

NATHÁLIA MACIEL MANIEZZO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFECÇÃO POR
Helicobacter pylori NA EXPRESSÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE REPARO
AO DNA.

Bragança Paulista

2012

NATHÁLIA MACIEL MANIEZZO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFECÇÃO POR
Helicobacter pylori NA EXPRESSÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE REPARO
AO DNA.

ORIENTADOR: PROF.DR. MARCELO LIMA RIBEIRO

Dissertação apresentada ao curso
de Pós-Graduação *Strictu Sensu*
em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco para
a obtenção do título de Mestre.

Bragança Paulista

2012

QW 154 Maniezzo, Nathália Maciel.
M515a Avaliação dos efeitos da infecção por *Helicobacter pylori* na expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de reparo ao DNA / Nathália Maciel Maniezzo. -- Bragança Paulista, 2012.
49 p.
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.

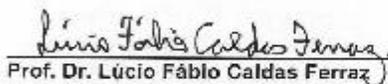
1. *Helicobacter pylori*. 2. Reparo do DNA.
3. Neoplasias gástricas. I. Ribeiro, Marcelo Lima.
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

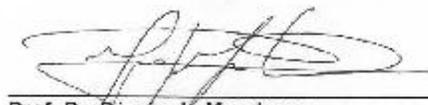
MANIÉZZO, Nathália Maciel. "Avaliação dos Efeitos da Infecção por *Helicobacter pylori* na expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de reparo ao DNA". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em quinze de fevereiro de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro- Orientador e Presidente
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Sérgio de Mendonça
Universidade Bandeirante de São Paulo - UNIBAN

Dedico este trabalho aos meus pais,
Stella e José. “Pai e mãe, ouro de mina...”
A vocês meu mais puro e eterno amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof.Dr. Marcelo Lima Ribeiro pela oportunidade oferecida ao me conceder um lugar em seu laboratório, onde pude realizar os experimentos que resultaram nesta dissertação.

Meus agradecimentos também aos professores Dr. Lucio Fabio Caldas Ferraz e Dra. Alessandra Gambero, por sempre estarem prontos a atender minhas dúvidas, assim como a Vilma Tescke que mesmo atribulada nunca deixou de me ajudar.

Todo meu reconhecimento, gratidão e carinho aos colegas do laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular da Universidade São Francisco. A todos que passaram e ainda estão presentes por lá, meu muito obrigado.

Agradeço também a todos os professores do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, bem como todos seus funcionários e colegas de sala que conheci durante estes dois anos.

Agradeço à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, e à Universidade São Francisco- Bragança Paulista onde realizei todo este trabalho.

Meu eterno agradecimento aos meus amores: Stella, José, Thales, Yvone, Leonardo, Nina e Benê, por dividirem as alegrias e principalmente nunca me abandonarem nos momentos mais difíceis durante esta jornada.

Finalmente agradeço a Deus e à Santa Rita de Cássia por não me deixarem desanimar diante das atribulações e me fazerem seguir adiante no caminho da fé.

*“Feliz do homem que encontrou a sabedoria,
daquele que adquiriu a inteligência,
porque mais vale esse lucro que o da prata,
e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro “*

Provérbios 3:13-14

RESUMO

O *Helicobacter pylori* coloniza o estômago humano há cerca de 60.000 anos e é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico. Os mecanismos oncogênicos desta bactéria são mediados pela inflamação crônica e ativa que aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, cujos papéis foram ligados ao processo de carcinogênese em alguns estudos. Porém, a influência da bactéria nos mecanismos de reparo ao DNA permanece não esclarecida. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da bactéria nos mecanismos de reparo ao DNA. 287 pacientes (150 adultos, 127 crianças e 10 pacientes com câncer gástrico) foram analisados quanto à presença da bactéria e seu fator de virulência *cagA* através da técnica de PCR das biópsias gástricas. A linhagem bacteriana SS1 foi cultivada e para co-cultura, a linhagem gástrica (PG100) foi cultivada com *H. pylori* (2×10^6 UFC) por 24 e 48 horas seguidas de análise por PCR em tempo Real Array (*Human DNA Damage Signaling RT² Profiler™ PCR Array*). Para validação dos genes em humanos (pacientes com câncer, crianças e adultos Hp+ e Hp-) utilizou-se a técnica de PCR em tempo real para avaliar a expressão dos seguintes genes: *FEN1*, *LIG1*, *PMS1*, *SMC1A*, *MPG*, *CHK1*, *CHK2*, *GADD45A*, *GADD45G*, *PPP15A*, *FANCG*, *SMC1A*, *ERCC1*, *GTF2H1*, *PCNA*, *RAD21*, *XRCC2*, *PI3K*, *RAD18* e *Ku86*. O resultado da genotipagem dos pacientes revelou que a prevalência da bactéria nos adultos foi de 82% e nas crianças de 23%. O resultado do PCR Array revelou que 32% dos genes foram modulados pelo *H. pylori*. Entre estes, 18% estavam relacionados com dano ao DNA, crescimento e diferenciação celular e apoptose e estavam hiperexpressos, enquanto 14% estavam envolvidos com reparo de DNA estavam menos expressos. Para a validação dos Arrays em humanos, observou-se uma repressão significativa do gene *XRCC2* em pacientes adultos Hp+ em relação aos adultos Hp-, o mesmo foi observado para o grupo de crianças. Foi verificada uma repressão do gene *GTF2H1* no grupo de adultos Hp+ em relação aos Hp-. Os genes *RAD18* e *Ku86* foram reprimidos em câncer independentemente da presença do *H. pylori*. Os Arrays das co-culturas apresentaram resultados que indicam o que já consta na literatura, que uma diminuição na expressão de genes envolvidos com reparo de DNA somados a um aumento da expressão de genes ligados ao crescimento celular, podem facilitar o processo de carcinogênese. Para a validação dos genes em humanos, pode-se observar que o *H. pylori* influencia a expressão dos mesmos de diferentes maneiras. Pode-se concluir através das análises deste trabalho que o *H. pylori* reduz a expressão de genes envolvidos no processo de reparo de quebra de fita dupla de DNA e reparo por excisão de nucleotídeos, independentemente dos fatores de virulência da bactéria. Conclui-se que em câncer gástrico há uma repressão global de genes relacionados ao reparo de DNA.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, reparo de DNA, câncer gástrico

ABSTRACT

Helicobacter pylori has been colonizing the human stomach for about 60,000 years and is a major risk factor for gastric cancer development. Its oncogenic role is mediated by the chronic active inflammation which increases the levels of reactive oxygen and nitrogen species, whose role have been reported to be linked with carcinogenesis. However, the influence of the bacteria in the DNA repair signaling pathways remains unclear. The aim of the present study was to evaluate the effects of bacterium on the DNA repair signaling pathways. 287 patients (150 adults, 127 children and 10 patients with gastric cancer) were analyzed for the presence of bacteria and the virulence factor *cagA*, by PCR of gastric biopsies. Bacterial strain SS1 was cultured and for co-culture, the gastric cell line (PG100) was cultured with *H. pylori* (2×10^6 CFU) for 24 and 48 hours followed by real-time PCR Array. (*Human DNA Damage Signaling RT² ProfilerTM PCR Array*). For validation of genes in humans (cancer patients, children and adults Hp + and Hp-) we used the technique of real-time PCR to evaluate the expression of these genes: *FEN1*, *LIG1*, *PMS1*, *SMC1A*, *MPG*, *CHK1*, *CHK2*, *GADD45A*, *GADD45G*, *PPP15A*, *FANCG*, *SMC1A*, *ERCC1*, *GTF2H1*, *PCNA*, *RAD21*, *XRCC2*, *PI3K*, *RAD18* e *Ku86*. The results of genotyping of patients revealed that the prevalence of bacteria in adults was 82% and 23% in children. The real-time PCR array data revealed 32% of genes showed to be modulated by *H. pylori*. Among these, 18% are related with DNA damage, growing and differentiation cell and apoptosis were up-regulated, while 14% involved with DNA repair were down regulated. For the validation of Arrays in humans there was a significant decrease in expression of *XRCC2* gene in Hp+ adult patients compared with Hp- adults, the same result was found in the children group. We could observe a decrease in the expression of *GTF2H1* gene in Hp+ adult patients compared with Hp- adults. The expression of *RAD18* and *Ku86* genes were decreased in cancer group, independently of the *H. pylori* presence. The arrays of co-cultures showed results that indicate what is already in the literature, that a decrease in expression of genes involved in DNA repair coupled with an increased expression of genes linked to cell growth, can facilitate the process of carcinogenesis. For the validation of genes in humans, it could be observed that *H. pylori* influences the expression of them in different ways. It can be concluded through the analysis of this study that *H. pylori* reduces the expression of genes involved in repair of double strand breaks and nucleotide excision repair, regardless of bacterial virulence factors. As conclusion too, the global expression of repair genes are reduced in gastric cancer.

key-words: *Helicobacter pylori*, DNA repair, gastric cancer

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

~ - Aproximadamente

°C - Graus Centígrados

µg - Microgramas

µg/mL – Microgramas por Mililitros

µL - Microlitros

ATM - Ataxia telangiectasia mutated

ATR - Ataxia-telangiectasia mutated and rad3-related

BER – (*Base Excision Repair*) Reparo por Excisão de Base

BHM Agar – *Belo Horizonte Medium Agar*

CagA – (*Citotoxin Antigen Associated*) Fator de virulência CagA da bactéria *H. pylori*

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CHK1 - *Checkpoint kinase 1*

CHK2 - *Checkpoint kinase 2*

CIB1 - *Calcium and integrin binding 1*

CO₂ – Dióxido de Carbono

Ct - *Threshold cycle*

dATP - Desoxiadenosina Trifosfato

dCTP – Desoxicitidina Trifosfato

DDI3T - DNA-damage-inducible transcript 3

dGTP – Desoxiguanosina Trifosfato

DMC1 - *Dosage suppressor of mck1 homolog*

DMEM - (Dulbecco's modified Eagle's medium) Meio modificado Dulbecco Eagle

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNA-PK - *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DSBR – (*Double Strand Break*) Quebra de Fita Dupla

dTTP – Desoxitimidina Trifosfato

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ERCC1 - *Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*

EXO1 - *Exonuclease 1*

FANCG - *Fanconi anemia, complementation group G*

FEN1 - *Flap structure-specific endonuclease 1*

g - grama

G1 – (*Gap 1*) Fase G1 do Ciclo Celular

G2 – (*Gap 2*) Fase G2 do Ciclo Celular

GADD45A - *Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*

GADD45G - *Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma*

GML - *Glycosylphosphatidylinositol anchored molecule like protein*

GTF2H1 - *General transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa*

h - horas

Hp- - Paciente *Helicobacter pylori* negativo

Hp+ - Paciente *Helicobacter pylori* positivo

Hp+ CagA- - Paciente *Helicobacter pylori* positivo CagA negativo

Hp+ CagA+ - Paciente *Helicobacter pylori* positivo CagA positivo

HpNAP - *Helicobacter Pylori Neutrophil Activated Protein*

HR - (*Homologous Recombination*) Recombinação Homóloga

iceA - (*Induced by contact with epithelium*) Fator de Virulência da bactéria *H. pylori*

IL-8 - Interleucina 8

Ku70 - 70 kDa subunit of Ku antigen

Ku86 - 86 kDa subunit of Ku antigen

LIG1 - DNA ligase 1

M - Molar

mg/ mL – Miligrama por mililitro

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Min - minuto

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MMR – (*Mismatch Repair*) Reparo por Mau Pareamento

MPG - *N-methylpurine-DNA glycosylase*

N₂ - Nitrogênio

NER - (*Nucleotide Excision Repair*) Reparo por Excisão de Nucleotídeo

NF-K β - (**Nuclear factor** –kappa beta) Fator Nuclear- kappa beta

NHEJ – (*Non- homologous end joining*) Recombinação Não- Homóloga

NTHL1 - *nth endonuclease III-like 1*

O₂ - Oxigênio

p - probabilidade

p53 - *Tumor suppressor*

PBS – (Phosphate buffered saline) Tampão Fosfato- Salino

PCBP4 - *Poly(rC) Binding Protein 4*

PCNA - *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR – (*Polymerase Chain Reaction*) Reação em Cadeia da Polimerase

