP. Outra possibilidade que justifica a presença destas bandas é formação de agregados pela interação entre as sequências de histidinas ou proteínas de *E.coli* que não foram eluídas durante os passos de purificação e que apresentam alguma homologia com as sequências de histidinas. Considerando-se que algumas destas bandas correspondem à NAP pode-se concluir que ocorreu alguma perda da proteína NAP ao longo das etapas de purificação. No passo de eluição 1 (linha E1) é possível observar várias bandas de diferentes pesos moleculares, especialmente uma forte de aproximadamente 55 kDa, que pode corresponder a multímeros da NAP, e uma banda perto da região de 19 kDa que provavelmente é o monómero da NAP. Na eluição 2 (linha E2) não é possível observar quaisquer bandas, o que significa que todas as proteínas foram libertadas na primeira eluição. No passo de *desalted* (linha D1) observam-se bandas de pesos moleculares mais elevados o que pode indicar que, após *refolding*, a NAP tende a formar multímeros de maiores dimensões que são característicos da sua forma nativa. Além disso, o facto de amostra ter sido liofilizada pode ter resultado numa maior agregação da proteína.

4.2.3. Imunovariabilidade

4.2.3.1. Avaliação da produção de anticorpos em murganhos por ELISA

Com o objectivo de avaliar a imunovariabilidade associada à NAP imunizaram-se murganhos BALB/c (n=2) três vezes por via intramuscular de acordo com o indicado na tabela 3.7., com a proteína recombinada NAP e T6', com os plasmídeos pVAX-NAP pVAX-T6' e com as diversas estirpes de *H. pylori*. Para avaliar, se as vacinas administradas e as diferentes estirpes de *H. pylori* induzem ou não uma resposta mista Th1 e Th2, foram efetuados ensaios de ELISA com o pool de soros (n=2) obtidos dos murganhos imunizados de forma a quantificar os títulos dos diferentes isótipos de IgG (IgG1 e IgG2a), sendo que o isótipo IgG1 corresponde a uma resposta imunitária do tipo Th2, enquanto o isótipo IgG2a corresponde a uma resposta do tipo Th1 (Peek *et al*, 2010;. Velin e Michetti, 2010).

Tabela 4.9. Título de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 no pool de soros (n=2) e respectivas absorvâncias (410 nm) a uma diluição de 1:200, obtidos após imunização de murganhos (BALB/c) com: pVAX-T6', pVAX-NAP, proteína NAP, proteína T6' e estirpes de *H. pylori* SS1, J99, 1152, 2669 e Mona. *Como não foi possível a determinação do título, foram comparados os valores da OD a uma diluição 1/200.

	Título			*Absorvâncias a 410 nm do ensaio de ELISA			
	IgG	IgG2a	IgG1	IgG	IgG2a	IgG1	IgG2a/IgG1*
pVAX+T6'	800	>6400	>6400	0,079	0,517	0,193	2,665
pVAX+NAP	200			0,013	0,161	0,228	0,703
NAP	>6400			2,844	3,188	3,082	1,034
T6'	>6400			1,685	0,924	2,644	0,349
Estirpe SS1	800			0,066	0,350	0,362	0,964
Estirpe J99	>6400			3,170	3,258	3,109	1,047
Estirpe 1152	>6400			2,685	3,021	3,000	1,006
Estirpe 26695	>6400			3,197	3,212	3,091	1,038
Estirpe MONA	800			0,134	0,639	0,821	0,777

Níveis de anticorpos anti IgG, IgG2a e IgG1 nos soros

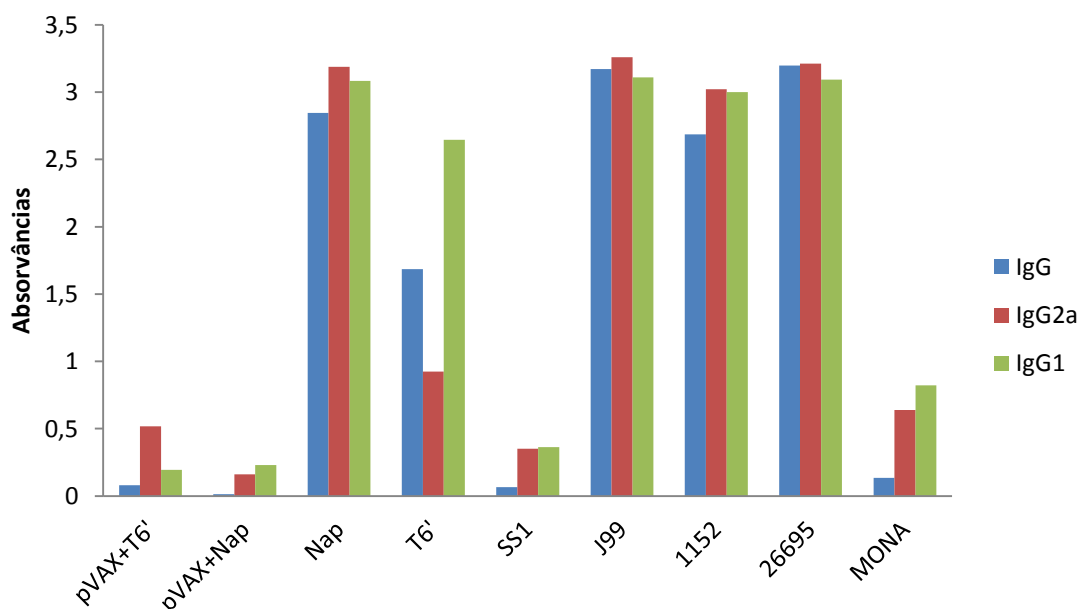


Figura 4.11. Valores em absorvância obtidos a 410 nm, relativos ao ensaio de ELISA para determinar a produção de anticorpos específicos anti IgG, IgG1 e IgG2a no pool de soros (n=2) de murganhos (BALB/c) imunizados com: pVAX-T6', pVAX-NAP, proteína NAP, proteína T6' e estirpes de *H. pylori* SS1, J99, 1152, 2669 e Mona.

Na figura 4.11, observa-se níveis séricos de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 mais elevados nos murganhos imunizados com as proteínas recombinantes em relação às imunizações efetuadas com os plasmídeos recombinantes, tal como seria de esperar uma vez que os ensaios de vacinação com plasmídeo nu apresentam de uma forma geral, uma baixa estimulação do sistema imunitário em comparação com as vacinas de proteínas. Além disso, não se efetuou qualquer tipo de nanoencapsulação do plasmídeo ou adição de sequências adjuvantes para aumentar a expressão do antígeno e aumentar a própria imunogenicidade das vacinas de DNA plasmídico.

Também foi observado que a proteína NAP induz uma resposta Th1 e Th2 forte e mais equilibrada ($Ig2a/IgG1 = 1,0$) do que a proteína multi-antigénica T6', que induziu uma resposta imune Th2 predominante dado que, $IgG2a/IgG1 = 0,3$ (Tabela 4.9).

A imunização com os sonicados das diferentes estirpes de *H. pylori*, desencadeou uma resposta imune equilibrada Th1 e Th2 ($Ig2a/IgG1 = 1,0; 1,0; 1,0; 1,0; 0,8$). É de realçar o fato de que as estirpes J99, 1152 e 26695, foram mais imunogénicas, ou seja, induziram uma maior produção de anticorpos, do que as estirpes MONA e SS1, o que pode ter sido devido à utilização de uma menor quantidade de proteínas total utilizada com estas estirpes na imunização. Utilizou-se uma quantidade aparente de proteínas dos lisados das diversas estirpes similar nas diversas imunizações, no entanto, tal como observado na figura 4.11., os lisados das estirpes SS1 e da MONA podem apresentar um teor mais reduzido de proteínas totais, pois, provavelmente, o processo de extração de proteínas destas últimas duas estirpes levou a uma maior hidrólise das ligações peptídicas, originando uma maior quantidade de péptidos e menor teor em proteínas.

