

DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE Frxa EM *Helicobacter pylori*, POR PCR

MARUJO, Daniela (1); MOREIRA, Érica (1); LIBERATO, Leonor (1); RIBEIRO, Mónica (1); GOMES, Gabriela (2); JUSTINO, Marta (2)

(1) 12.ªA (2023/2024) EBSAS - Escola Básica e Secundária Alfredo da Silva, Praça Bento Jesus Caraças, 2830-322 Barreiro, Portugal

(2) Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal, Rua Américo da Silva Marinho, 2839-001 Lavradio, Portugal

INTRODUÇÃO

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é uma técnica de amplificação in vitro de DNA e de RNA que permite a formação rápida de milhões de cópias de um segmento específico de DNA a partir dos elementos básicos do processo de replicação natural do DNA (1).

A análise dos resultados desta técnica é feita através da eletroforese em gel ou por sequenciação. Esta tecnologia é aplicada, por exemplo, em testes de paternidade, na análise de DNA forense e em testes de contaminação ambiental. A *Helicobacter pylori* é uma bactéria que infeta a mucosa gástrica criando úlceras pépticas, aumentando o risco de cancro no estômago (2). O plasmídeo comercial, pET-28a, contém uma sequência curta de DNA que incorpora zonas de reconhecimento para uma série de enzimas de restrição, o Multiple Cloning Site (MCS) (Fig.1), no qual se vai introduzir o gene pretendido de *H. pylori*, Frxa, que codifica a cada nitroreductase, uma proteína cuja atuação pode pôr em risco a atividade da *H. pylori* (3). Com isto, o **objetivo do trabalho** é, **através da PCR, verificar se o gene Frxa de *H. pylori*, foi clonado no plasmídeo pET-28a, através da técnica DNA recombinante (rDNA)**.