PG100 – Linhagem Celular Gástrica

pH – Potencial Hidrogênio- Iônico

PI3K - *Phosphatidylinositol 3 kinase*

PMS1 - *Postmeiotic segregation increased 1*

PNKP - *Polynucleotide kinase 3'-phosphatase*

PPP1R15A - *Protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A*

qRT-PCR – (*Quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction*) PCR em tempo real

RAD18 - *E3 ubiquitin-protein ligase RAD18*

RAD21 - *Double-strand-break repair protein rad21 homolog*

RNA - Ácido Ribonucleico

ROS - (*Reactive Oxygen Species*) Espécies Reativas de Oxigênio

S- (*Synthesis phase*) Fase de Síntese (S) do Ciclo Celular

SMC1A - *Structural maintenance of chromosomes 1A*

SS1- Linhagem da bactéria *Helicobacter pylori*

SSBR - (*Single Strand Break*) Quebra de fita simples

SUS - Sistema Único de Saúde

Tris- HCl - *Tris(hydroxymethyl)aminomethane- hydrochloric acid*

U/mL - Unidade por Mililitro

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UNESP- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

UNIFAG- Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

USF – Universidade São Francisco

UV - Ultravioleta

VacA – (*Vacuolating cytotoxin A*) fator de virulência da bactéria *H. pylori*

XPA - *Xeroderma pigmentosum, complementation group A*

XRCC2 - *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2*

pmol – pico mol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes analisados na placa de <i>PCR Array</i>	19
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados para verificação da presença do <i>H.pylori</i> e seu fator de virulência <i>cagA</i>	21
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados para verificação da expressão dos genes de reparo ao DNA em humanos.....	22
Tabela 4 – Análise de expressão usando o <i>Human DNA Damage Signaling RT² Profiler™ PCR Array</i>	25
Tabela 5 – Genotipagem <i>H.pylori</i>	26
Tabela 6 – Resultados da expressão dos genes validados.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presença abundante da bactéria <i>H. pylori</i> no muco superficial das células do estômago.....	01
Figura 2. Patogênese da Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	05
Figura 3. Anatomia e histologia do adenocarcinoma gástrico do tipo difuso.	09
Figura 4. Anatomia e histologia do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal.....	10
Figura 5. Vias de reparo de DNA durante o ciclo celular.....	12
Figura 6. Reparo de DNA por recombinação não- homóloga (NHEJ).....	13
Figura 7. <i>Human DNA Damage Signaling RT² Profiler™ PCR Array</i>	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Linhagens celulares e cultura	16
3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	17
3.3. <i>DNA Damage Signaling Pathway PCR Array</i>	17
3.4. Validação dos dados – Casuística	19
3.5. Validação dos dados – Extração de DNA e PCR	20
3.6. Validação dos dados – Análise de expressão.....	21
3.7. Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. <i>DNA Damage Signaling Pathway PCR Array</i>	24
4.2. Genotipagem Bacteriana.....	26
4.3. qRT-PCR (<i>Quantitative Real Time - PCR</i>).....	26
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
8. ANEXOS.....	44

Anexo I.....	44
Anexo II.....	45
Anexo III.....	46
Anexo IV.....	47
Anexo V.....	49

1. INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* (Figura 1) é um bacilo gram-negativo que coloniza o estômago humano há pelo menos 60.000 anos (Atherton e Blaser, 2009); é uma bactéria microaerofílica que habita várias áreas do estômago e do duodeno (Pandey et al., 2010). Este microrganismo é considerado a principal causa de úlcera péptica, linfoma gástrico e adenocarcinoma gástrico (Isomoto et al., 2010).

Os australianos Barry Marshal e Robin Warren foram os descobridores desta bactéria e receberam o prêmio Nobel de Medicina em 2005 por este feito. Eles encontraram o *H. pylori* no estômago de 75% de pacientes com úlceras gástricas, e observaram também que a inflamação gástrica estava quase sempre presente na mucosa próxima onde a bactéria era encontrada (Kamangar et al., 2011).

Este microrganismo apresenta mobilidade devido à presença de flagelos que podem estar presentes na quantidade de quatro a seis, são unipolares embainhados e possuem bulbos terminais nas extremidades lisas. A bactéria desenvolveu uma maneira de sobreviver no ambiente ácido do estômago, através da secreção de urease, uma enzima que converte uréia em amônia, que reduz a acidez do estômago, facilitando desta forma a colonização deste órgão pela bactéria (Marshall, 1983).

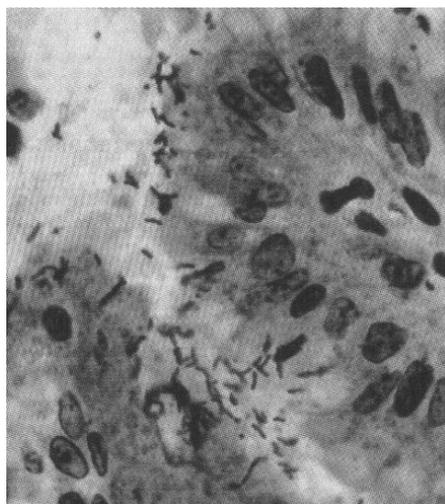


Figura 1. Presença abundante da bactéria *H. pylori* no muco superficial das células do estômago (adaptado de Robbins e Cotran, 2010).

Apesar de muitas discordâncias sobre o assunto, as vias de infecção do *H. pylori* mais aceitas atualmente incluem a fecal-oral e a oral-oral. Não há possibilidade de transmissão através do ato sexual comum, e a infecção por insetos vetores é praticamente nula (Deltenre e Koster, 2000).

A prevalência da infecção por *H. pylori* varia no mundo todo, dependendo do status sócio- econômico e das condições sanitárias de cada país (Ahamed et al., 2007). Em países desenvolvidos a prevalência é menor que 40%, já em países em desenvolvimento estes valores ultrapassam os 80% (Kusters et al., 2006). Nos Estados Unidos e Europa a taxa de infecção oscila entre 10-40%, enquanto em países como Tailândia e Índia a prevalência varia de 80 a 100% (Heatey, 1995; Mitchell, 1999). No Brasil, existem poucos estudos quanto à prevalência do *H. pylori*, mas alguns já demonstram as diferenças nas taxas de prevalência de acordo com o estatus sócio-econômico de cada população. Em São Paulo, foi verificada uma taxa de 65,6% de colonização dentro de uma população com um melhor padrão de vida (Zaterka et al., 2007), e em Fortaleza estes índices ultrapassam os 87% entre as populações mais pobres (Rodrigues et al., 2005).

A infecção por *H. pylori* é a mais comum infecção bacteriana entre os homens (Atherton e Blaser, 2009). Tendo em vista esta constatação, diversos estudos genômicos comprovaram a alta diversidade genética desta bactéria (Dorer et al., 2010). Apesar de a infecção ocorrer mais comumente por uma cepa, infecções mistas com diferentes cepas da bactéria e casos de recombinação genética entre as mesmas já foram observadas em diversos estudos (Israel et al., 2001; Talarico et al., 2009).

Uma vasta diversidade genética é encontrada nesta bactéria, sendo esta causada por rearranjos de DNA, eventos de recombinação e mutações endógenas (Enroth et al., 2000; Salama et al., 2000). Estudos comprovaram que esta diversidade é importante para a evasão da bactéria ao sistema imune do hospedeiro, como também na sua capacidade de persistente colonização (Bornschein et al., 2010).

Os novos genótipos bacterianos gerados afetam não somente sua capacidade de colonização e de causar a doença, bem como a inflamação e a liberação de ácido gástrico (Isomoto et al., 2010).

O *H. pylori* é geneticamente diverso, e esta diversidade se traduz em variabilidade na virulência (Kamangar et al., 2011). Estudos sobre fatores de virulência se estenderam por quase três décadas e revelaram uma relação entre a bactéria, a superfície da mucosa gástrica e a patogênese da doença, principalmente para os fatores CagA e VacA (Miehlke et al., 2001; Cover e Blanke, 2005; Kusters et al., 2006; Hatakeyama, 2008; Sewad et al., 2008; Wen e Moss, 2009).

Um dos fatores de virulência mais estudados é o CagA, os isolados clínicos podem ser CagA positivos ou CagA negativos (Yamaoka, 2010). As cepas CagA positivas são associadas a um aumento da inflamação e do risco de câncer gástrico (Peek e Crabtree, 2006; Ernst et al., 2006). CagA é normalmente definida como uma proteína efetora: uma proteína da bactéria que é injetada nas células do hospedeiro por uma maquinaria especializada do *H. pylori* que modula uma série de funções celulares (Ricci et al., 2011), como estimular a sinalização de fatores de crescimento, levando a mudanças morfológicas na célula e aumentando a proliferação celular (Mimuro et al., 2002). CagA é um marcador da presença de uma ilha de patogenicidade (*PAI-Pathogenicity Island*) e contribui para a resposta inflamatória, já que causa um aumento na produção de IL-8 (Isomoto et al., 2010) e ativação do NF- κ B o que pode conferir um fenótipo proliferativo à bactéria, sendo importante no processo de carcinogênese (Argent et al., 2008). As cepas *cagA*⁺ tendem a ser mais virulentas e a induzir níveis aumentados de algumas citocinas, como a IL-1 β e a IL-8, com conseqüente aumento do risco de desenvolvimento câncer gástrico (Bartchewsky et al., 2009). Desta forma CagA desregula as vias de sinalização celular e confere as células potencial oncogênico, o que é relevante durante o processo de patogênese do *H. pylori* (Ding et al., 2010).

O segundo fator de virulência mais estudado é o VacA (Yamaoka, 2010). O gene *vacA* codifica uma proteína secretora (VacA) que tem a habilidade de induzir a vacuolização das células (Polk e Peek Jr, 2010), aumentar a permeabilidade a ânions e

uréia (Tombola et al., 2001), estimular a apoptose em células gástricas epiteliais (Cover et al., 2003) e induzir uma resposta pró-inflamatória (Sundrud et al., 2004). O gene *vacA* está virtualmente expresso em todas as cepas de *H. pylori*, porém existem polimorfismos: tipo S1 ou S2 e tipo M1 ou M2. O tipo S1/M1 *VacA* causa mais dano epitelial celular que o tipo S1/M2, enquanto o tipo S2/M2 e o raro S2/M1, não são tóxicos devido à presença de um resíduo hidrofílico na forma S2 (Letley et al., 2003). Portanto, o fator *VacA* pode induzir múltiplas atividades celulares que facilitam a colonização crônica da mucosa gástrica pelo *H. pylori* (Isomoto et al., 2010).

Existe também o gene de virulência é o *iceA* (induzido através do contato com o epitélio), este gene possui duas formas alélicas principais *iceA1* e *iceA2*, porém a função destas variantes ainda não está clara. O *iceA1* é hiperexpresso quando o *H. pylori* está em contato com o epitélio gástrico e é considerado um marcador de úlcera péptica (Mansour et al., 2010). O gene *iceA2* apresenta aproximadamente 40% de homologia com os nucleotídeos do *iceA1*, mas sua estrutura gênica é totalmente diferente (Peek et al., 1998; VAN Doorn et al., 1998).

Outro fator de virulência expresso pelo *H. pylori*, é o HpNap (*H. pylori neutrophil activating protein*). Esta proteína é codificada pelo gene *napA*, que é encontrado em todos os isolados de *H. pylori* (Leakey et al., 2000). HpNap é correlacionado à indução de adesão de neutrófilos às células endoteliais, à indução de migração e ativação de neutrófilos e monócitos humanos, como também ser um importante estimulador de mastócitos (Choli-Papadapoulo et al., 2011).