4.2.3.2. Avaliação da imunovariabilidade da NAP por Western Blot

A figura 4.12. representa o *Western Blot* realizado com soro anti-NAP (A) e anti-T6' (B), obtido dos murganhos imunizados, contra os vários fragmentos da proteína NAP separados por SDS-PAGE. Como é de esperar, observa-se no gel A, que as várias proteínas da NAP são reconhecidas intensamente pelo soro anti-NAP, uma vez que, foi com esta proteína que foi efetuada a imunização dos murganhos. No gel B, embora menos intenso, também ocorreu o reconhecimento das proteínas da NAP pelo soro anti-T6'. Isto porque um dos 6 antígenos constituintes da proteína multimérica T6' é um pequeno fragmento da NAP e por isso a imunização dos murganhos com T6' levou à produção de anticorpos específicos contra esse pequeno fragmento da NAP.

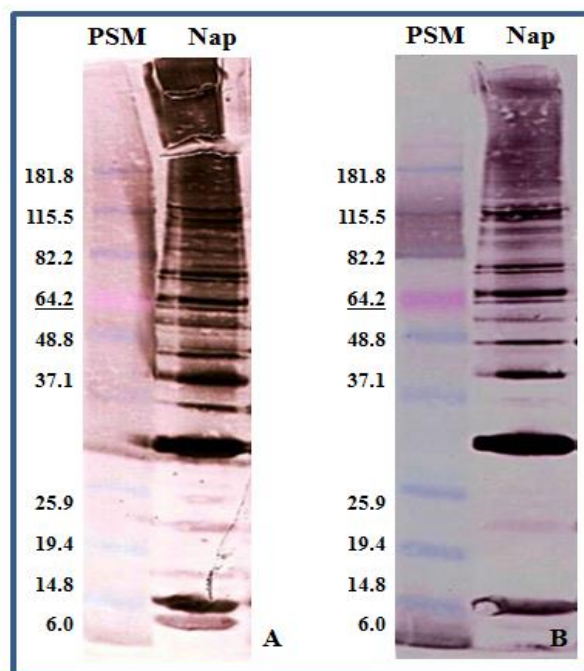


Figura 4.12. *Western Blot* realizado com soro anti-NAP (A) e anti-T6' (B), contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE. 1- PSM, 2-NAP.

Na figura 4.13. está representado o *Western Blot* realizado também com os soros anti-NAP (A) e anti-T6' (B) contra as proteínas T6', 6T e 8T. Tal como a proteína T6', as proteínas 6T e 8T são proteínas multiméricas que foram sintetizadas anteriormente no laboratório. A proteína 8T contém na sua constituição antigénica, o fragmento da NAP presente também na proteína T6', já a proteína 6T, não contém qualquer fragmento da NAP.

Como se observa (Fig. 4.13), a proteína T6' (linhas 2 e 3) foi reconhecida pelo soro anti-NAP (gel A), como seria espectável uma vez que a proteína T6' contém um pequeno fragmento da NAP. Como esperado, no gel B observa-se o que o soro anti-T6' reconheceu a proteína T6'. A respeito da proteína 6T (linha 4), ocorreu um fraco reconhecimento por parte de ambos os soros. Com o soro anti-NAP (A), não era de esperar qualquer interação uma vez que a proteína NAP não faz parte da constituição antigénica de 6T. Neste caso, as bandas reconhecidas podem corresponder a proteínas de *E.coli* que não foram totalmente eluídas durante os passos de purificação das proteínas, o que conseqüentemente levou ao reconhecimento destas proteínas pelo soro anti-Nap uma vez que este pode conter anticorpos contra as proteínas de *E.coli*. Para o soro anti-T6' (B), era de esperar um reconhecimento mais acentuado das proteínas de 6T uma vez que a constituição antigénica de ambas as construções é muito idêntica. Quanto à proteína 8T esta foi reconhecida por ambos os soros, anti-NAP (A) e anti-T6' (B) pois esta proteína, além de conter a NAP na sua constituição, também tem proteínas em comum com a proteína T6'. Como se observa, a intensidade das bandas reconhecidas é mais forte para o soro anti-NAP do que para soro anti-T6'. Os resultados da

análise da produção de anticorpos por ELISA (secção 4.2.3.1) mostram que esta diferença pode dever-se ao facto da proteína NAP ter induzido uma maior resposta imune nos murganhos imunizados e por isso o soro anti-NAP está mais concentrado e daí mostrar uma reacção mais intensa com as proteínas separadas.

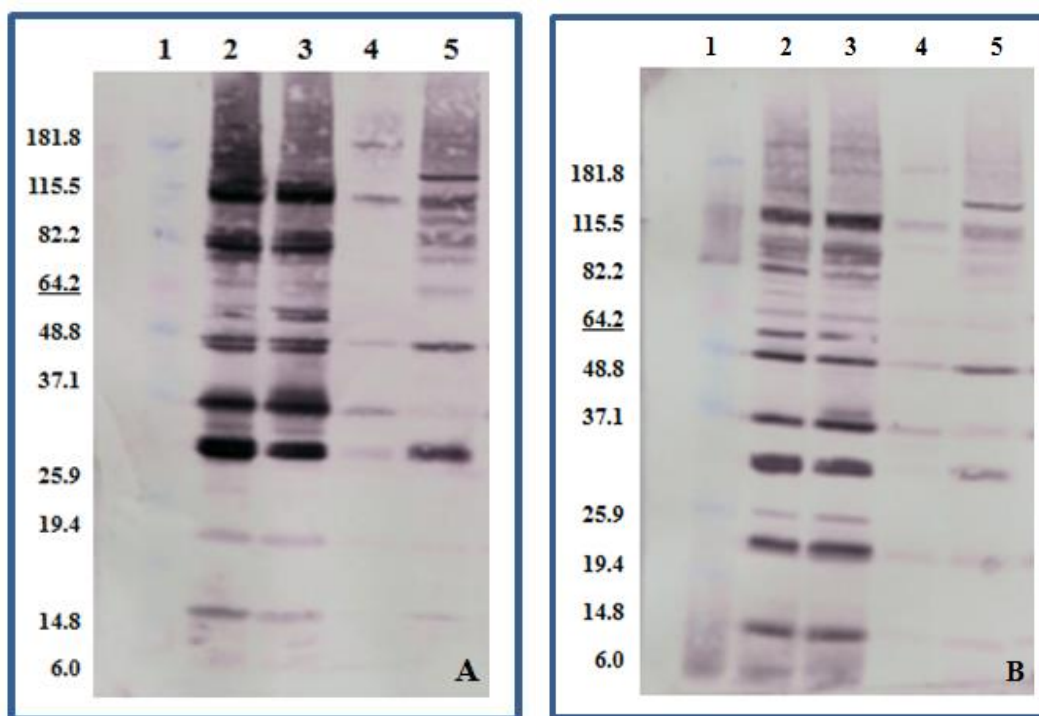


Figura 4.13. *Western Blot* realizado com soro anti-NAP (A) e anti-T6' (B), contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE. 1- PSM, 2 e 3 -T6', 4-T6', 4-6T, 5-8T.