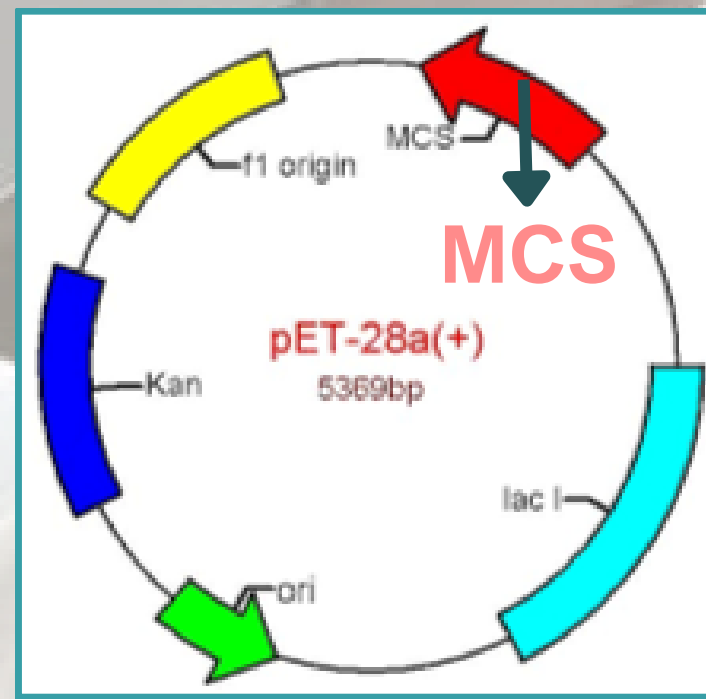


Fig. 1- Representação do plasmídeo pET-28a e do respetivo MCS