Os fatores de virulência em conjunto com fatores genéticos do portador e fatores ambientais, constituem uma complexa rede que regula a patogênese da gastrite crônica e inflamação (Figura 2), os quais estão envolvidos em um processo que leva à carcinogênese gástrica (Isomoto et al., 2010).

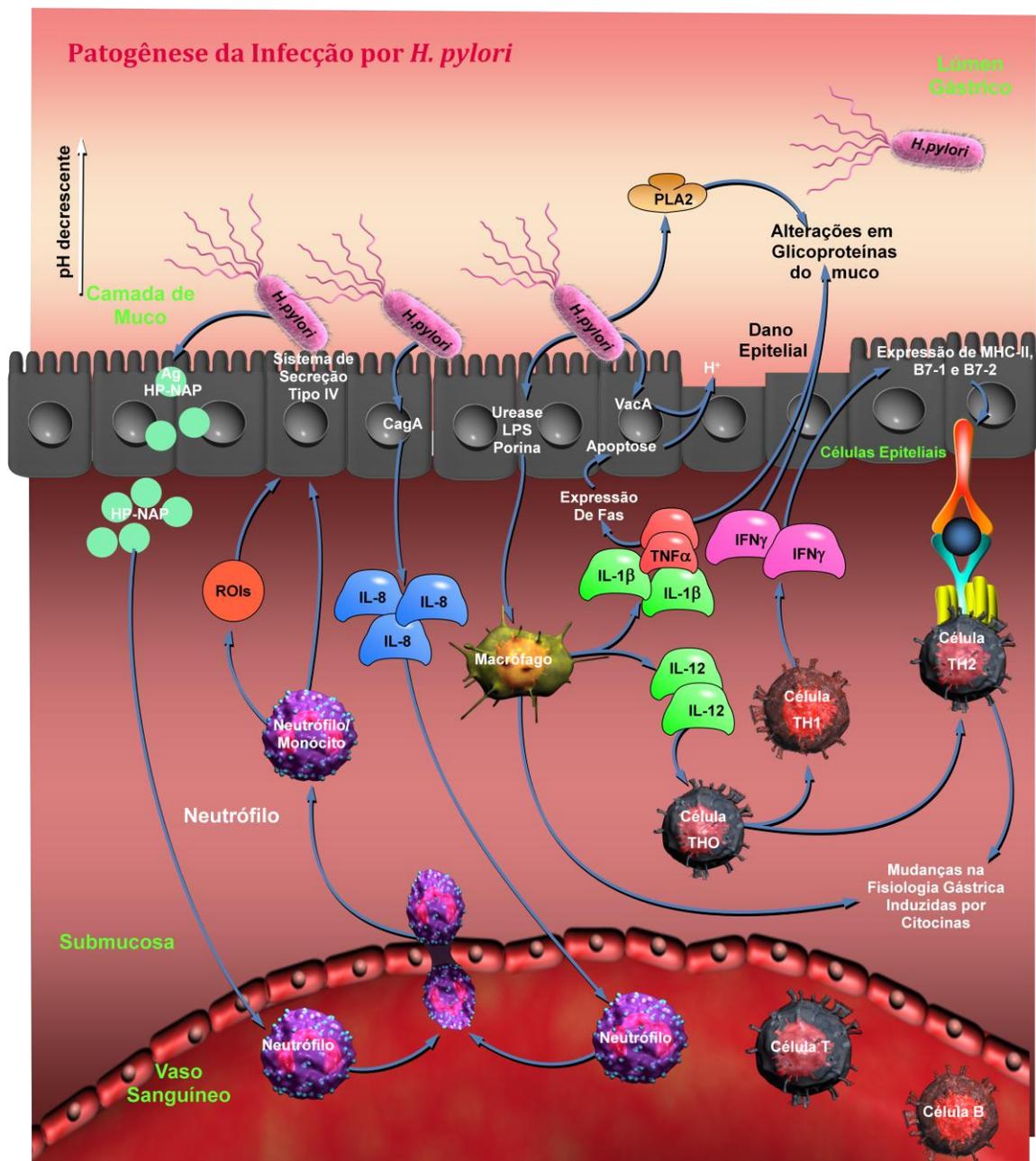


Figura 2. Patogênese da Infecção por *Helicobacter pylori*. Auxiliado por seus flagelos o *H. pylori* coloniza a camada de muco sobre as células gástricas epiteliais. A bactéria produz urease, o que permite sua sobrevivência no ácido ambiente gástrico. Pode-se observar a presença de fatores de virulência expressos pela bactéria, dentre eles: HpNap (aumenta o infiltrado de neutrófilos), CagA (induz a produção de interleucinas) e VacA (causa vacuolização das células e dano epitelial). Há a liberação de citocinas e o recrutamento de células do sistema imune, gerando desta forma, uma resposta inflamatória que pode ser intensa e persistente e causar danos ao tecido gástrico (adaptado de QIAGEN, Valencia, CA, USA).

Já está bem estabelecido que a infecção por *H. pylori* acontece normalmente na primeira infância e após este período, se não houver o tratamento adequado com antibióticos, a infecção pode perdurar por toda a vida do indivíduo (Suerbaum e Josenhans, 2007; Morelli et al., 2010). Apesar do *H. pylori* estimular respostas imunes inata e adquirida, o portador é incapaz de eliminar a bactéria da mucosa gástrica, e a infecção crônica é o resultado mais comum deste processo (Zarrilli et al, 1999).

Esta capacidade de colonização por longos anos se deve, entre outros fatores, à capacidade deste microrganismo de evadir o sistema imune do hospedeiro. Entre 80-90% das bactérias ficam na camada de muco, enquanto de 10-20% ficam em contato direto com a superfície das células epiteliais, como consequência, uma resposta inflamatória persistente é montada na lâmina própria adjacente, o que previne o contato direto entre a bactéria e o lúmen, como também de células inflamatórias com o estroma. Desta forma, as células brancas do sangue, que normalmente reconheceriam e atacariam a bactéria, se tornam incapazes de atravessar os vasos sanguíneos que vão até a mucosa do estômago. Estas células continuam a responder ao sítio de infecção, onde morrem liberando nutrientes que servem de substrato ao *H. pylori* (Pandey et al., 2010). A permanência da bactéria no estômago estimula a ativação de uma cascata de citocinas que são responsáveis pelo desenvolvimento do processo inflamatório, por apresentarem atividades quimiotáticas para neutrófilos e células mononucleares (Vinagre et al., 2011).

A infecção pelo *H. pylori* resulta em uma resposta predominantemente Th1 e a inflamação gástrica depende das repostas das células Th1 que aumentam a produção de IL-1 β , TNF- α e IL-8 (Lindholm et al., 1998; Galgani et al., 2004). Recentemente foi relatado também o recrutamento de células T regulatórias antígeno-específicas, que facilitam a permanente colonização do estômago através do contato direto célula a célula, ou por secreção de citocinas (TGF- β 1 e IL-10) que modulam a resposta imune (Bornschein et al., 2010).

Já está bem estabelecido que o câncer é uma doença multifatorial (Pharoah et al., 2004), onde o estresse oxidativo gerado pela inflamação, a ativação de proteínas

oncogênicas, mecanismos epigenéticos, o meio ambiente e a suscetibilidade do indivíduo, podem juntos promover a carcinogênese. No caso do câncer de estômago, a infecção por *H. pylori* e a inflamação crônica causada por esta bactéria facilitam a tumorigênese através da ativação de diversas vias e mecanismos oncogênicos (Ding et al., 2010).

O *H. pylori* produz diferentes substâncias capazes de promover dano ao DNA: citocinas e derivados metabólicos como compostos nitrosos, além da amônia derivada da atividade da urease que além de fazer com que a bactéria resista à acidez gástrica, pode originar derivados mutagênicos como o HNO_2 por oxidação (Touati, 2010).

Somados aos efeitos de estresse inflamatório, influências sobre o ciclo celular e polaridade da célula, o *H. pylori* também ativa múltiplos mecanismos oncogênicos, como a via PI3K/AKT/GSK3 β , que regula várias funções como crescimento celular, proliferação, diferenciação e motilidade, e sua ativação aberrante está associada a diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de estômago (Tabassam et al., 2009; Nagy et al., 2009). A presença da bactéria influencia também a via da proteína STAT3 que regula crescimento celular, apoptose e diferenciação, sendo uma alta expressão da mesma associada ao mau prognóstico e estágios avançados de câncer gástrico (Kim et al., 2009). Há associações relatando o aumento da expressão de COX-2 e PGE₂ no câncer gástrico, sendo o *H. pylori* o estimulador de tal processo (Chang et al., 2004), que poderia levar ao aumento de danos oxidativos ao DNA, resultando na elevação das taxas de mutação na mucosa gástrica hiperproliferativa (Fu et al., 1999)

O *H. pylori* tem influência direta sobre mecanismos epigenéticos, como por exemplo, metilação de genes e modificação de histonas. A infecção por esta bactéria induz a metilação anormal de genes promotores da mucosa gástrica, incluindo genes relacionados ao crescimento celular, reparo de DNA e aderência celular, e que são conhecidamente metilados em câncer gástrico (Maekita et al., 2006; Nardone et al., 2007). As histonas são a unidade básica do nucleossomo e são compostas de duas cópias de cada tipo: H2A, H2B, H3 e H4, sendo que as duas últimas possuem longas caudas que saem do nucleossomo e que podem ser modificadas covalentemente,

permitindo que proteínas regulatórias acessem o DNA e regulem a transcrição. Modificações em caudas de histonas podem ser causadas por metilação, acetilação, fosforilação entre outros, e agem em diversos processos celulares, como regulação gênica, reparo de DNA e crescimento celular, algumas modificações de histonas já foram relacionadas a presença do *H. pylori* (Zhang e Reinberg, 2001; Kurdistani, 2007; Ding et al., 2010).

A erradicação do *H. pylori* requer tratamento com múltiplos antibióticos que são administrados de 7 a 14 dias (Chey e Wong, 2007). A erradicação da bactéria reduz significativamente o risco de desenvolvimento de câncer de estômago em indivíduos infectados pelo *H. pylori* sem a presença de lesões pré-malignas (Wong et al., 2004), desta forma reforçando a idéia de que este microrganismo influencia estágios iniciais da carcinogênese gástrica (Polk e Peek Jr, 2010). Em 2009, FUCCIO et al. demonstraram uma redução de 35% de risco de câncer de estômago em pacientes que foram tratados para a erradicação do *H. pylori*, confirmando desta forma os diversos estudos que indicam este microrganismo como o mais importante fator de risco para o câncer de estômago.

Apesar da queda da incidência do câncer gástrico em alguns pacientes tratados para a erradicação do *H. pylori*, nem todos os pacientes infectados apresentam risco elevado de desenvolver o câncer gástrico. Em países como Japão e Colômbia a prevalência de infecção está associada ao risco aumentado de câncer de estômago, enquanto em outras populações com alta taxa de infecção pelo *H. pylori*, as taxas de incidência de câncer de estômago são baixas (Pandey et al., 2010). Este fenômeno é conhecido como o “Enigma Africano” (Holcombe, 1992), que permanece não resolvido, mas que pode ser parcialmente explicado por fatores relacionados ao hospedeiro, como polimorfismos que tornam o indivíduo mais suscetível à infecção por *H. pylori*, a duração da infecção e fatores ambientais como, por exemplo, a presença de diferentes cepas da bactéria que expressam diversos fatores de virulência em regiões específicas do mundo (Yamaoka, 2010).

O câncer gástrico é uma causa considerável de morbidade e mortalidade (Meza-Junco et al., 2011), ocupando a segunda colocação em causa de morte por câncer no mundo (Katsios et al., 2011) e a quarta colocação em incidência (Borges da Costa et al., 2011).