De forma a avaliar a imunovariabilidade associada à proteína NAP, foram efetuados dois *Westerns Blots* (Fig.4.14 e 4.15) com o soro anti-NAP contra as diferentes estirpes de *H. pylori* isoladas de pacientes com diferentes doenças gástricas e de localizações geográficas distintas (Tabela 4.5). Como se pode observar nas linhas 4, 5, 6, 7 e 8 (Fig.4.14) que correspondem respetivamente às estirpes de *H. pylori*, B23/95, 26695, J99, 499/02, 1198/04 e nas linhas 4, 6, 7, e 8 (Fig.4.15) às estirpes A3/90, EN52, 655/99 e Mex 288, ocorreu um forte reconhecimento do soro anti-NAP com uma proteína de aproximadamente 30 kDa. Por comparação com a linha 3, correspondente à NAP, é possível especular que esta banda corresponda a um multímero da NAP e que está presente na sua forma nativa nas estirpes da *H. pylori*. Também se verifica, por exemplo, nas linhas 4 (Fig.4.14) estirpe B23/95, e 3 (Fig.4.15) estirpe 173/00, o reconhecimento de outras proteínas de maiores pesos moleculares, também coincidentes com as bandas da NAP (linha 3). Apenas nas estirpes 655/99 e Mex 288 (Fig.4.15, linhas 7 e 8), observa-se uma banda com aproximadamente 19 kDa que corresponde à dimensão molecular do monómero da NAP. Para as estirpes MONA e 583 (Fig.4.14., linhas 9 e 10) e

SS1, Arg e 1152 (Fig 4.15., linhas 5, 9 e 19), embora se visualizem algumas bandas, a reação com o soro anti- NAP é menos intensa, o que pode indicar um fraca ou inexistente presença da NAP nessas estirpes.

Em suma, se considerar-mos que todas as bandas reconhecidas pelo soro anti-NAP, correspondem a múltímeros da NAP, e não a outras proteínas da *H. pylori* que poderiam também reagir com o soro anti-NAP, é possível considerar que todas as estirpes de *H. pylori* utilizadas neste estudo contêm a NAP imunoconservada, de acordo com o observado por Dundon *et al.*, (2001). Portanto, em conformidade com estes resultados, a NAP constitui um antigénio interessante para ser utilizado em vacinas ou em testes de diagnóstico. No entanto, para a confirmação desta hipótese, seria necessário, no futuro, a utilização de um maior número de estirpes.

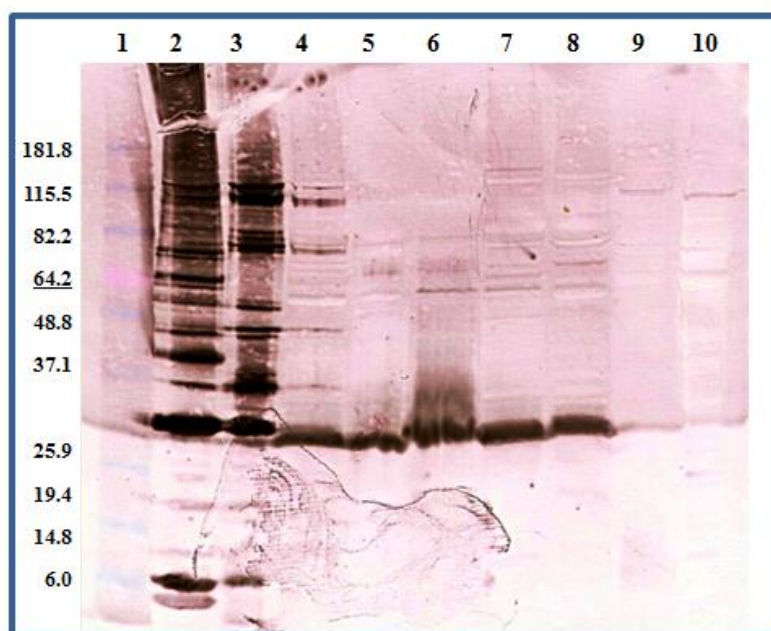


Figura 4.14. *Western Blot* realizado com soro anti-NAP, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE.1- PSM, 2-NAP, 3-T6', 4- lisados de *H. pylori* B23/95, 5- lisados de *H. pylori* 26695, 6-lisados de *H. pylori* J99, 7- lisados de *H. pylori* 499/02, 8- lisados de *H. pylori* 1198/04, 9- lisados de *H.pylori* MONA, 10- lisados de *H. pylori* 583.

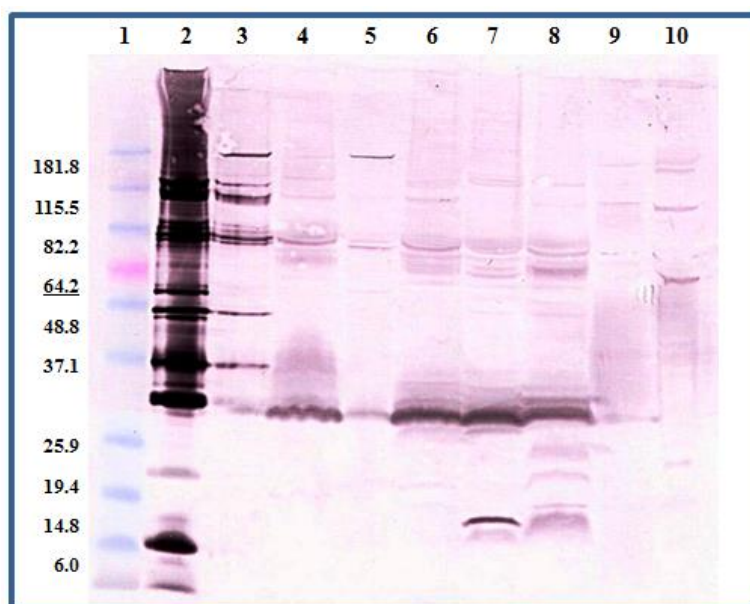


Figura 4.15. *Western Blot* realizado com soro anti-NAP, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE. 1- PSM, 2-T6', 3- lisados de *H. pylori* 173/00, 4- lisados de *H. pylori* A3/90, 5- lisados de *H. pylori* SS1, 6-lisados de *H. pylori* EN52, 7- lisados de *H. pylori* 655/99, 8- lisados de *H. pylori* Mex 288, 9- lisados de *H. pylori* Arg, 10- lisados de *H. pylori* 1152/04.

Nas figuras 4.16 e 4.17 estão representados os *Westens Blots* realizados com o soro obtido dos murganhos imunizados com a estirpe 26695 (soro anti-estirpe 26695) contra as proteínas NAP, T6', 6T e 8T e os lisados das várias estirpes de *H. pylori*, representadas na tabela 4.5. Na figura 4.16, verifica-se que ocorreu um fraco reconhecimento das proteínas da NAP e da construção 8T (linhas 2 e 5) pelo o soro anti-estirpe 26695, pois observam-se bandas muito tenues. No entanto, este mesmo soro não reconheceu as proteínas 6T' e 6T (linhas 3 e 4). Uma vez que a NAP pertence à estirpe 26695 é de esperar que ocorra um reconhecimento da NAP pelo soro anti-26695, no entanto, uma vez que a imunização foi efetuada com diversas proteínas lisadas da estirpe 26695, o soro produzido contém anticorpos contra todas estas proteínas o que consequentemente resulta num reconhecimento menos acentuado e específico.