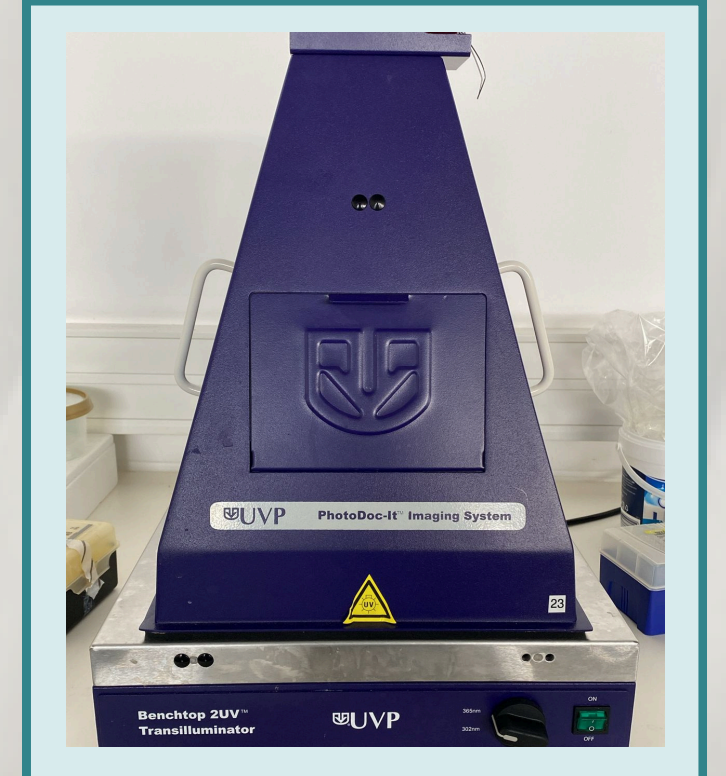
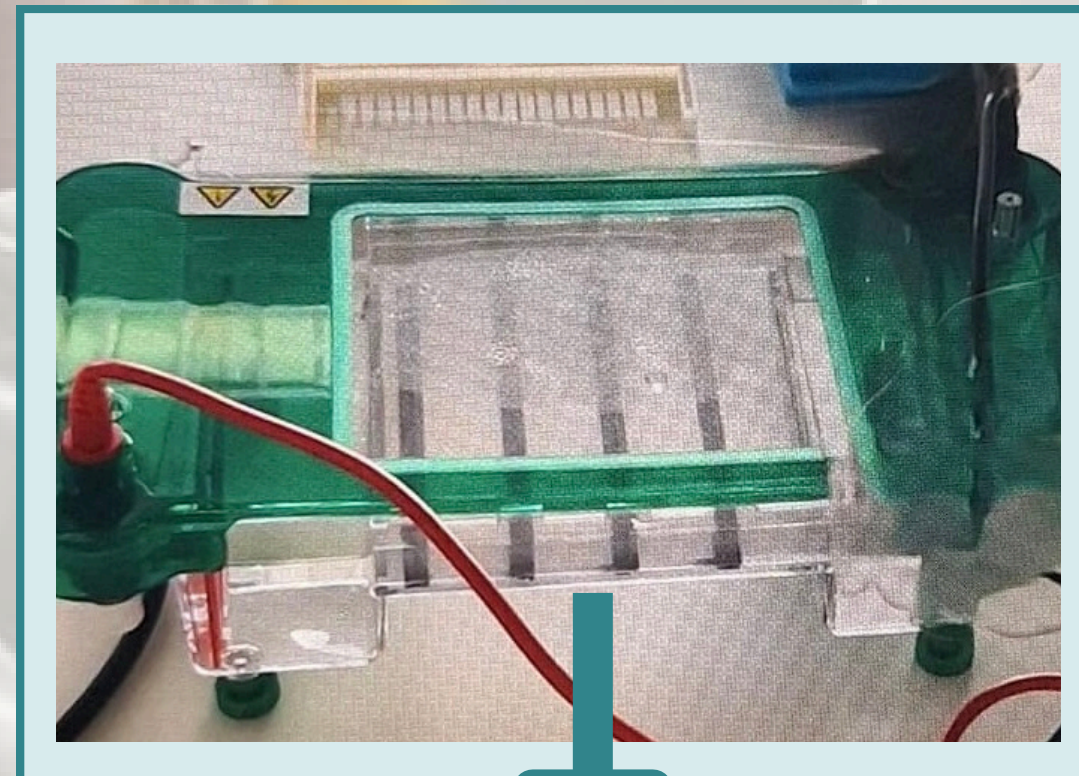
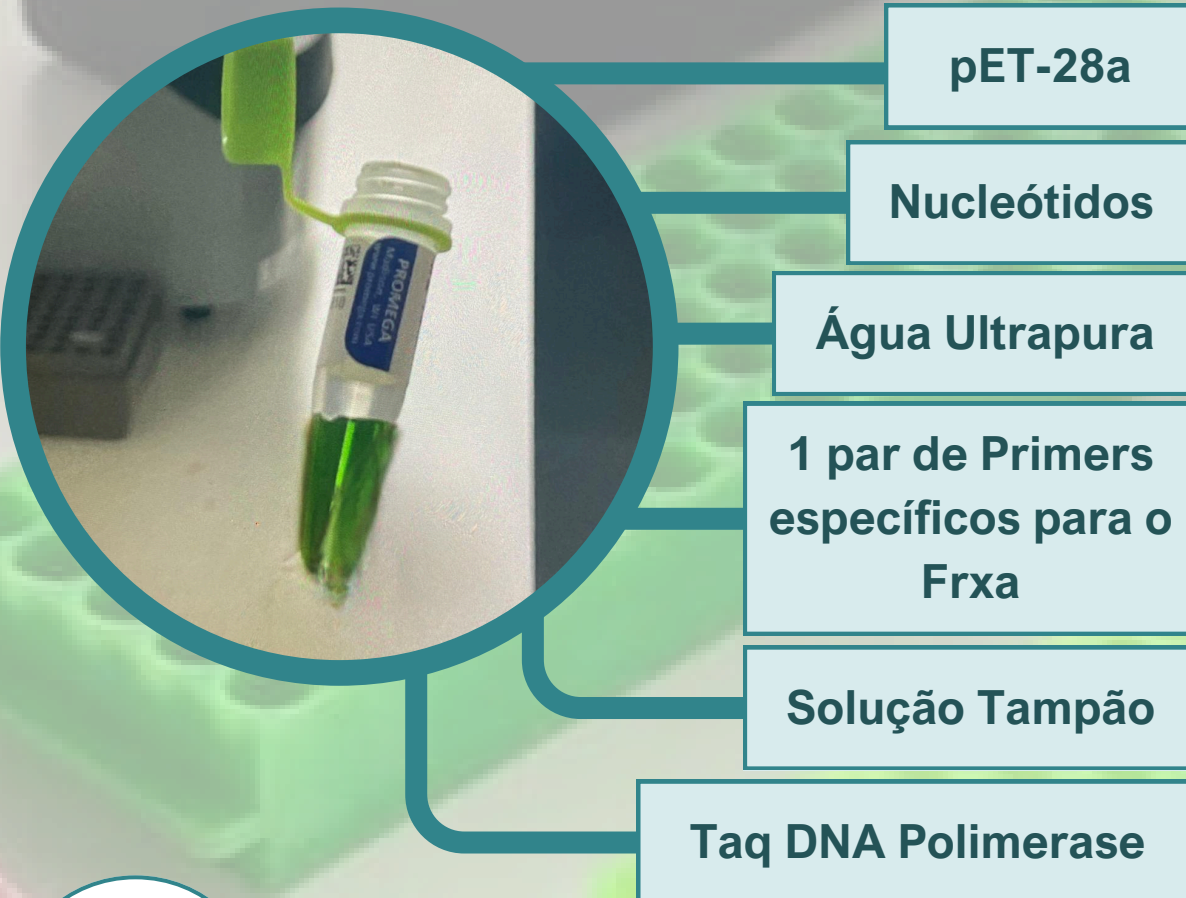
MATERIAIS E MÉTODOS