Apesar de relatado o declínio da incidência deste tipo de câncer em alguns estudos (Ferlay et al., 2010), estima-se que cerca de 780.000 pessoas morram por ano em decorrência deste carcinoma (IARC/WHO, 2009). No Brasil, a estimativa do INCA (Instituto Nacional do Câncer) para a incidência de câncer de estômago para o ano de 2010 foi de 7.680 casos entre as mulheres e 13.820 entre os homens. Com aproximadamente 900.000 novos casos diagnosticados por ano no mundo, o câncer gástrico se apresenta como umas das mais desafiadoras doenças malignas (Bornschein et al., 2010).

Existem dois tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico, o adenocarcinoma do tipo difuso e o adenocarcinoma do tipo intestinal. O adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (Figura 3) atinge normalmente pessoas mais jovens e consiste de um infiltrado de células neoplásicas onde não há formação de estrutura glandular (Polk e Peek Jr, 2010).

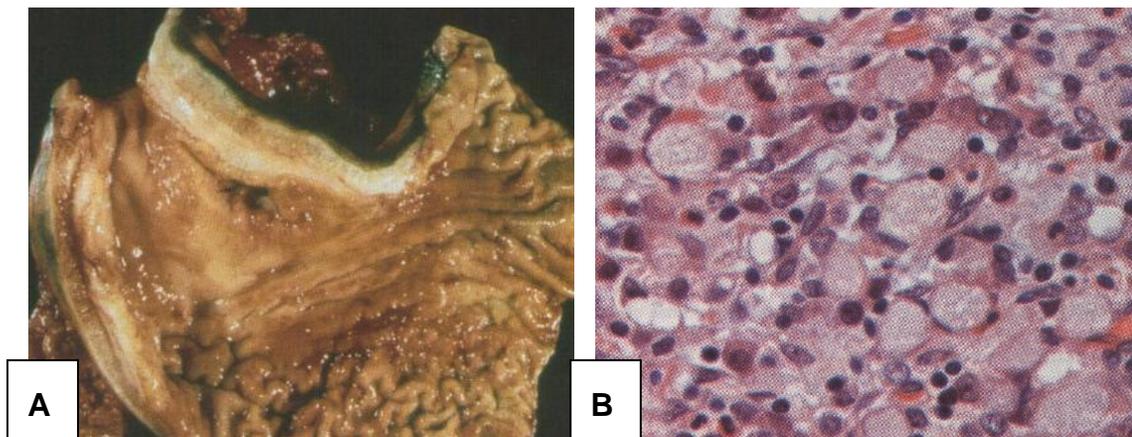


Figura 3. Anatomia e histologia do adenocarcinoma gástrico do tipo difuso. **A.** parede gástrica marcadamente espessada e com as pregas da mucosa parcialmente perdidas. **B.** Células em forma de “anel de sinete” com grandes vacúolos citoplasmáticos de mucina e núcleos deslocados periféricamente (adaptado de Robbins e Cotran, 2010).

A forma mais prevalente do adenocarcinoma gástrico é o adenocarcinoma do tipo intestinal (Figura 4), onde há a transição da mucosa normal para gastrite crônica superficial, que evolui para gastrite atrófica e metaplasia intestinal, e finalmente para displasia e adenocarcinoma (Correa, 1992; Polk e Peek Jr, 2010).

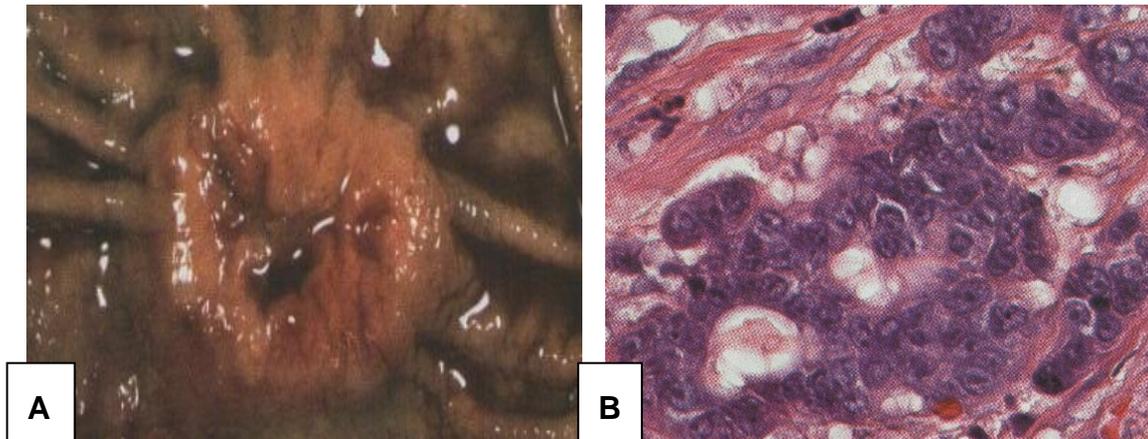


Figura 4. Anatomia e histologia do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. **A.** Tumor em forma de massa elevada com bordas elevadas e ulceração central. **B.** Células colunares em formando glândulas que se infiltram no estroma desmoplásico (adaptado de Robbins e Cotran, 2010).

Cerca de 80% dos pacientes são diagnosticados na fase avançada da doença, e a maioria destes pacientes relata poucos sintomas alarmantes, dentre eles, perda de peso, falta de apetite, anemia, dor epigástrica, náusea, vômito, e 40% dos pacientes não apresentam quaisquer sintomas (Schmidt et al., 2005; Bornschein et al., 2010). Devido ao pequeno número de pacientes diagnosticados em estágios iniciais da doença, a taxa de sobrevivência permanece baixa (Bornschein et al., 2010).

Apesar das divergências entre Ocidente e alguns países do Leste Asiático quanto ao regime de tratamento do câncer de estômago (Katsios et al., 2011), fluoropirimidinas, platinas, taxanos e o irrinotecan são considerados os primeiros agentes citotóxicos para casos de câncer gástrico avançados (Meza-Junco et al., 2011). Esta quimioterapia paliativa apresenta vantagens em alguns pacientes (Marx et al., 2009; Meza-Junco et

al., 2011), mas apesar de seus benefícios, a sobrevivência dos mesmos oscila em torno de 7 a 10 meses (Meza-Junco et al., 2011).

Diversas pesquisas indicaram alguns possíveis fatores de risco associados ao câncer de estômago, dentre eles: idade, sexo, etnia, estatus sócio-econômico, fumo, alta ingestão de sal, nitritos, nitratos e álcool (Kelley e Duggan, 2003), porém a bactéria *Helicobacter pylori* é considerada o principal fator de risco para o câncer de estômago (Choli-Papadopoulou et al., 2011).

A gastrite crônica é um dos sinais que caracterizam uma infecção por *H. pylori*, (Touati, 2010) e esta inflamação persistente estimula a proliferação celular, induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, o que pode levar a alterações protéicas, dano à membrana, oxidação de base de DNA, quebra de fitas de DNA e aberrações cromossômicas, muitos destes envolvidos no processo de carcinogênese (Jang et al., 2003). Espécies reativas de nitrogênio podem causar diretamente dano ao DNA, e podem inibir o reparo de DNA, por espécies reativas de oxigênio simultaneamente (Phoa e Epe, 2002).

Danos extensos e persistentes ao DNA representam uma ameaça à estabilidade do genoma. Uma vez detectado o dano ao DNA, é ativada uma complexa rede que pára o ciclo celular, inicia o reparo, e em alguns casos, induz a apoptose celular (Bolderson et al., 2009).

De acordo com MICHIELS et al., (2009) existem 4 sistemas principais de reparo ao DNA: reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por mau pareamento (MMR) e reparo de quebra de fita dupla (DSBR). O BER é necessário para remover bases oxidadas ou quimicamente modificadas. O NER normalmente repara os danos de DNA gerados pela exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. MMR é o mecanismo de reparo necessário para a correção de erros que acontecem durante a replicação normal de DNA pela DNA polimerase, como também no reparo por mau pareamento de nucleotídeos na fita oposta à lesão de DNA. O DSBR é necessário para todo organismo vivo, pois uma única quebra de fita dupla não reparada pode ser letal para uma célula, portanto este mecanismo de reparo age

em diversas etapas do ciclo celular. O reparo de quebra de fita dupla acontece por dois mecanismos: recombinação homóloga (HR) e recombinação não- homóloga (NHEJ) (Figura 5).

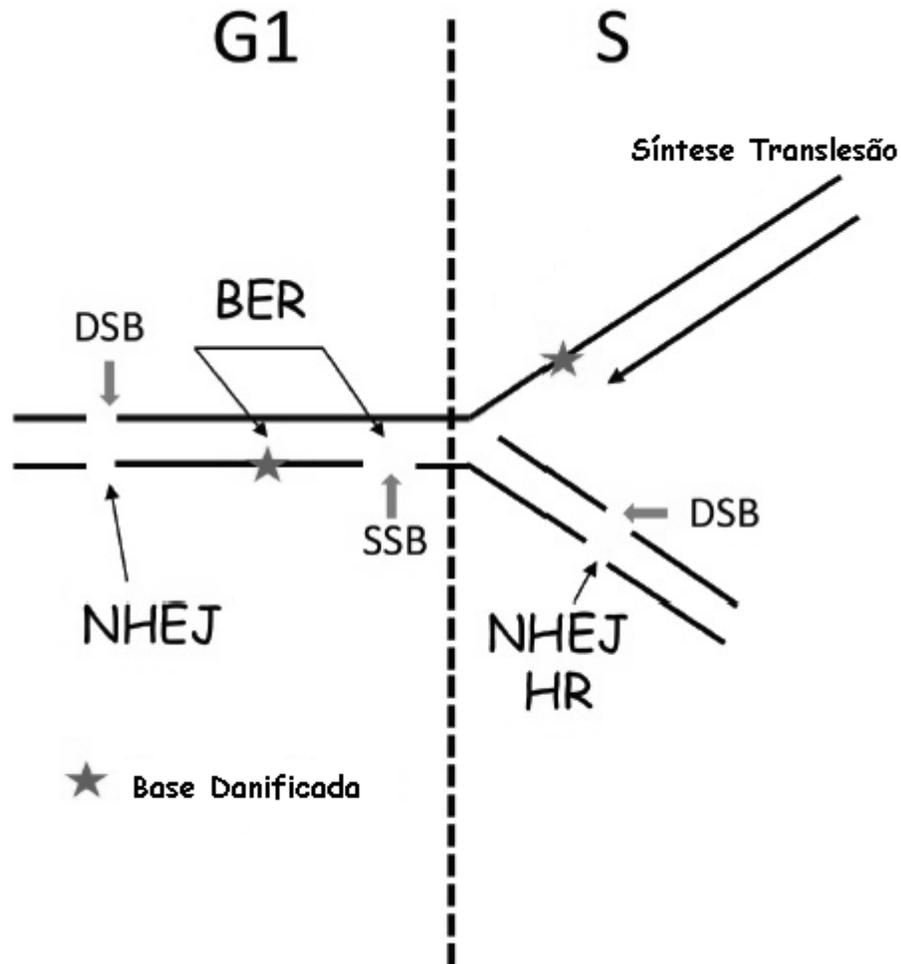


Figura 5. Vias de reparo de DNA durante o ciclo celular. Na fase G1, BER (reparo por excisão de base) e NHEJ (reparo por recombinação não- homóloga) são os principais mecanismos de reparo responsáveis pela remoção de bases danificadas e de quebra de fita simples e fita dupla de DNA (SSBs e DSBs). Durante a fase S, lesões não reparadas em bases de DNA e quebras na fita de DNA são verificadas por DNA polimerases ou reparadas por recombinação homóloga (HR), respectivamente (adaptado de Dianov, 2011).

O ponto crucial da NHEJ é a ligação das proteínas Ku70/Ku86 às pontas livres de DNA, seguido pelo recrutamento da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA- PKcs), que em uma cascata de fosforilação regula proteínas que operam o processo de ligação das fitas duplas quebradas (Figura 6) (Hefferin e Tomkinson, 2005; Bescow et al., 2009).