Quanto aos lisados das diferentes estirpes de *H. pylori*, ocorreu de forma geral o reconhecimento das proteínas das diferentes estirpes, sendo este reconhecimento mais acentuado nas estirpes 26695, J99, 499/02, 1198/04, A3/90, EN52, 655/99, Arg e 1152/04 e menos acentuado nas estirpes B23/99, MONA, 583, 173/00, Mex e SS1. De acordo com estes resultados, é possível especular que as estirpes onde ocorreu um maior reconhecimento das proteínas pelo soro anti-26695, têm uma idêntica/conservada constituição imuno-proteica, relativamente às proteínas da estirpe 26695, enquanto as estirpes menos reconhecidas, podem conter uma maior diversidade proteica.

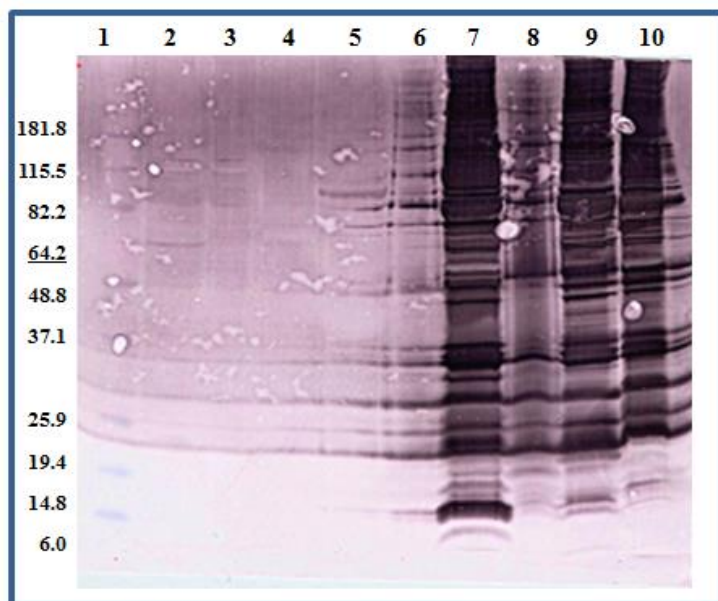


Figura 4.16. *Western Blot* realizado com soro anti-estirpe 26695, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE. 1- PSM, 2-NAP, 3-T6', 4- 6T, 5- 8T, 6- lisados de *H. pylori* B23/99, 7- lisados de *H. pylori* 26695, 8-lisados de *H. pylori* J99, 9- lisados de *H. pylori* 499/02, 10- lisados de *H. pylori* 1198/04.

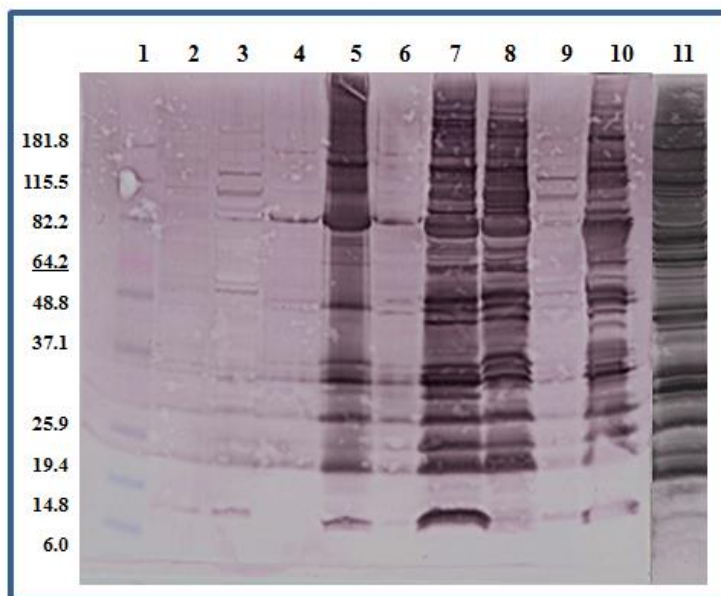


Figura 4.17. *Western Blot* realizado com soro anti-estirpe 26695, contra as seguintes proteínas separadas previamente por SDS-PAGE. 1- PSM, 2- lisados de *H.pylori* MONA, 3- lisados de *H. pylori* 583, 4- lisados de *H. pylori* 173/00, 5- lisados de *H. pylori* A3/90, 6- lisados de *H. pylori* SS1, 7-lisados de *H. pylori* EN52, 8- lisados de *H. pylori* 655/99, 9- lisados de *H. pylori* Mex 288, 10- lisados de *H. pylori* Arg, 11- lisados de *H. pylori* 1152/04.

5. Conclusões

A infecção por *H. pylori* afeta cerca de 50% da população mundial e é responsável por diversas patologias gástricas. O estado de inflamação persistente que é desencadeado pela infecção dá origem a uma situação de gastrite crônica que pode evoluir para outras condições mais graves como úlceras duodenais, e cancro gástrico, que estão presentes em cerca de 15% e 1% dos pacientes infetados, respetivamente. Os tratamentos atuais para eliminação desta bactéria são baseados em antibióticos, mas têm sido afetados devido ao aumento da resistência. Com isto, e dado o problema que este microrganismo representa para a saúde pública, é essencial o desenvolvimento de novas estratégias que sejam eficazes na sua prevenção e/ou eliminação.

A vacinação tem sido amplamente relatada como uma estratégia para abordar esta problemática, no entanto, até hoje ainda não existe nenhuma vacina para uso comercial. Uma vacina eficaz contra a *H. pylori* deve ser capaz de desencadear respostas imunes, tanto nas mucosas como a nível sistémico, e em consequência desta resposta imune a infecção deve ser totalmente eliminada. Durante a infecção deteta-se uma resposta imune maioritariamente do tipo Th1, no entanto, dada a ineficácia observada da resposta Th1 na eliminação da bactéria, ainda existe muita controversia sobre qual a resposta do sistema imunitário mais adequada para induzir a proteção e a erradicação da bactéria. Há trabalhos que indicam que uma vacina deve desencadear uma resposta imune mista Th1 e Th2, enquanto outros sugerem que apenas é necessária a resposta Th1, e ainda outros que indicam que apenas é necessária uma resposta Th2.

Vários estudos em animais e ensaios clínicos têm testado uma série de vacinas contra a *H. pylori* que incluem células de *H. pylori* inativadas ou lisadas, antígenos purificados a partir da bactéria, antígenos recombinantes e vacinas de DNA. Em estudos em modelos animais, como ratos e murganhos, vários antígenos ou combinações de antígenos como UreB, NAP, CagA, VaCa, HspA, HpaA foram testadas em conjunto com adjuvantes, sendo que, muitas destas vacinas foram eficazes na indução de respostas humorais e celulares e na redução da colonização bacteriana nos estômagos dos animais imunizados. Em ensaios clínicos humanos, existe ainda um número muito limitado de estudos nesta área, e na sua maioria, estes basearam-se apenas na administração do antígeno UreB e o adjuvante das mucosas LT ou utilizando estirpes de *Salmonella* atenuada. No entanto, nestes estudos, além dos efeitos adversos causados pela administração de LT, estas vacinas apenas induziram respostas imunes humorais nos indivíduos vacinados. Mais recentemente, uma vacina com os antígenos recombinantes CagA,

VacA, e NAP e hidróxido de alumínio, mostrou-se segura e capaz de estimular respostas imunes humorais e celulares específicas nos indivíduos testados. Estes resultados, apesar de não serem totalmente satisfatórios, realçam o fato de que, a vacinação é sem dúvida a melhor estratégia para abordar a problemática da infecção por *H. pylori*, mas que, no entanto, ainda necessita ser melhor explorada em aspetos que visam aumentar a eficácia da vacina, como por exemplo, o tipo de vacina, a estratégia de administração, o tipo de adjuvantes, e principalmente, a seleção adequada de antigénios.