1 Preparação das Master Mix reacionais nos microtubos de PCR (Fig.2)

2 Incubação dos microtubos no termociclador (Fig.3)

3 Realização da eletroforese (Fig. 4)

4 Análise de resultados por transiluminador de radiação UV (Fig.5).



Amostras por poço no gel de agarose

Poço 1 - Controlo Positivo para o MCS

Poço 2 - 1ª Preparação

Poço 3 - Poço de separação

Poço 4 - Controlo Positivo para o Frxa

Poço 5 - Poço de separação

Poço 6 - 2ª Preparação

RESULTADOS

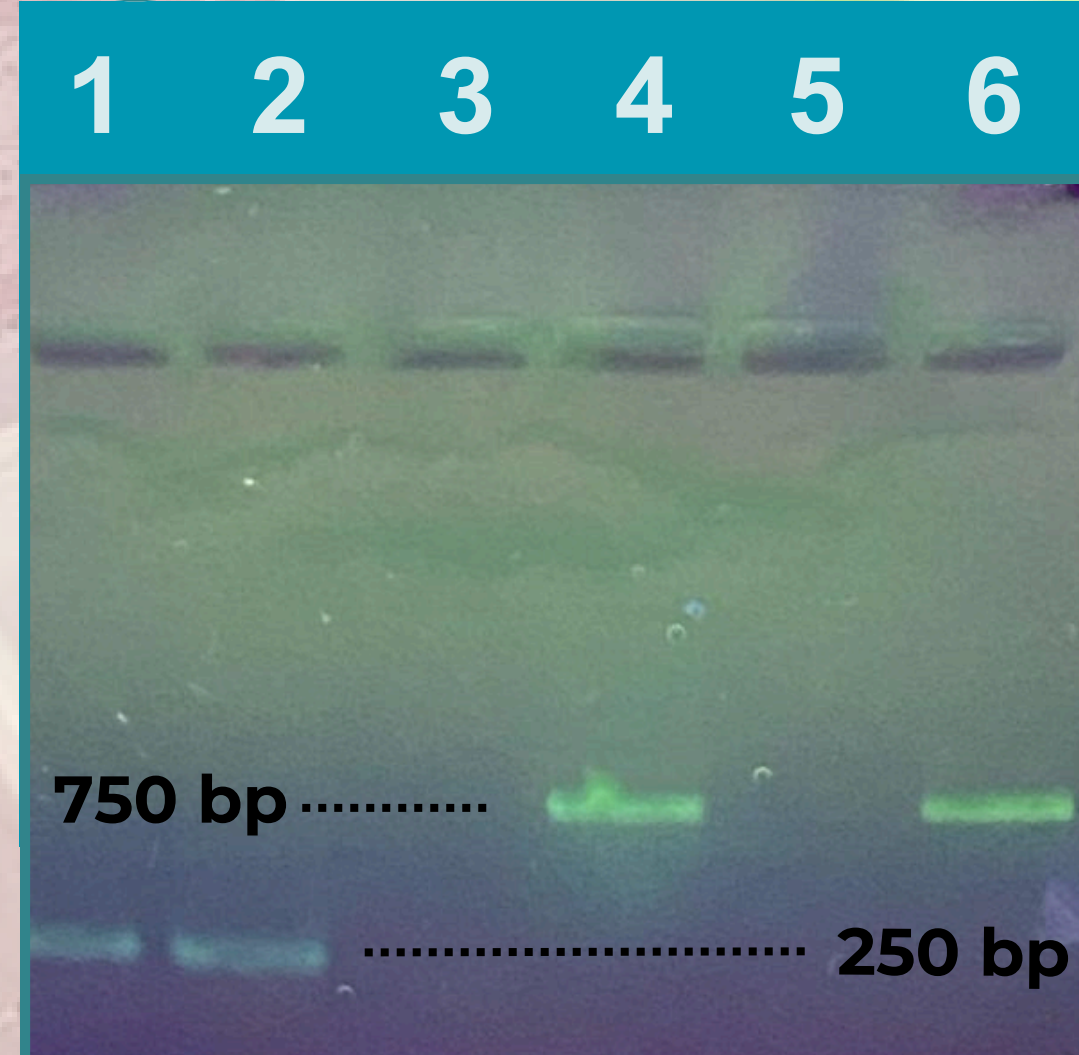


Fig. 6- Gel de Agarose

Na 1ª amostra ocorreu a **replicação do MCS** o que indica que a inserção do gene Frxa no plasmídeo pET-28a **não foi bem sucedida**; enquanto que na 2ª amostra, ocorreu a **replicação do gene Frxa**, ou seja, a inserção do gene no plasmídeo **foi bem sucedida** (Fig. 6).

DISCUSSÃO

A capacidade de poder amplificar uma proteína, a partir da introdução de um gene Frxa, de *H. pylori*, no MCS, para poder desenvolver estratégias terapêuticas relativas às doenças e infeções desta bactéria tem enorme potencial que só ultimamente tem sido mais usado.

O motivo principal do insucesso das terapias anti-*H. pylori*, baseadas em ácido metronidazol (MTZ), é a resistência bacteriana ao óxido nítrico presente no ácido do estômago. Logo, determinar a presença do Frxa no plasmídeo bacteriano é primordial porque, segundo estudos prévios, a ativação deste gene leva à diminuição da resistência da *H. pylori* (4) ao MTZ uma vez que o Frxa será capaz de codificar nitroreductases que convertem o MTZ, um pró-fármaco inofensivo, a bactericidas e mutagénicos que atenuam a patogenicidade da bactéria (2).

Deste modo, a deteção sensível do PCR é uma característica que sobressai na técnica, tanto na área da Biologia Molecular como na área da Saúde. Por exemplo, foi utilizada como teste de deteção do vírus SARS-coV-2 durante a pandemia da Covid-19.

Por outro lado, a deteção pode ser mais rápida, objetiva e ter menos riscos se a sua mais recente vertente, o Real-Time PCR, for utilizada.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Pereira TC et al. (2018). Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital.
- (2) Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Akada JK, Dailidienne D, Hoffman PS e Berg DE. (2001). Roles of Frxa and RdxA Nitroreductases of Helicobacter pylori in Susceptibility and Resistance to Metronidazole. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95392/>.
- (3) Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidienne D, Wang Y, Velapatiño B, Gilman RH, Parkinson AJ, Nair GB, Wong BCY, Lam SK, Mistry R, Segal I, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Brea ML, Ito Y, Kersulyte D, Lee HK, Gong Y, Goodwin A, Hoffman PS e Berg DE. (2000). Sequential Inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) Nitroreductase Genes Causes Moderate and High-Level Metronidazole Resistance in Helicobacter pylori; <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jb.182.18.5082-5090.2000>;
- (4) Kargar M, Baghernejad M e Doosti A. (2010). Role of NADPH-insensitive nitroreductase gene to metronidazole resistance of Helicobacter pylori strains. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3304369/>.
- (5) Justino MC, Parente MR, Boneca IG e Saraiva LM. (2014). FrxA is an S-nitrosoglutathione reductase enzyme that contributes to Helicobacter pylori pathogenicity. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.12958>.
- (6) Gomes AG, Justino MC. (2020). workshop- técnicas de genética molecular. estbarreiro