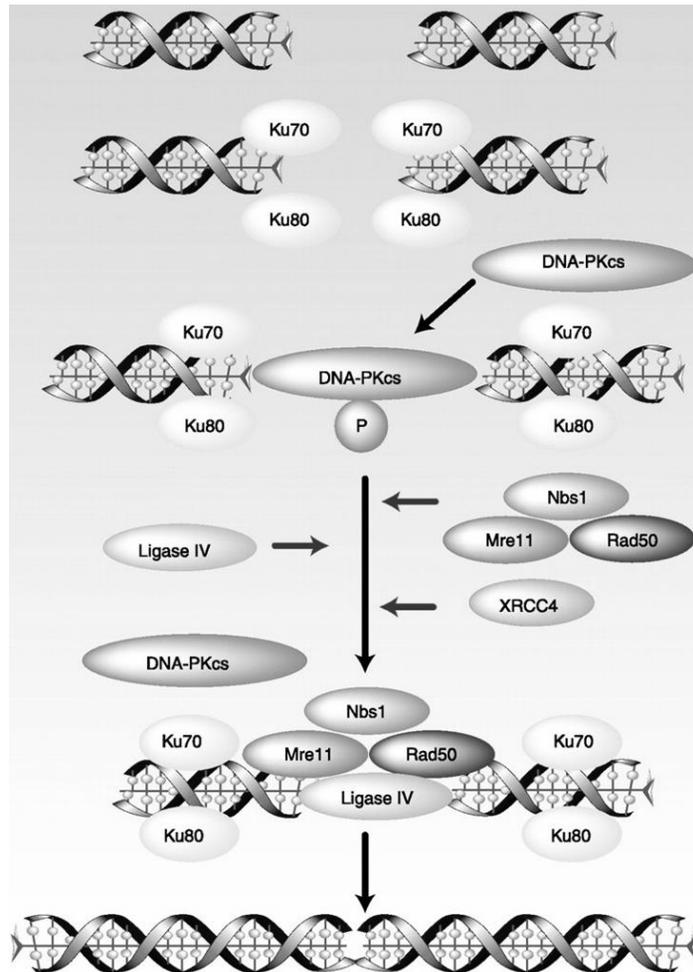


Figura 6. Reparo de DNA por recombinação não- homóloga (NHEJ). Com a quebra de uma fita dupla, as subunidades catalíticas da DNA-PK, KU70 e KU86, se ligam às extremidades das fitas, deslizando sobre as mesmas e recrutando a DNA-PK que previne o processamento precoce das pontas de DNA. A DNA-PK é fosforilada e se dissocia do DNA permitindo o recrutamento de diversas enzimas que reúnem as fitas de DNA novamente, reparando desta forma o dano ao DNA (adaptado de Chen e Nirodi, 2007).

As quebras de fita dupla (DSBs) são percebidas por sensores que ativam quinases como ATR e ATM, que fosforilam e ativam outras quinases, como a “checkpoint” quinase 2 (Chk2), que pára o ciclo celular em diversos estágios e pode apresentar um efeito ativador da apoptose (Castedo et al., 2004).

A gastrite causada pelo *H. pylori* causa um estresse oxidativo severo na mucosa gástrica (Naito e Yoshikawa, 2002). O infiltrado de neutrófilos produz uma quantidade abundante de radicais superóxidos e radicais hidroxil. O estresse oxidativo é a maior causa de dano ao DNA, incluindo modificações de base e quebra de fita simples e fita dupla de DNA. Entre bases com danos, a 8-hidroxi guanina é um aduto particularmente abundante no dano ao DNA causado por estresse oxidativo (Karanjawala et al., 2002).

Somados aos efeitos patológicos da resposta imune provocada pelo *H. pylori* na mucosa gástrica, muitas evidências indicam que esta bactéria pode promover a carcinogênese gástrica interferindo na integridade e estabilidade genômica de seu portador (Machado et al., 2010).

Poucos dados apontam qual a real interferência deste microrganismo nos mecanismos de reparo ao DNA. De acordo com KIM et al., 2002, a infecção por *H. pylori* de células gástricas em cultura, reduz a ação do sistema de reparo por mau pareamento (MMR) e reparo por excisão de base (BER) e impede a ação eficiente do reparo como comprovado pela técnica *MMR activity assay*. Um recente estudo publicado por TOLLER et al., 2011, indica que a infecção por *H. pylori* leva a quebras de fita dupla no DNA e uma resposta aos danos nas células do hospedeiro. Partindo deste princípio, seria de extrema importância para uma melhor compreensão do processo da carcinogênese gástrica, avaliar qual a influência do *H. pylori* sobre as vias de sinalização de reparo de dano ao DNA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a influência da infecção por *Helicobacter pylori* nas vias de sinalização de mecanismos de reparo ao DNA *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos *in vitro* da infecção por *H. pylori* e de seus fatores de virulência na expressão de genes envolvidos na sinalização do reparo ao DNA após co-cultura;
- Validar os dados obtidos em 287 pacientes (150 adultos sem câncer, 127 crianças sem câncer e 10 adultos com câncer gástrico) infectados ou não pela bactéria;
- Relacionar os dados obtidos em relação à sinalização do reparo ao DNA com o fator de virulência CagA da bactéria.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens Celulares e Cultura

Para a realização dos ensaios celulares foi utilizada a linhagem gástrica tumoral PG100 (Cell Bank, Rio Janeiro-RJ). As células foram cultivadas no meio DMEM adicionado de soro fetal bovino a 10% e 10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA), e posteriormente incubadas 48 h a 37°C (5% CO₂). A coleta das células foi realizada por tripsinização, para a qual foi preparada uma solução de tripsina [tripsina 0,125 g (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA), EDTA 0,02 g e PBS pH 7,5 100 mL. 2,5 mL] que foi acrescentada no meio de cultura e incubados a 37°C durante 2 a 5 min. Posteriormente foram acrescentados 2,5 mL de soro fetal bovino para neutralizar a ação da tripsina. A garrafa foi lavada com PBS e as células foram transferidas para um tubo o qual foi centrifugado a 1800rpm durante 10 min a 22°C. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS.

A linhagem bacteriana SS1 (Sidney Strain 1, que causa persistente infecção e gastrite crônica e a única capaz de colonizar roedores) foi cultivada em placas de Petri com meio seletivo BHM Agar (Queiroz et al., 1987), contendo 10% de sangue de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ em condições microaerofílicas (5-6% O₂, 8-10% CO₂, 80-85% N₂), com 95% de umidade relativa. Para a co- cultura, a linhagem celular normal foi cultivada com solução padronizada de *H. pylori* (2X10⁶ UFC) por 24 e 48 horas em estufa a 37°C e nas mesmas condições citadas acima. A viabilidade celular foi testada ao término das co-culturas através do método de exclusão de azul de tripan, sendo consideradas aptas para futuros experimentos, co-culturas com viabilidade celular superior a 95%.

3.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras oriundas da co-cultura foram destinadas à extração de RNA. Para a estabilização e proteção do RNA, as amostras foram armazenadas em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA. Esta foi feita usando-se o *RNeasy® tissue kit* (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, as concentrações dos RNAs foram calculadas pelo equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) e $\sim 100\ \mu\text{g}$ de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.3. DNA Damage Signaling Pathway PCR Array

Para a avaliação da influência da infecção por *H. pylori* nas vias de reparo ao DNA as amostras de cDNA provenientes da co-cultura foram analisadas usando o *Human DNA Damage Signaling RT² Profiler™ PCR Array* (QIAGEN), seguindo a recomendação do fabricante (Figura 7). O *DNA Damage Signaling Pathway PCR Array* (Tabela 1) consiste na obtenção do perfil de expressão, por PCR em tempo real, de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de reparo ao DNA. Os genes estudados estão associados à via ATR/ATM e alvos transcricionais que respondem a danos ao DNA. Os *arrays* foram realizados em amostras submetidos à co-cultura por 24 e 48 horas, sendo normalizados com amostras oriundas da cultura da linhagem PG100 sem a presença da bactéria por 24 ou 48 horas.

A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento 7300 Real- Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o Ct (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os dados foram avaliados com o auxílio do software disponível em <http://pcrdata-analysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>

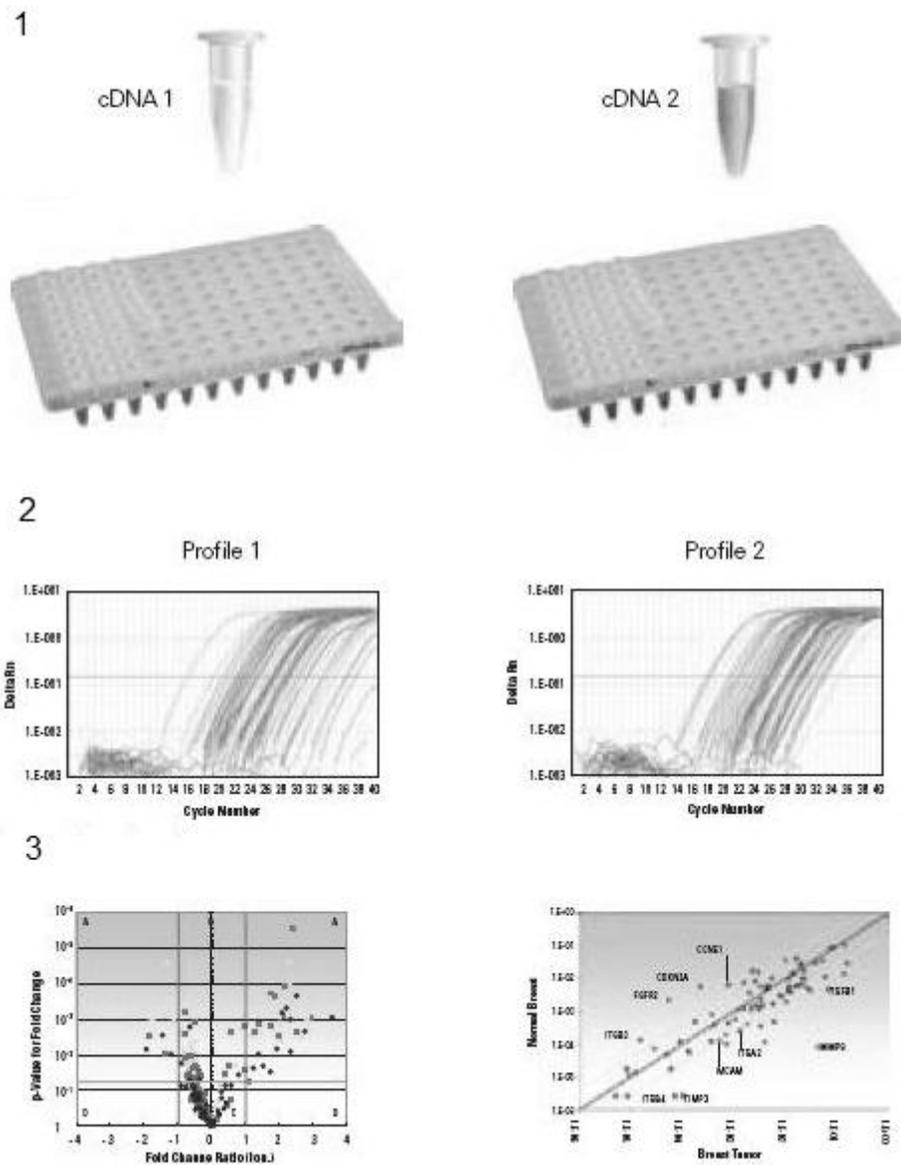


Figura 7. *Human DNA Damage Signaling RT² Profiler™ PCR Array.* 1. Os cDNAs das co-culturas são colocados em cada poço das placas, e em cada poço há um par de *primers* específicos para cada gene de reparo. 2. e 3. É realizada uma corrida destas amostras em equipamento de PCR em tempo real, e após o término da mesma os dados são analisados.