A deteção da infecção por *H. pylori* pode ser efetuada por métodos invasivos baseados na endoscopia, como a histologia, cultura, teste da urease e testes moleculares, ou por métodos não invasivos como a sorologia, que deteta anticorpos específicos IgG anti- *H. pylori* no soro do paciente, o teste respiratório da ureia, baseada no princípio da atividade da urease, e o teste do antigénio fecal, que deteta antigénios da *H. pylori* nas fezes e pode ser constituído por anticorpos policlonais e monoclonais. Segundo alguns estudos, os testes baseados em anticorpos monoclonais são mais eficazes, no entanto, por detetarem apenas um epitopo num antigénio este teste não é específico o suficiente para a deteção da *H. pylori*. Apesar destes testes apresentarem níveis de precisão aceitáveis, estes têm algumas limitações. Em consequência disso, surge a necessidade de melhorar o desempenho destes testes de diagnóstico, como por exemplo através da deteção e seleção adequada de antigénios para utilização em testes de diagnóstico mais eficazes, como a sorologia e o SAT.

A NAP, é um dos principais fatores de virulência produzidos pela *H. pylori* e que, devido à sua capacidade de ativar neutrófilos humanos, representa um importante papel no processo de infecção direto da bactéria e desempenha um efeito imunomodulador que contribui para o desenvolvimento da infecção crónica. Vários autores sugeriram até agora, que a NAP pode ser um antigénio relevante para as conceção de vacinas e de testes de diagnóstico, pois esta proteína, não só já foi identificada em várias estirpes de *H. pylori*, mas também revelou ser imunorreativa contra soros de pacientes infetados. Além disso, vários estudos relatam a elevada imunogenicidade da NAP, tanto em ratos como em seres humanos. Outros trabalhos sugerem que a NAP pode ser considerada como um indicador da gravidade da infecção, uma vez que os anticorpos anti-NAP são encontrados na grande maioria em pacientes com doenças gástricas graves, como cancro gástrico e úlcera péptica.

No estudo da variabilidade da NAP, observa-se que o gene da NAP é 82,3 % conservado e a proteína 88,3 % conservada, observando-se uma taxa de mutações sinonimas de 11% e não sinónimas de 1%. Por comparação com o gene VacA, o gene da NAP é mais conservado, o que torna esta proteína, um antigénio mais interessante na conceção de vacinas e de testes de diagnóstico. No entanto, devido ao elevado número de alelos (45) existentes nas 51

sequências analisadas, observa-se que este gene apresenta alguma variabilidade nucleotídica e que a recombinação é o principal fator que contribui para esta variabilidade, o que é comum a estruturas populacionais panmíticas como a *H. pylori*. Também o número de locais não sinónimos observados, e dos testes D apontam para uma seleção direcional, é portanto provável que esteja a ocorrer uma nova seleção de alelos mais vantajosos devido a modificações nos hábitos de higiene do hospedeiro. No caso de *H. pylori*, esta seleção direcional tende a gerar alelos diferentes. No entanto, e devido à distância geográfica, através da árvore filogenética da NAP, é possível observar a formação de pequenos aglomerados em função da origem geográfica da estirpe.

As ferramentas de bioinformática permitem aos investigadores poupar muitos recursos económicos em experiências laboratoriais, uma vez que fornecem métodos precisos para estimar a imunogenicidade de antígenos. Assim sendo, através da combinação de métodos de previsão de epitopos B e T, foi possível obter uma representação gráfica dos locais da proteína mais imunogénicos, que torna possível a seleção do fragmento mais antigénico para epitopos B e T. Além disso devido à diversidade genómica da *H. pylori*, os fragmentos selecionados correspondem a regiões conservadas da sequência de aminoácidos da NAP, para que a vacina seja eficaz contra o maior número possível de estirpes de *H. pylori*. Ao contrário de outras abordagens que têm sido realizadas em vacinas contra a *H. pylori*, em que utilizam a sequência total do gene que codifica a proteína antigénica (Miyashita *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007), ao se escolher apenas um fragmento da proteína antigénica, existe uma maior probabilidade maximizar o efeito biológico destes epitopos, evitando-se em simultâneo possíveis efeitos tóxicos da proteína inteira, e de se associar este fragmento a outros alvos também pertinentes. Neste contexto, tem sido desenvolvida uma vacina com epitopos MHC-II com os antígenos CagA, VacA e UreB, que resultou na proteção significativa contra a infeção por *H. pylori* em murganhos (Liu *et al.*, 2011). Em suma, neste trabalho, ao selecionarmos o fragmento antigénico da proteína NAP mais imunogénico e conservado, pode ser possível usar este fragmento antigénico quer para o desenvolvimento de vacinas quer para testes de diagnóstico moleculares, uma vez que, como já descrito capítulo anterior, a NAP representa um bom candidato a antígeno para este tipo de aplicações.

Neste mesmo capítulo, as sequências proteicas da NAP de algumas estirpes de *H. pylori* foram introduzidas no programa *Lasergene*® *Protean*TM e detetou-se que algumas destas estirpes apresentam pequenas diferenças no perfil antigénico em relação à sequência consenso devido a mutações pontuais. Em outros casos, a ocorrência de mutações não sinónimas não fez alterar o perfil de antigenicidade mantendo-se este igual ao da sequência consenso.

De forma a avaliar o potencial desta proteína como antígeno na concepção de vacinas e de testes de diagnóstico avaliou-se experimentalmente a imunovariabilidade da NAP. Para isso, foram formuladas duas vacinas, uma proteica e outra de DNA, baseadas na inserção do gene da NAP da estirpe de referência *H. pylori* 26695, no plasmídeo procariota pQE30 e no plasmídeo eucariota pVAX. De forma a validar a construção da vacina de DNA, o plasmídeo pVAX-NAP foi produzido em células de *E. coli* e em seguida purificado e transfetado em células HEK293T. Devido à fusão da sequência *tag-FLAG* ao gene da NAP, foi possível detectar-se a expressão da NAP através de anticorpos anti-FLAG por imunofluorescência. Para validar a construção da vacina proteica, foi efetuada a indução da expressão da NAP em culturas de *E. coli* através do indutor IPTG. Em seguida a proteína foi purificada através de colunas de afinidade à base de níquel e detectada por *Western Blot* através de anticorpos anti-His. Devido à tendência natural da NAP para formar multímeros, não foi possível observar bandas de peso molecular correspondentes ao seu monómero, mas sim, bandas de maiores pesos moleculares que correspondem do mesmo modo, à proteína de interesse.

Após o ensaio de imunização dos murganhos com a proteína recombinada NAP e T6' e com os plasmídeos pVAX-NAP e pVAX-T6' e diversas estirpes de *H. pylori*, avaliou-se a resposta imune através de ensaios de ELISA com os soros obtidos. De uma forma geral observou-se níveis séricos de anticorpos IgG, IgG2a e IgG1 mais elevados nos murganhos imunizados com as proteínas recombinantes em relação às imunizações efetuadas com os plasmídeos recombinantes, tal como seria de esperar, uma vez que os ensaios de vacinação com plasmídeo não apresentam de uma forma geral, uma baixa estimulação do sistema imunitário em comparação com as vacinas de proteínas. Também foi observado que a proteína NAP induz uma resposta Th1 e Th2 forte e mais equilibrada do que a proteína multi-antigénica T6', que induziu uma resposta predominante Th2. A imunização dos murganhos com os sonificados das diferentes estirpes de *H. pylori*, desencadeou uma resposta imune equilibrada Th1 e Th2.

