

Helicobacter pylori: As defesas da bactéria

COSTA, Inês⁽¹⁾; CUSTÓDIO, Joana⁽¹⁾; FERREIRA, Sofia⁽¹⁾; LOUÇÃ, João⁽¹⁾; SILVA, Ana Catarina⁽¹⁾; RIBEIRO, Mónica⁽¹⁾ & JUSTINO, Marta⁽²⁾

⁽¹⁾ Escola Básica e Secundária Alfredo da Silva, Barreiro

⁽²⁾ Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal

INTRODUÇÃO

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria patogénica que afeta a mucosa gástrica de uma grande parte da população mundial, podendo causar úlceras pépticas e, frequentemente, cancro do estômago.

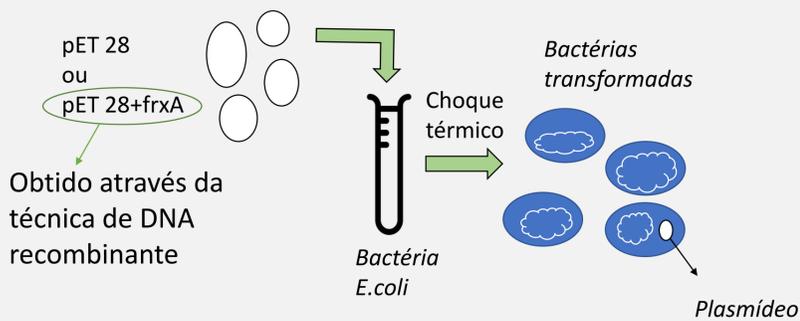
O sistema imunitário humano reage a esta infeção através de um mecanismo chamado stresse nitrosativo. A bactéria, por sua vez, contraria este mecanismo com a ajuda do gene *frxA*. No entanto, na presença de um antibiótico, este mesmo gene provoca a ativação do medicamento causando a morte da bactéria. Deste modo verifica-se a função dupla e contrastante do *frxA*, sendo a demonstração desta afirmação o principal objetivo deste trabalho.



O objetivo da nossa atividade experimental consiste na demonstração da colonização da bactéria mediante o meio e a presença ou ausência do gene *frxA*, para provar a dualidade deste gene.

Primeira parte – Placas de Petri

- Preparar o meio de cultura (H₂O+agar nutritivo);
- Criar o dador do stresse nitrosativo GSNO (H₂O+GSH+HCl+NO₂⁻);
- Antibiótico (Nitrofurantoína);
- Transformar as bactérias *Escherichia coli*, usando o plasmídeo pET 28:



Colocar os componentes preparados em três placas de Petri:



Segunda parte – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Terceira parte – Eletroforese

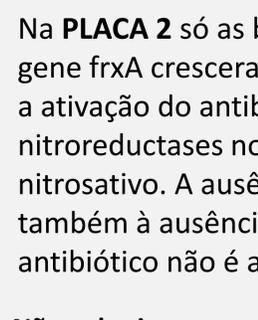
Amplificar as várias amostras de DNA para verificar a ausência ou presença de *frxA* nas placas de Petri.

MATERIAIS E MÉTODOS

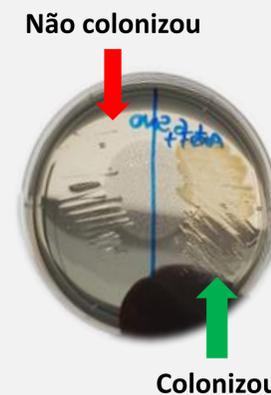
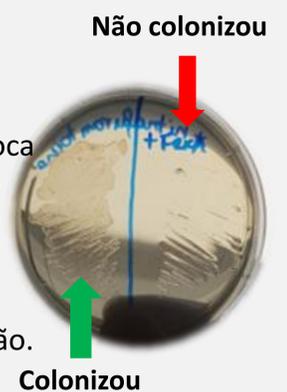
RESULTADOS E DISCUSSÃO



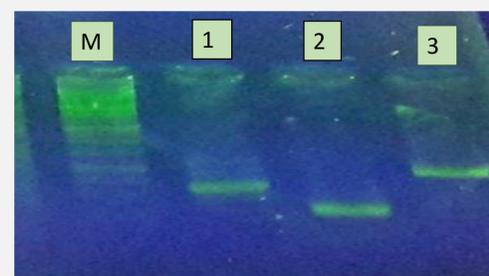
Na **PLACA 1** apenas com o meio de cultura (agar nutritivo), observou-se o crescimento das bactérias nos dois lados, tal como esperado (controlo).



Na **PLACA 2** só as bactérias sem o gene *frxA* cresceram, visto que este gene provoca a ativação do antibiótico devido à formação de nitroreductases no combate ao stress nitrosativo. A ausência do gene corresponde também à ausência destas enzimas, e assim o antibiótico não é ativo, permitindo a colonização.



Na **PLACA 3** só ocorre a colonização das bactérias com o gene *frxA*, pois este protege a bactéria do stress nitrosativo, reduzindo o GSNO em GSH e diminuindo os efeitos que esse mecanismo causa na bactéria, assegurando o seu crescimento. O lado da placa com plasmídeos sem o gene *frxA* não é colonizado, pois as bactérias não têm como defender-se deste stress e acabam por morrer.



1. Insert clonado (gene *frxA*)

2. Reação de PCR das bactérias contendo o pET28

3. Reação de PCR das bactérias contendo o pET28+*frxA*

- O menor avanço da reação do terceiro poço relativamente ao segundo comprova o maior peso do fragmento replicado, ou seja, o gene *frxA* está presente na reação.
- O maior número de bases nucleótidas no terceiro poço confirma também a presença do gene nas colónias.

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu verificar a dualidade do gene *frxA*, visto que permite o desenvolvimento da bactéria quando exposta ao GSNO, através da síntese de uma enzima que reduz o stress criado pelo sistema imunitário, mas por outro lado, sob o efeito de um antibiótico (nitrofurantoína) o gene ativa-o, provocando a morte da bactéria.

Com a ajuda do PCR foi possível confirmar os resultados obtidos nas placas de Petri ao amplificar as amostras de DNA e verificar a presença ou a ausência do gene *frxA* nas colónias, através da eletroforese.

PRESPETIVAS FUTURAS

A utilização de antibióticos contra a bactéria poderá torná-la mais resistente, por isso a criação de um medicamento que iniba o gene *frxA* contribuirá para o combate à *Helicobacter pylori*, apenas através do sistema imunitário. Deste modo, será possível enfraquecer a bactéria sem que esta se torne mais resistente ao combate.

BIBLIOGRAFIA

Flint, A.; Stintzi, A. & Saraiva, L.M. (2016) - Oxidative and nitrosative stress defences of *Helicobacter* and *Campylobacter* species that counteract mammalian immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* 40: 938-960.

Justino, M.C.; Parente, M.R.; Boneca, I.G. & Saraiva, L.M. (2014) - FrxA is an S-nitrosoglutathione reductase enzyme that contributes to *Helicobacter pylori* pathogenicity. *FEBS Journal.* 281: 4495-4505.

O'Morain, N.R.; Dore, M.P.; O'Connor, A.J.P.; Gisbert, J.P. & O'Morain C.A. (2018) - Treatment of *Helicobacter pylori* infection in 2018. *Helicobacter.* 23 (Suppl. 1): 9pp.

Waskito, L.A.; Salama, N.R. & Yamaoka, Y. (2018) - Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 23 (Suppl. 1): 6pp.