Tabela 1- Genes analisados na placa de *PCR Array*

Mecanismos de Reparo ao DNA	Genes Envolvidos
Reparo por Excisão de Base (BER)	<i>APEX1, APEX2, CCNO, LIG3, MPG, MUTHY, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, POLB, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1</i>
Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER)	<i>ATXN3, BRIP1, CCNH, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SLK, XAB2, XPA, XPC</i>
Reparo por Mau Pareamento (MMR)	<i>MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, POLD3, TREX1</i>
Reparo de Quebra de fita dupla (DSB)	<i>BRCA1, BRCA2, DMC1A, FEN1, LIG4, MRE11A, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51L1, RAD51L3, RAD52, RAD54L, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6</i>
Outros Genes Relacionados ao Reparo de DNA	<i>ATM, ATR, EXO1, MGMT, RAD18, RFC1, TOP3A, TOP3B, XRCC6BP1</i>

3.4. Validação dos dados - Casuística

Além dos métodos *in vitro*, para validar os resultados obtidos no item anterior foram incluídas amostras oriundas de 150 pacientes (termo de Consentimento- Anexo I)

de ambos os sexos com mais de 18 anos, do banco de amostras biológicas da UNIFAG/USF (Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia - Universidade São Francisco CAAE 0007.0.142.000-09 Anexo II). Além disso, foram incluídas amostras de 127 crianças, com diagnóstico endoscópico de gastrite, oriundas do banco de amostras biológicas do laboratório coordenado pela Dra Isabel Cristina Affonso Scaletsky (UNIFESP), e 10 pacientes com câncer gástrico (UNESP- Botucatu). Todas as amostras estavam preservadas em *RNAlater* e estocadas a -80°C.

Para a avaliação da presença do *H. pylori*, foram utilizados o teste rápido da urease (Probac, São Paulo, Brasil) e PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A presença da bactéria foi confirmada caso os métodos diagnósticos positivassem. Por outro lado, os pacientes foram considerados não infectados quando o resultado da PCR não acusasse a presença da bactéria.

3.5. Validação dos dados - Extração de DNA e PCR

A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio. Em resumo, após a coleta da biópsia, esta foi ressuspensa em 300 µL de solução tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0; tween 0,5 %), adicionando 15 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL). As amostras foram incubadas à 37°C por pelo menos 2 horas. Em seguida, o DNA foi purificado por meio de centrifugações com fenol/clorofórmio, e precipitado com acetato de sódio 3M.

A detecção molecular do *H. pylori* foi feita através da amplificação, por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) do gene *napA*. As seqüências dos *primers* que foram usados neste trabalho estão descritos na Tabela 2.

A análise dos fatores de virulência da bactéria também foi realizada por meio da PCR do gene *cagA*.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 2,5 µL de DNA genômico, 20 pmol de cada *primer* (Tabela 1), 200 µM de cada dNTPs (0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dTTP), 1,5% de MgCl₂, 2,5 unidades de

enzima *Taq* DNA Polimerase e tampão de reação para a enzima. Após a reação foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose para a visualização dos resultados.

Tabela 2 – Primers utilizados para verificação da presença do *H.pylori* e seu fator de virulência *cagA*.

Gene	Primer	Sequência (5'→3')	PCR (pb)	Referência
<i>napA</i>	HPNAP-F	TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC	300	Presente trabalho
<i>napA</i>	HPNAP-R	CCTGCTGGGCATACTTCACCATG		
<i>cagA</i>	D008-F	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA	297	Covacci <i>et al.</i> , 1993
<i>cagA</i>	R008-R	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		

3.6. Validação dos dados - Análise de expressão

A validação dos dados dos genes que apresentaram expressão diferenciada na presença da bactéria após análise dos PCR *Arrays* foi realizada em 287 pacientes anteriormente descritos neste trabalho. Após consulta à literatura pertinente e análise dos resultados dos PCR *Arrays* das co-culturas, foram selecionados para validação da expressão, por PCR em tempo Real os seguintes genes: *FEN1*, *LIG1*, *PMS1*, *SMC1A*, *MPG*, *CHK1*, *CHK2*, *GADD45A*, *GADD45G*, *PPP15A*, *FANCG*, *SMC1A*, *ERCC1*, *GTF2H1*, *PCNA*, *RAD21*, *XRCC2*, *PI3K*, *RAD18* e *Ku86* (Anexo III).

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados com o auxílio do site <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm> e estão dispostos Tabela 3. A reação de PCR em tempo real foi feita usando o Platinum[®] SYBR GREEN[®] qPCR Supermix UDG (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. A reação foi realizada em um volume de 50 µL, contendo: 25 µL de Platinum[®] SYBR GREEN[®] qPCR Supermix UDG (Invitrogen), 10 µM de cada *primer* e 10 µL de cDNA (50 ng). As reações foram

previamente tratadas com UDG por 2 minutos a 50°C e desnaturadas por 2 minutos a 95°C, seguindo por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento por 15 segundos e extensão a 72°C por 15 segundos.

A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento 7300 Real- Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o Ct (*threshold cycle* – ciclo no qual todas as amostras atingiram a mesma intensidade de fluorescência) determinado com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). As amostras foram analisadas em triplicatas, e normalizadas pela expressão do gene constitutivo β -actina.

Tabela 3. *Primers* utilizados para verificação da expressão dos genes de reparo ao DNA em humanos.

Gene	Primer	Sequencia (5'→3')
FEN1	FEN1- F	CTTGACCCCAACAAGTACCC
	FEN1- R	AGCACCTCAGGTTCCAAGAA
LIG1	LIG1- F	GTGGGTGATGGTGTCTTCT
	LIG1- R	CTTTCTCGGCTGCCTCAG
PMS1	PMS1- F	GCACACCCAGTCAGAAAATG
	PMS1- R	TCCCCTGCTCCACTCATC
SMC1A	SMC1A- F	AGGGACGGGTAGGAATTAGC
	SMC1A- R	TTGCCTTCATGTCTTCATGC
MPG	MPG- F	CGACTGGGGTTGGAGTTC
	MPG- R	GAAGTCGCCGACTAGGAC
CHK1	CHK1- F	CAGGGGGTTTATCTGCGAT
	CHK1- R	GCCAAGCCAAAGTCTGAGAT
CHK2	CHK2- F	TGGCTGTGCAGTACCTTCAT
	CHK2- R	TGGAGTGCCCAAATCAGTA
GADD45A	GADD45A- F	GAGGAATTCTCGGCTGGAG
	GADD45A- R	ATCTCTGTCGTCCTCGT
GADD45G	GADD45G- F	GCGAGAACGACATCGACATA
	GADD45G- R	TTCGAAATGAGGATGCAGTG
PPP15A	PPP15A- F	GCCAACCCAGTGATGAAGA

	PPP15A- R	CAGGGAGGACACTCAGCTTC
FANCG	FANCG- F	AGCTGCTAGTTGAGGCCTTG
	FANCG- R	ATGAAGGGGTGAGGCTAGGT
SMC1A	SMC1A- F	AGGGACGGGTAGGAATTAGC
	SMC1A- R	TTGCCTTCATGTCTTCATGC
ERCC1	ERCC1- F	AGTCTCTGGGGAGGGATTCT
	ERCC1- R	CAGCAGCAGCCTGTGTAGTC
GTF2H1	GTF2H1- F	ATGTTCCCCACAACATGACA
	GTF2H1- R	TTGGCACATTCTGCAAAGAG
PCNA	PCNA- F	GGCGTGAACCTCACCAGTAT
	PCNA- R	AGGTATCCGCGTTATCTTCG
RAD21	RAD21- F	TGGGCCTGATAGTCCTGATT
	RAD21- R	TCAATAGGCTCCAATGCAAA
XRCC2	XRCC2- F	AGTGGGCAAAGGACATGAAC
	XRCC2- R	ATCAGTGATGCTGGGCTTTT
PI3K	PI3K- F	CCACGCAGGACTGAGTAACA
	PI3K- R	TTCTCCTGCTCAGTGATTTTCAG
RAD18	RAD18- F	CGCTGAAAGTGCTGAGATTG
	RAD18- R	CTGTGGCAACCAAAAGTAGG
Ku86	Ku86- F	CCTGAAAGCCCTTCAAGAGA
	Ku86- R	CAGAGGCTTCCTCTTTGGTG
β- actina	β - actina-F	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	β - actina-R	AGCACTGTCTTGCGTACAG

3.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados por teste *t* não pareado, sendo os resultados expressos como média acompanhada de seu respectivo desvio padrão. Todos os resultados foram analisados usando-se o programa estatístico GraphPad InStat. Os resultados foram apresentados como razões de chance com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *DNA Damage Signaling Pathway PCR Array*

Para a análise do perfil de expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de reparo ao DNA usamos o *Human DNA Damage Signaling RT² Profiler™ PCR Array*. Neste foram avaliados simultaneamente 84 genes por PCR em tempo real após 24 e 48 horas de co-cultura com a linhagem SS1. Após a análise, usando o software mencionado na metodologia, foram considerados significativos o aumento ou a diminuição maior ou igual a 2 vezes, quando comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos neste trabalho (Anexo IV) mostram que 15 (18%) dos genes mostravam-se induzidos na presença do *H. pylori*, mostrado na Tabela 4. Em 13 desses genes, o aumento de expressão foi detectado após 24 e 48 h de co-cultura, e em 7 desses genes a indução foi maior no tempo 48 h (razão 48/24 maior do que 4). Em dois dos genes, em que se observou um aumento de expressão, esta se mostrou não significativa após 48 h de co-cultura (Tabela 4). Observamos uma redução na expressão em 12 (14%) genes após a co-cultura, mostrado na Tabela 4. Em 6 desses genes, a repressão foi observada tanto em 24 quanto em 48 h. Cinco desses genes tiveram a expressão diminuída somente após 48 h de co-cultura, e em um gene observou-se uma repressão somente no tempo 24 h (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise de expressão usando o *Human DNA Damage Signaling RT² Profiler™ PCR Array*.

Mecanismo de Reparo	Genes	24 horas	48 horas
DSB	<i>CIB1</i>	2,2661	1,4522
	<i>DDIT3</i>	8,0211	20,4184
	<i>DMC1</i>	7,7495	11,6487
	<i>RAD21</i>	-1,5859	-2,5268
	<i>SMC1A</i>	-1,9763	-3,5181
	<i>XRCC2</i>	-3,1868	-3,3037
	<i>PNKP</i>	2,0849	1,2816
	<i>FEN1</i>	-2,1075	-3,1329
NER	<i>ERCC1</i>	5,5674	4,5473
	<i>GTF2H1</i>	2,3406	2,685
	<i>XPA</i>	2,2386	2,7714
	<i>LIG1</i>	-1,2209	-3,0823
Controle de ciclo celular	<i>MAPK12</i>	2,3492	2,0565
	<i>GADD45A</i>	7,7291	47,7788
	<i>GADD45G</i>	5,7263	12,6022
	<i>PCBP4</i>	8,515	11,298
	<i>CHK1</i>	-2,0476	-2,0504
	<i>CHK2</i>	-1,4834	-2,0152
BER	<i>MPG</i>	7,8148	4,8373
	<i>NTHL1</i>	5,1241	4,2143
Controle de Ciclo celular/apoptose	<i>GML</i>	7,5094	11,3664
	<i>PPP1R15A</i>	7,4477	15,8323
MMR	<i>PCNA</i>	-1,6881	-3,9106
	<i>PMS1</i>	-2,5555	-1,5753
Reparo por indução de quebra (BIR)	<i>EXO1</i>	-1,9247	-2,4736
Supressor tumoral	<i>FANCG</i>	-1,5444	-2,0835

4.2. Genotipagem Bacteriana

Estudou-se uma população de 277 pacientes, sendo 150 pacientes adultos, *H. pylori* positivos (Hp+) e *H. pylori* negativos (Hp-) e 127 crianças Hp+ e Hp-. Os pacientes foram divididos em 4 grupos: adultos com gastrite crônica Hp+ (124), adultos com gastrite crônica Hp- (26), crianças Hp+ (29) e crianças Hp- (98). A presença do *H. pylori* foi verificada por meio de PCR. Os resultados provenientes destas análises mostraram que, nas amostras de adultos a prevalência da bactéria *H. pylori* foi de 82%, e na população infantil foi de 23%. Para os pacientes *H. pylori* positivos, foram realizadas outras reações de PCR para a identificação do fator de virulência *cagA* e os resultados se encontram na tabela 5.