Nos ensaios de *Western Blot*, observou-se que as várias proteínas da NAP separadas por SDS-PAGE são reconhecidas intensamente pelo soro anti-NAP, o que era de esperar uma vez que foi com esta proteína que foi efetuada a imunização dos murganhos, e pelo soro anti-T6', pois um dos 6 antígenos constituintes da proteína multimérica T6' é um pequeno fragmento da NAP e por isso a imunização dos murganhos com T6' levou à produção de anticorpos específicos contra esse pequeno fragmento da NAP. Num outro ensaio detetou-se que as proteínas T6' e 8T foram reconhecidas pelo soro anti-NAP o que era esperado uma vez que a proteína NAP faz parte da constituição antigénica de ambas as construções. Com a proteína 6T ocorreu um fraco reconhecimento uma vez que esta construção não contém a NAP.

De forma a avaliar a imunovariabilidade associada à proteína NAP, foram efetuados dois *Westerns Blots* com o soro anti-NAP contra extratos proteicos de diversas estirpes de *H. pylori* isoladas de pacientes de diferentes localizações geográficas. Observou-se que, em praticamente todas as estirpes de *H. pylori*, ocorreu um forte reconhecimento do soro anti-NAP com proteínas de pesos moleculares que provavelmente correspondem a multímeros da NAP. Num pequeno número de estirpes, embora se visualizem algumas bandas, a reação com o soro anti-NAP é menos intensa, o que pode indicar uma fraca ou inexistente presença da NAP nessas estirpes. Em conformidade com estes resultados, é possível especular que a NAP é de forma geral, uma proteína imuno-conservada e portanto constitui um antígeno interessante para ser usado em vacinas ou em testes de diagnóstico. No entanto, para a confirmação desta hipótese, seria necessário, no futuro, a realização deste ensaio com um maior número de estirpes. Após a realização deste ensaio, seria pertinente tentar estabelecer uma relação entre a presença da NAP e patologia gástrica.

Nos *Westerns Blots* realizados com o soro anti-estirpe 26695 contra as proteínas NAP, T6', 6T e 8T e os lisados das várias estirpes de *H. pylori*, observou-se que o soro anti-estirpe 26695 reconheceu fracamente as proteínas da NAP e da proteína 8T, e não reconheceu as proteínas T6' e 6T. Uma vez que a NAP pertence à estirpe 26695 é de esperar que ocorra um reconhecimento da NAP pelo soro anti-26695, no entanto, uma vez que a imunização foi efetuada com diversas proteínas da estirpe 26695, o soro produzido contém anticorpos contra todas estas proteínas o que consequentemente resulta num reconhecimento mais fraco e menos específico. O soro anti-estirpe 26695 reconheceu de uma forma geral proteínas das diferentes estirpes, sendo esse reconhecimento mais acentuado numas estirpes do que noutras. Com estes resultados, é possível deduzir que as estirpes onde ocorreu um maior reconhecimento de proteínas pelo soro anti-26695, apresentam um perfil imunogénico semelhante ao da estirpe 26695, enquanto as estirpes menos reconhecidas, apresentam perfis imunogénicos diferentes.

6. Referências Bibliográficas

Achtman M., Suerbaum S. (2000). Sequence variation in *Helicobacter pylori*. Elsevier Science Ltd. *Comment Id J Gastroenterol.* 12 : 7042-7046.

Aebischer T., Schmitt A., Walduck K.A., Meyer F.T. (2005). *Helicobacter pylori* vaccine development: Facing the challenge. *International Journal of Medical Microbiology* 295 : 343–353.

Amieva R.M., El-Omar M.E. (2008). Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology* 134 : 306-323.

Angelakopoulos H., Hohmann E.L. (2000). Pilot study of phoP/phoQ deleted *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect Immun* 68 : 2135–2141.

Banerjee S., Medina-Fatimi A., Nichols R., Tendler D., Michetti M., Simon J., Kelly C.P., Monath T.P., Michetti P. (2002). Safety and efficacy of low dose *Escherichia coli* enterotoxin adjuvant for urease based oral immunisation against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers. *Gut* 51 : 634–640.

Bernard M., D’Elios M. M. (2010). The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: Friend or foe? *Toxicon* 56 :1186–1192.

Bumann D., Metzger W.G., Mansouri E., Palme O., Wendland M., Hurwitz R., Haas G., Aebischer T., Von Specht B.U., Meyer T.F. (2001). Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* 20 : 845–852.

Cadete A., Figueiredo L., Lopes R., Calado C., Almeida A ., Gonçalves L. (2012) Development and Characterization of New Plasmid Delivery System Based on Chitosan-Sodium Deoxycholate Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 : 451-458.

Carvalho A. J., Azzoni R.A., Prazeres F.M.D., Monteiro A.G. (2010). Comparative Analysis of Antigen-Targeting Sequences Used in DNA Vaccines. *Mol Biotechnol* 44 : 204–21.

- Chen J., Lin L., Li N., She F. (2012). Enhancement of *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein DNA vaccine efficacy by co-delivery of interleukin-2 and B subunit heat-labile toxin gene encoded plasmids and B subunit heat-labile toxin gene. *Microbiol Immunol* 56 : 85–92.
- Chen M., Chen J, Liao W., Zhu S., Yu J., Leung K.W., Hu P., Sung Y. J. J. (2003). Immunization with Attenuated *Salmonella typhimurium* Producing Catalase in Protection against Gastric *Helicobacter pylori* Infection in Mice. *Helicobacter* 8 : 613–625.
- Choli-Papadopoulou T., Kottakis F., Papadopoulos G., Pendas S. (2011). *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein as target for new drugs against *H. pylori* inflammation. *World J Gastroenterol* 17: 2585-2591.
- Clamp M., Cuff, J., Searle S.M., Barton, G.J. (2004). The Jalview Java Alignment Editor. *Bioinformatics* 20 : 426-7.
- Correa P., Piazzuelo B.M. (2008). Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Digestive and Liver Disease* 40 : 490–496.
- Corthesy-Theulaz I., Porta N., Glauser M., Saraga E., Vaney A.C., Haas R., Kraehenbuhl J.P., Blum A.L., Michetti P. (1995). Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against *Helicobacter infection* in mice. *Gastroenterology* 109 : 115–121.
- Coyne E.V., James D. M., Reid J. S., Rybicki P. E. (2001). PCR Primer Design and reaction optimization. *Molecular Biology Techniques Manual*. Third Edition.
- DiPetrillo M.D., Tibbetts T., Kleanthous H., Killeen K.P., Hohmann E.L. (1999) Safety and immunogenicity of phoP/phoQ-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine* 18 : 449–459.
- Dundon G. W., Bernard M., Montecucco C. (2001). Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Int.J. Med. Microbiol.* 290 : 647-658.
- Dzwonek A., Mikula M., Woszczyński M., Hennig E., Ostrowski J. (2004). Protective effect of vaccination with DNA of the *H. pylori* genomic library in experimentally infected mice. *Cellular & Molecular Biology Letters* 9 : 483 – 495.
- Ermak T.H., Giannasca P.J., Nichols R., Myers G.A., Nedrud J., Weltzin R. (1998). Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* 188 : 2277–88.

- Ferrero R.L., Thiberge J.M., Kansau I., Wuscher N., Huerre M., Labigne A. (1995). The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 6499–6503.
- Go M.F., Kapur V., Graham D.Y., Musser J.M. (1996). Population Genetic Analysis of *Helicobacter pylori* by Multilocus Enzyme Electrophoresis: Extensive Allelic Diversity and Recombinational Population Structure. *J. Bacteriol.* 178 : 3934–3938.
- Greenland R.J., Letvin L.N. (2007). Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine* 25 : 3731–3741.
- Han Z. S., Li Q. W., Zhang Z. Y., Xiao B., Gao D. W., Wu S. Y., Li J., Zhao H. W., Jiang Z. L., Hu J. H. (2007). High-level expression of human lactoferrin in the milk of goats by using replication-defective adenoviral vectors. *Protein Expr Purif* 53 : 225-231.
- Hatzifoti C., Bajaj-Elliott M., Dorrell N., Anyima M., Prentice B.M., Nyea E.K., Wrena B., Morrow W. J.W. (2004). A plasmid immunization construct encoding urease B of *Helicobacter pylori* induces an antigen-specific antibody response and upregulates the expression of β -defensins and IL-10 in the stomachs of immunized mice. *Vaccine* 22 : 2651–2659.
- Iankov D. I., Haralambieva H. I., Galanis E. (2011). Immunogenicity of attenuated measles virus engineered to express *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Vaccine* 29 : 1710–1720.
- Ikewaki J, Nishizono A., Goto T., Fujioka T., Mifune K. (2000). Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. *Microbiology Immunology* 44: 29–39.
- Ingolotti M., Kawalekar O., Shedlock J.D., Muthumani K., Weiner B.D. (2010). DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev Vaccines* 9 : 747–763.
- Jameson B.A., Wolf H. (1988) The Antigenic Index: a Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants. *Comput Appl Biosci* 4: 181-186.
- Kabir S. (2003). Review article: clinic-based testing for *Helicobacter pylori* infection by enzyme immunoassay of faeces, urine and saliva. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 1345–1354.
- Kamradt A. E., Greiner M., Ghiara P., Kaufmann S. H. (2000). *Helicobacter pylori* infection in wild-type and cytokine-deficient C57BL/6 and BALB/c mouse mutants. *Microbes Infection* 2: 593–597.

- Khoder G., Yamaoka Y., Fauchère J., Buruoca C., Atanassov C. (2009). Proteomic *Helicobacter pylori* biomarkers discriminating between duodenal ulcer and gastric cancer. *Journal of Chromatography B* 877 : 1193–1199.
- Kimmel B., Bosserhoff A., Frank R., Gross R. Goebel W., Beier D. (2000). Identification of Immunodominant Antigens from *Helicobacter pylori* and Evaluation of Their Reactivities with Sera from Patients with Different Gastroduodenal Pathologies. *Infeccion and Immunity* 68 : 915–920.
- Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A., Kuby J.(2006). Kuby immunology. New York, N.Y. ; Basingstoke: W.H. Freeman.
- Kotloff K.L., Sztein M.B., Wasserman S.S., Losonsky G.A., DiLorenzo S.C., Walker R.I. (2001). Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immun* 69 : 3581–3590.
- Kusters J. G., Vliet H. A., Kuipers E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin.Microbiol.Rev.* 19 : 449-490.
- Li H., Zhang J., He Y, Chen L., Li B, Liu K., Yang W., Zhao Z., Zou Q., Wu C. (2012). Systemic immunization with an epitope-based vaccine elicits a Th1-biased response and provides protection against *Helicobacter pylori* in mice. *Vaccine* 31 : 120– 126.
- Liao J., Sun Y., Hsu C., Lin Y., Wu S., Kuo C., Huang C., Chiou S. (2013). Up-regulation of neutrophil activating protein in *Helicobacter pylori* under high-salt stress: Structural and phylogenetic comparison with bacterial iron-binding ferritins. *Biochimie* 95 : 1136 – 1145.
- Librado P., & Rozas J. (2009). DnaSP v5.10: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 : 1451-1452.
- Liu K., Shi Y., Luo P., Yu S., Chen L., Zhao Z., Mao X., Guo G., Wu C., Zou Q. (2011). Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model. *Vaccine* 29 : 6679–6685.
- Long M., Luo J., Li Y., Zeng F., Li M. (2009). Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 15 : 2381-2388.

- Losonsky G.A., Kotloff K.L., Walker R.I. (2003). B cell responses in gastric antrum and duodenum following oral inactivated *Helicobacter pylori* whole cell (HWC) vaccine and LT(R192G) in *H. pylori* seronegative individuals. *Vaccine* 21 : 562–565.
- Majumdar D., Bebb J., Atherton J. (2010). *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. *Medicine* 39 : 3.
- Malfertheiner P., Megraud F., O’Morain A. C., Atherton J., Axon R.T.A., Bazzoli F., Gensini F. G., Gisbert P.J., Graham Y.D., Rokkas T., El-Omar M. E., Kuipers J. E. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht IV/ Florence ConsensoReport. *Gut* 61 : 646 – 664.
- Malfertheiner P., Schultze V., Rosenkranz B., Kaufmann S.H., Ulrichs T., Novicki D., Norelli F., Contorni M., Peppoloni S., Berti D., Tornese D., Ganju J., Palla E., Rappuoli R., Scharschmidt B.F., Del Giudice G. (2008). Safety and Immunogenicity of an Intramuscular *Helicobacter pylori* Vaccine in Noninfected Volunteers: A Phase I Study. *Gastroenterology* 135 : 787-795.
- Margalit H., Spouge J. L., Cornette J. L., Cease K. B., Delisi C., Berzofsky J. A. (1987) Prediction of Immunodominant Helper T Cell Antigenic Sites From the Primary Sequence. *J Immunol* 138 : 2213-2229.
- Marshall B. J., Warren J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* I : 1311–1315.
- McAtee P. C., Lim Y. M., Fung K., Velligan M., Fry Kirk., Chow T., Berg E. D. (1998). Identification of Potential Diagnostic and Vaccine Candidates of *Helicobacter pylori* by Two-Dimensional Gel Electrophoresis, Sequence Analysis, and Serum Profiling. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5 : 537–542.
- Metzger W.G., Mansouri E., Kronawitter M., Diescher S., Soerensen M., Hurwitz R., Bumann D., Aebischer T., Von Specht B.U., Meyer T.F. (2004). Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant *Salmonella enterica* serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* 22 : 2273–2277.
- Michetti P., Kreiss C., Kotloff K.L., Porta N., Blanco J.L., Bachmann D., Herranz M., Saldinger P.F., Corthesy-Theulaz I., Losonsky G., Nichols R., Simon J., Stolte M., Ackerman S., Monath T.P., Blum A.L. (1999). Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori* infected adults. *Gastroenterology* 116 : 804–812.

- Mini R., Bernardini G., Salzano M. A., Renzone G., Scaloni A., Figura N., Santucci A. (2006). Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. *Journal of Chromatography B* 833 : 63–79.
- Miyashita M., Joh T., Watanabe K., Todoroki I., Seno K., Ohara H., Tomoyuki N., Miyata M, Kunio Kasugai K., Tochikubo K., Itoh M., Nitta M. (2002). Immune responses in mice to intranasal and intracutaneous administration of a DNA vaccine encoding *Helicobacter pylori*-catalase. *Vaccine* 20 : 2336–2342.
- Monack M.D., Mueller A., Falkow S. (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology* 2 : 747-765.
- Montecucco C., Bernard M. (2003). Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes and Infection* 5 : 715–721.
- Montemurro P., Nishioka H., Dundon G. W., Bernard M., Del Giudice G., Rappuoli R., Montecucco C. (2002). The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a potent stimulant of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 32: 671–676.
- Nystrom J., Svennerholm M.A. (2006). Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine* 25 : 2591–2598.
- Olaofe O.A., Burton S.G., Cowan D. A., Harrison S.T.L. (2010). Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 52 : 19-24.
- Pan Z.J., Van Der Hulst R.W.M., Feller M., Xiao S.D., Tytgat G.N.J., Dankert J., Van Der Ende A. (1997). Equally High Prevalences of Infection with cagA-Positive *Helicobacter pylori* in Chinese Patients with Peptic Ulcer Disease and Those with Chronic Gastritis-Associated Dyspepsia. *Journal of Clinical Microbiology* 35 : 1344-1347.
- Peek R.M., Jr., Fiske C., Wilson K.T. (2010). Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol Rev* 90 : 831-858.
- Ramos C.R., Abreu P.A., Nascimento A.L., Ho P.L. (2004). A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37:1103-1109.