Tabela 5 – Genotipagem *H. pylori*.

Genótipo	Gastrite n (%)	Criança <i>H.pylori</i> (+) n (%)
<i>cagA</i>		
<i>cagA</i> ⁺	109 (88%)	10 (35%)
<i>cagA</i> ⁻	15 (12%)	19 (65%)

4.3. qRT-PCR (*Quantitative Real Time –PCR*)

Os genes que apresentaram expressão diferenciada na presença da bactéria *H. pylori*, foram validados em 287 pacientes, através da técnica do PCR em tempo real.

Dos 84 genes estudados, 27 apresentaram expressão diferenciada na presença

do *H. pylori*. Além disso, foram incluídos outros dois genes que não estavam presentes no *array*, mas que são fundamentais para o reparo ao DNA (*Ku86* e *PI3K*).

Após as análises por PCR em tempo real, foi possível validar 4 dos 27 genes que se apresentaram diferencialmente expressos em co-cultura na presença do *H. pylori*. Após a validação dos resultados, verificamos que nas crianças a infecção por *H. pylori* reprimiu significativamente o gene *XRCC2*. No grupo dos adultos, resultado semelhante foi observado para o mesmo gene. Em relação ao *GTF2H1*, os resultados obtidos foram os opostos aos observados no *array*. Em relação ao câncer gástrico, observou-se uma redução significativa na expressão dos genes *XRCC2* e *GTF2H1*, além disso, verificou-se uma repressão significativa em *RAD18* e *Ku86*, ambos independentemente da infecção por *H. pylori*. Nossos dados indicam que a infecção por cepas mais virulentas não alterou o padrão de expressão de nenhum dos genes estudados (dados não mostrados, Anexo V). Os resultados da expressão gênica entre os grupos encontram-se na Tabela 6:

Tabela 6 – Resultados da expressão dos genes validados.

Grupos	Genes			
	XRCC2	RAD18	Ku86	GTF2H1
Criança Hp-	770.56 ± 49,55	20.80 ± 2,92	5.16 ± 1,52	10,74 ± 3,78
Criança Hp+	322.53 ± 23,91**	23.1 ± 2,78	4.70 ± 2,24	13,46 ± 4,77
Adulto Hp-	5.82 ± 1,37	2.20 ± 0,62	4.99 ± 0,52	8,02 ± 2,15
Adulto Hp+	2.49 ± 0,91 [†]	2.93 ± 1,19	4.93 ± 1,13	4.56 ± 1,71 [†]
Câncer	0.65 ± 0,18 ^{‡‡}	3.65E-05 ± 4.6E-07 ^{‡‡}	4.7E-06 ± 1.37E-07 ^{‡‡}	4,98 ± 0,82 ^{‡‡}

*p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo criança Hp-; [†]p<0,05 quando comparado ao grupo adulto Hp-; [‡]p<0,05 e ^{‡‡}p<0,01 quando comparado ao grupo adulto Hp-

5. DISCUSSÃO

Já está bem estabelecido que a infecção por *H. pylori* acontece normalmente na primeira infância, após este período, se não houver o tratamento adequado com antibióticos a infecção pode perdurar por toda a vida do indivíduo (Suerbaum e Josenhans, 2007; Morelli et al., 2010). A gastrite crônica é um dos sinais que caracterizam uma infecção por *H. pylori*, (Touati, 2010). Portanto o *H. pylori* é considerado o principal fator de risco para câncer gástrico (Kelley e Duggan, 2003).

Partindo deste princípio, o presente trabalho avaliou a influência do *H. pylori* sobre as vias de sinalização de reparo de dano ao DNA. Foi analisada a expressão de 84 genes envolvidos em apoptose, ciclo celular e reparo de DNA em amostras de co-cultura.

Os resultados oriundos dos *arrays* mostraram diferentes perfis de expressão. Alguns genes se apresentaram hiperexpressos quando na presença da bactéria *H. pylori* na dependência do tempo de co-cultura. Já outros genes tiveram uma expressão reduzida nas co-culturas, e outros não mudaram seu perfil de expressão.

Os genes *CIB1* e *PNKP* se mostram hiperexpressos somente nas co-culturas de 24 horas, voltando à expressão normal na co-cultura de 48 horas, o que demonstra uma adaptação das células gástricas aos mecanismos de reparo influenciados por estes genes.

Os genes *DDIT3*, *DMC1*, *ERCC1*, *GADD45A*, *GADD45G*, *GML*, *GTF2H1*, *MAPK12*, *MPG*, *NTHL1*, *PCBP4*, *PPP1R15A* e *XPA* apresentaram expressão aumentada nas co-culturas de 24 e 48 horas. Não há trabalhos na literatura que correlacionem o aumento da expressão de genes de reparo ao DNA com a presença da bactéria *H. pylori*, porém há um trabalho que relata em humanos colonizados por *H. pylori*, uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio causadas pela resposta inflamatória devido à presença da bactéria na mucosa gástrica (Ricci et al., 2011). Com os resultados do presente trabalho não se pode mimetizar a resposta inflamatória que acontece *in vivo* na presença do *H. pylori*, mas estes

resultados talvez possam ser explicados pela resposta da célula frente ao estresse induzido pela presença da bactéria em conjunto com as células gástricas, como também pelas próprias condições e variações da cultura celular.

Como já mencionado anteriormente, alguns genes apresentaram uma redução da sua expressão normal nas co-culturas de 24 e 48 horas (*CHK1*, *EXO1*, *FEN1*, *RAD18*, *SMC1A* e *XRCC2*), já outros genes (*CHK2*, *FANCG*, *LIG1*, *PCNA* e *RAD21*) se apresentaram menos expressos somente após 48 horas de co-cultura, o que indica que a presença da bactéria *H. pylori*, na dependência do tempo de colonização, reduz a expressão de alguns genes de reparo ao DNA fazendo com que o sistema de reparo se torne incapaz de assegurar a total estabilidade do genoma, o que pode levar a um acúmulo de mutações e facilitar o surgimento de câncer, sendo considerada a maior probabilidade de tal evento para as células que são expostas há mais tempo à bactéria. O gene *PMS1* foi o único a se apresentar menos expresso apenas em 24 horas de co-cultura, voltando a ter uma expressão normal ao tempo de 48 horas, o que indica um restabelecimento do padrão normal de expressão deste gene de reparo nas células. Um estudo mostrou que o reparo por mau pareamento estava reprimido em ratos que estavam infectados por *H. pylori* há 6 meses (Machado et al., 2009). A deficiência neste tipo de reparo também foi verificada em biópsias de pacientes infectados pela bactéria *H.pylori*. Pode-se concluir que a instabilidade genômica e mutações ocorridas durante a infecção por *H. pylori* estão diretamente relacionadas com a diminuição da eficiência do sistema de reparo ao DNA das células do hospedeiro, desta forma auxiliando na promoção da transformação maligna das células (Touati, 2010).

Além de se verificar qual a influência da bactéria sobre os mecanismos de reparo ao DNA, é importante avaliar também qual a prevalência de infecção por esta bactéria dentro da população estudada, ou seja, verificar qual o grau de exposição dos indivíduos desta população.

Com os dados do perfil de expressão de genes de reparo já avaliados em co-cultura, e a prevalência do *H. pylori* e seu fator de virulência *cagA* verificado dentro da população estudada, é importante que se tenha um parâmetro de quais as

conseqüências da infecção por *H. pylori in vivo*. Para tal, através da análise dos resultados dos *Arrays*, os seguintes genes foram escolhidos para a validação dos resultados em humanos: *FEN1*, *LIG1*, *PMS1*, *SMC1A*, *MPG*, *CHK1*, *CHK2*, *GADD45A*, *GADD45G*, *PPP15A*, *FANCG*, *SMC1A*, *ERCC1*, *GTF2H1*, *PCNA*, *RAD21*, *XRCC2*, *PI3K*, *RAD18* e *Ku86*. Mas apenas os genes *XRCC2*, *GTF2H1*, *RAD18* e *Ku86* apresentaram resultados estatisticamente significativos.

O gene *XRCC2* se apresentou menos expresso em crianças Hp+ quando comparadas às crianças Hp-. O gene *XRCC2* é essencial para o mecanismo de reparo por recombinação homóloga e um candidato ao envolvimento na progressão tumoral. Alguns polimorfismos neste gene já foram ligados ao câncer de mama e ao câncer colorretal, tais polimorfismos reduzem a expressão do gene prejudicando o reparo (Curtin et al., 2009). Embora não haja dados prévios que indiquem qual a relação *H. pylori*/*XRCC2*, através de nossos dados podemos inferir que a bactéria reduz a expressão de genes relacionados ao reparo de quebra de fita dupla, ou seja, o *H. pylori* reduz a eficácia do sistema de reparo e contribui para o acúmulo de danos ao DNA facilitando a tumorigênese, o que é confirmado neste trabalho pela menor expressão deste gene em pacientes com câncer quando comparado ao grupo de adultos Hp-. Lesões causadas pela O₆ metilguanina são reparadas por dois processos, através do gene de reparo *MGMT* e por outra via alternativa pelo gene *XRCC2* (Ross et al., 2009), há um trabalho que mostra em humanos, que o *H. pylori* causa uma hipermetilação do promotor do gene *MGMT*, diminuindo a expressão do mesmo e por conseqüência causando uma deficiência no reparo (Sepulveda et al., 2010). Em nossas análises de *Array* o gene *MGMT* não mostrou ser influenciado pela presença do *H. pylori*, como o gene *XRCC2* foi, portanto acreditamos que o *H. pylori* exerceu uma ação direta sobre este gene e desta forma diminuiu sua capacidade de reparo.

Para o gene *GTF2H1* foi observado que ao contrário do que apresentado nas co-culturas, este gene foi menos expresso em pacientes adultos Hp+ que em pacientes adultos Hp-. Talvez a expressão aumentada deste gene em co-cultura se deva ao fato do pequeno tempo de exposição das células em co-cultura com o *H. pylori*, quando

comparado a uma situação *in vivo*, onde a colonização da mucosa gástrica pela bactéria pode durar anos e influenciar de forma direta a expressão de genes de reparo. O gene *GTF2H1* participa do processo de reparo por excisão de nucleotídeo, como também do controle transcricional, através de interações específicas com uma diversidade de fatores importantes durante a carcinogênese (Wu et al., 2009). Analisando os resultados, pode-se perceber que o *H. pylori* reduz a eficácia do reparo por excisão de nucleotídeos, ligando a bactéria aos processos de carcinogênese gástrica, resultado este reafirmado pela menor expressão deste gene em pacientes com câncer gástrico. Porém não há dados na literatura que correlacionem o gene *GTF2H1* à infecção por *H. pylori*, portanto não se sabe se este microrganismo teve ação direta sobre o NER, ou se a diminuição da expressão do mesmo foi causada por uma hipermetilação do gene ou por outros mecanismos epigenéticos, que poderiam ser causados pela presença do *H. pylori*.