- Ricci C., Holton J., Vaira D. (2007). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 21 : 299 – 313.
- Robinson K., Argent H. R., Atherton C. J. (2007). The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 21 : 237–259.
- Rossi G., Ruggiero P., Peppoloni S., Pancotto L., Fortuna D., Lauretti L., Volpini G., Mancianti S., Corazza M., Taccini E., Di Pisa F., Rappuoli R., Del Giudice G. (2004). Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infect Immun* 72 : 3252–3259.
- Rothbard J. B., Taylor W. R. (1988). A Sequence Pattern Common to T Cell Epitopes. *EMBO J* 7: 93-100.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 : 406-425.
- Satin B., Giudice D.G., Bianca D.V., Dusi S., Laudanna C., Tonello F., Kelleher D., Rino Rappuoli R., Montecucco C., Rossi F. (2000). The Neutrophil-activating Protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* Is a Protective Antigen and a Major Virulence Factor. *J. Exp. Med* 191 : 1467–1476.
- Sette A., Buus S., Colon S., Smith J.A., Miles C., Grey H.M. (1999). Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Trends in Microbiology* 328 : 395–399.
- Suerbaum S., Achtman M. (1999). Evolution of *Helicobacter pylori*: the role of recombination. *Trends in Microbiology* 7 : 182-184.
- Suerbaum S., Josenhans C. (1999). Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Molecular Medicine Today* 5 : 32–39.
- Suerbaum S., Michetti P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347 : 1175-1186.
- Suerbaum S., Smith J.M., Bapumia K., Morelli G., Smith N.H., Kunstmann E., Dyrek I., Achtman M. (1998). Free recombination within *Helicobacter pylori* (nucleotide sequencing horizontal genetic exchange evolution linkage equilibrium). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 12619–12624.

- Shi T., Liu W. Z., Gao F., Shi G. Y. & Xiao S. D. (2005). Intranasal CpG oligodeoxynucleotide is a potent adjuvant of vaccine against *Helicobacter pylori*, and T helper 1 type response and interferon-gamma correlate with the protection. *Helicobacter* 10: 71–79.
- Sun B., Li Z., Tu Z., Xu G., Du Y. (2006). Construction of an oral recombinant DNA vaccine from *H. pylori* neutrophil activating protein and its immunogenicity. *World J Gastroenterol.* 12 : 7042-7046.
- Taylor M. J., Ziman E. M., Canfield R. D., Vajdy M. (2008). Effects of a Th1- versus a Th2-biased immune response in protection against *Helicobacter pylori* challenge in mice. *Microbial Pathogenesis* 44 : 20–27
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 : 585-595.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 : 11030-11035.
- Teich A. Lin H.Y., Andersson L., Meyer S., Neubauer P. (1998). Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG induction. *J Biotechnol* 64 : 197-210.
- Terpe K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60 : 523-533.
- Todoroki I., Joh T., Watanabe K., Miyashita M, Seno K., Nomura T., Ohara H., Yokoyama Y., Tochikubo K., Itoh M. (2000). Suppressive Effects of DNA Vaccines Encoding Heat Shock Protein on *Helicobacter pylori*-induced Gastritis in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277 : 159–163.
- Vaira D., Gatta L., Ricci C., D’Anna L., Miglioli M. (2001). *Helicobacter pylori*: diseases, tests and treatment. *Digest Liver Dis* 33 : 788-94.
- Velin D, Michetti P. (2010). Advances in vaccination against *Helicobacter pylori*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4 : 157-166.
- Vitoriano I., Rocha-Gonçalves A., Carvalho T., Oleastro M., Calado C. R. C., Roxo-Rosa M. (2011). Antigenic Diversity Among Portuguese Clinical Isolates of *Helicobacter pylori*. *Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter* 16 : 153–168.

- Wang B., Ugen K.E., Srikantan V. (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90 : 4156–4160.
- Wang G., Hong Y., Olczak A., Maier S.E., Maier R.J. (2006). Dual roles of *Helicobacter pylori* NAPA in inducing and combating oxidative stress. *Infect. Immun.* 74 : 6839–6846.
- Wang G., Humayun M. Z., Taylor D.E. (1999). Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends in Microbiology* 7 : 488-493.
- Watterson G. A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* 7 : 256-276.
- Weng Y. P., Hsu F.C., Yang W.S., Chen H.P. (2006). Optimization of the overexpression of glutamate mutase S component under the control of T7 system by using lactose and IPTG as the inducers. *Enzyme Microb Tech* 38 : 465-469.
- Wilson T.K., Crabtree E.J. (2007). Immunology of *Helicobacter pylori*: Insights Into the Failure of the Immune Response and Perspectives on Vaccine Studies. *Gastroenterology* 133 : 288 – 308.
- Wu C., Shi Y., Guo H., Zhou W., Guo G., Xie Q., Mao X., Tong W., Zou Q. (2008). Protection Against *Helicobacter pylori* Infection in Mongolian Gerbil by Intragastric or Intramuscular Administration of *H. pylori* Multicomponent Vaccine. *Helicobacter* 13 : 191–199.
- Xu C., Li Z. S., Du Y. Q., Gong Y. F., Yang H., Sun B. and Jin J. (2007). Construction of Recombinant Attenuated *Salmonella* Typhimurium DNA Vaccine Expressing *H. Pylori* UreB and IL-2. *World J Gastroenterol* 13: 939-944.
- Xu C., Li Z. S., Du Y. Q., Tu Z. X., Gong Y. F., Jin J., Wu H. Y. and Xu G. M. (2005). Construction of a Recombinant Attenuated *Salmonella* Typhimurium DNA Vaccine Carrying *Helicobacter Pylori* HpaA. *World J Gastroenterol* 11 : 114-117.
- Yamazaki S., Yamakawa A., Okuda T., Ohtani M., Suto H., Ito Y., Yamazaki Y., Keida Y., Higashi H., Hatakeyama M., Azuma T. (2005). Distinct Diversity of vacA, cagA, and cagE Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 43 : 3906–3916.
- Zhao W., Wu W., Xu X. (2007). Oral vaccination with liposome-encapsulated recombinant fusion peptide of urease B epitope and cholera toxin B subunit affords prophylactic and therapeutic effects against *H. pylori* infection in BALB/c mice. *Vaccine* 25 : 7664–7673.

Zhou W., Shi Y., Wu C., Zhang W., Mao X., Guo G., Li H., Zou Q. (2009). Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine* 27 : 5013–5019.

Zhuang Y., Shi Y., Liu X., Zhang J., Liu T., Fan X., Luo J., Wu C., Yu S., Chen L., Luo P., Guo G., Liu Z., Tang B., Mao X., Guo Y., Zou Q. (2011). *Helicobacter pylori*-infected macrophages induce Th17 cell differentiation. *Immunobiology* 216 : 200–207.