Os genes *RAD18* e *Ku86* se apresentaram menos expressos em pacientes com câncer gástrico quando comparados aos pacientes adultos Hp-. A proteína RAD18 é uma das principais envolvidas no reparo pós- replicação (PRR); é uma proteína de ligação à fita simples de DNA e tem atividade de uma ubiquitina ligase (E3). Mutações neste gene já foram correlacionadas à uma maior sensibilidade a mutágenos (Nakamura et al., 2009). O gene *Ku86* codifica uma proteína que se liga à DNA-PK e participa do processo de reparo de quebra de fita dupla através de recombinação não-homóloga (Hefferin e Tomkinson, 2005; Bescow et al., 2009). Os dados presentes neste trabalho sugerem que quando já estabelecido o processo da carcinogênese, vários genes ligados ao reparo de DNA estão menos expressos, ou seja, o reparo de DNA não exerce mais sua função normal e não garante a estabilidade do genoma. Estes dados estão em concordância com a literatura que liga a expressão diminuída destes genes com outros tipos de câncer (Zeidler et al., 2005; Kumar et al., 2011). Porém, não se pode afirmar que o *H. pylori* não tenha influência direta sobre estes genes ou sobre mecanismos epigenéticos que poderiam influenciar na expressão destes genes, pois não há dados na literatura que demonstrem este tipo de associação. Há relatos de que

o gene *RAD18* se associa às quebras de fita dupla de DNA através da ubiquitinação da histona H2A e outros componentes ubiquitinados da eucromatina, que permite o recrutamento da RAD9, que vai funcionar diretamente sobre reparo da DSB, independente da ativação das checkpoint quinases *CHK1* e *CHK2* (Braastad et al., 2002), ou seja este dado pode talvez sugerir porque os genes *CHK1* e *CHK2* não foram diferencialmente expressos na presença do *H. pylori*, e também indicar a histona H2A como possível local de ação para o *H. pylori* controlar a expressão do gene *RAD18*.

Já para o gene *Ku86*, há um estudo que indica um processo de reparo de DSB alternativo, chamado de RIND- EDSBs (*Replication independent- Endogenous DSB*) que é dependente de *ATM* e não de *Ku86* e que está ligado a hipometilação genômica que pode levar a uma instabilidade do genoma e facilitar a tumorigênese (Kongruttanachok et al., 2010). De acordo com os achados anteriores pode-se então relacionar porque os genes *ATM*, *ATR*, *DNA-Pk* e *Ku70*, que fazem parte do mesmo complexo que *Ku86* e que não foram diferencialmente expressos na presença do *H. pylori* em co-cultura. Não se pode afirmar também mas pode-se propor a ideia de que o gene *Ku86* possa sofrer ação direta do *H. pylori* ou causar uma hipermetilação do mesmo, ambos resultando na diminuição da capacidade de reparo deste gene.

De acordo com os achados deste trabalho pode-se então inferir que os mecanismos de reparo aos danos de DNA são influenciados pela infecção por *Helicobacter pylori*, e que de modo geral, esta bactéria reduz a expressão de genes relacionados ao reparo de excisão de nucleotídeo bem como o reparo de quebra de fita dupla, independentemente dos fatores de virulência da bactéria, assim como descrito por TOLLER et al., 2011. Em indivíduos *H. pylori* positivos com a presença do fator de virulência CagA, observou-se uma tendência a diminuição da expressão de genes de reparo, mas assim como descrito por TOLLER et al., 2011, o mais importante fator na expressão destes genes é a presença da bactéria *H. pylori* e não de seus fatores de virulência. Os resultados deste trabalho também estão de acordo com dados de literatura que indicam a diminuição da expressão de genes de reparo ao DNA quando já estabelecido o processo de carcinogênese (Curtin et al., 2009; Ancin et al., 2012).

Porém trabalhos futuros serão necessários para estabelecer com clareza se esta influência do *H. pylori*, se dá de forma direta sobre os genes de reparo ou se a bactéria influencia mecanismos epigenéticos como metilação e modulação de histonas, e desta forma reduz a expressão destes genes bem como sua capacidade de reparo. Seria importante também estudar todo o processo da carcinogênese gástrica (gastrite crônica superficial, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e adenocarcinoma), e não somente casos de gastrite crônica e câncer como neste trabalho, talvez esta lacuna entre o início e o fim do processo de carcinogênese expliquem o baixo número de genes influenciados pelo *H. pylori*, bem como outros que tiveram sua expressão reduzida apenas em câncer gástrico, portanto não se pode atribuir as diferenças encontradas neste trabalho como mutações primárias, pois não se sabe qual seria o perfil de expressão destes genes ao decorrer do processo carcinogênico.

Apesar de não ser possível correlacionar com clareza a função do *H. pylori* nestas diferenças encontradas nas expressões de genes de reparo, já está bem estabelecido que as propriedades oncogênicas da infecção por *H. pylori* resultam de dois mecanismos: um efeito direto genotóxico da bactéria, resultado da ação de seus fatores de virulência e produtos do metabolismo bacteriano, ou o papel principal causado pela inflamação gástrica, atribuído principalmente aos danos causados ao DNA e à célula pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Touati, 2010).

Portanto o presente trabalho demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados que investiguem qual o verdadeiro papel do *H. pylori* no reparo ao DNA e desta forma elucidar estas diferenças na expressão de genes como as encontradas neste estudo, como também correlacionar de maneira mais detalhada a influência desta bactéria durante o processo de carcinogênese gástrica.

6. CONCLUSÃO

O *H. pylori* influencia *in vitro* a expressão de genes relacionados aos quatro sistemas de reparo ao DNA. Em co-cultura, 27 dos 84 genes se apresentaram diferencialmente expressos na presença do *H. pylori*.

Em humanos, o *H. pylori* tem envolvimento no mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Foi observada uma repressão significativa do gene *GTF2H1* em adultos e crianças *H. pylori* positivos.

O gene *XRCC2*, envolvido no reparo de quebra de fita dupla de DNA (DBSRs), apresentou expressão diminuída no grupo de adultos *H. pylori* positivos, demonstrando a influência desta bactéria sobre este mecanismo de reparo.

A repressão de genes de reparo observadas em humanos *H. pylori* positivos, independe do fator de virulência CagA da bactéria.

Os genes *XRCC2*, *RAD18*, *Ku86* e *GTF2H1*, foram reprimidos em pacientes com câncer gástrico, reafirmando a literatura que diz que a expressão global de genes de reparo ao DNA está reduzida em pacientes com câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahamed, K. S.; Khann, A. A.; Ahmed, I.; Tiwari, S. K.; Habeeb, A.; Ahi, J. D.; *et al.* Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori* infection: a South Indian perspective. **Singapore Med J**, 48: 543-549, 2007.

Argent, R.H.; Thomas, R.J.; Letley, D.P.; Rittiz, M.G.; Hardie, K.R.; Atherton, J.C. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. **J Med Microbiol**, 57: 145-150, 2008.

Atherton, J. C.; Blaser, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. **JCI**, 119(9): 2475-2487, 2009.

Bartchewsky, W. Jr.; Martini, M. R.; Masiero, M.; Squassoni, A. C.; Alvarez, M. C.; Ladeira, M. S.; Salvatore, D.; Trevisan, M.; Pedrazzoli, J. Jr.; Ribeiro, M. L. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **Scand J Gastroenterol**, 44(2):153-61, 2009.

Bescow, C., Skikunieve, J.; Holgersson, A.; Nilson, B.; Lewensohn, R.; Kantes, L.; Viklosson, K. Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, KU70 e Ku86. **British Journal of Cancer**, 101:816- 821, 2009.

Bolderson, E.; Richard, D.; Zhou, B.; Khanna, K. K. Recent Advances in Cancer Targeting Proteins Involved in DNA Double- Strand Break Repair. **Clin Cancer Res**, 15(20):6314- 6320, 2009.

Borges da Costa, J. F. F.; Leal, M. F.; Silva, T. C. R.; Andrade Junior, E. F.; Rezende, A. P.; *et al.* Experimental Gastric Carcinogenesis in *Cebus apella* Nonhuman Primates. **PLoS ONE**, 16(7): e21988, 2011.

Bornschein, J.; Kandulski, A.; Selgrad, M.; Malferteiner, P. From Gastric Inflammation to Gastric Cancer. **Digest Dis**, 28:609- 614, 2010.

Castedo, M.; Perfettini, J. L.; Roumier, T.; Yakushyin, K.; Home, D.; Medema, R.; Knoemer, G. The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. **Oncogene**, 23:4353- 4361, 2004.

Chang, Y. J.; Wu, M. S.; Lin, J. T.; *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. **Mol Pharmacol**, 66(6): 1465-77, 2004.

Chen, D. J.; Nirodi, C. S. The Epidermal Growth Factor Receptor: A Role in Repair of Radiation-Induced DNA Damage. **Clin Cancer Res**, 13: 6555-60, 2007.

Chey, R. M.; Wong, B. C. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Gastroenterol**, 102: 1808-25, 2007.

Choli-Papadopoulous, T.; Kottakis, F.; Papadopoulos, G.; Pendas, S. *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein as target for new drugs against *H. pylori* inflammation. **World J Gastroenterol**, 17(21): 2585-2591, 2011.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. **Cancer Res**, 52: 6735-40, 1992.

Covacci, A.; Censini, S.; Bugnoli, M.; Petracca, R.; Burroni, D.; Macchia, G.; Massone, A.; Papini, E.; Xiang, Z.; Figura, N.; Rappuoli, R. Molecular characterization of the 128kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 5791-95, 1993.

Cover, T. L.; Blanke, S.R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nat Rev Microbiol**, 3:320- 332, 2005.

Cover, T. L.; Krishna U. S.; Israel, D. A.; Peek Jr, R. M. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. **Canc Res**, 63: 951-7, 2003.

Curtin, K.; Lin, W. Y.; Geroge, R.; Katory, M.; Shorto, J. Genetic variants in *XRCC2*: new insights into colorectal cancer tumorigenesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 18(9):2476- 2484, 2009.

Deltenre, M.; de Koster, E. How come I've got it? (A review of *Helicobacter pylori* transmission). **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 12:479-82, 2000.

Dianov, G. L. Base excision repair targets for cancer therapy. **Am J Cancer Res**, 1(7): 845-51, 2011.

Ding, S.; Goldberg, J. B.; Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. **Future Oncol**, 6(5): 854-862, 2010.

Doorn, L. J.; Figueiredo, C.; Mégraud, F.; Pina, S.; Midolo, P.; Queroz, D. M.; Carnero, F.; Pegado, M. D.; Sanna, R. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, 116:823- 830, 1999.

Dorer, M. S.; Fero, J.; Salama, N. R. DNA Damage Triggers Genetic Exchange in *Helicobacter pylori*. **PLoS Pathog**, 6(7): 1-10, 2010.

Enroth, H.; Kraaz, W.; Engstrand, L.; et al. *Helicobacter pylori* strains types and risk of gastric cancer: a case- control study. **Cancer Epidemiol Biomarker Prev**, 9:981- 985, 2000.

Ernst, P. B.; Peura, D. A.; Crowe, S. E. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. **Gastroenterol**, 130(1): 188-206, 2006.

Ferlay, J.; Shin, H. R.; Bray, F.; Forman, D.; Mastherson, C.; Parkin, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBO CAN 2008. **Int J Cancer**, 127(12): 2893-2917, 2010.

Fu, S.; Ramanujam, K. S.; Wong, A.; Fantry, G. T.; Drachenberg, C. B.; James, S. P.; Meltzer, S. J.; Wilson, K. T. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. **Gastroenterol**, 116: 1319-29, 1999.

Fuccio, L.; Zagari, R. M.; Eusebi, L. H.; Laterza, L.; Cennamo, V.; Ceroni, L.; et al. Meta analysis: Can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer ? **Ann Intern Med**, 151:121-128, 2009.

Galgani, M.; Busiello, I.; Censini, S.; Zappacosta, S.; Racioppi, L.; Zarrilli, R. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: role of the *cag* pathogenicity island. **Infect Immun**, 72: 4480-85, 2004.

Hatakeyama, M. Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. **Oncogene**, 27:7047- 7054, 2008.

Heatey, R. V. The *Helicobacter pylori* handbook. 1. Ed. Osney Mead: Balckwell Science, 1995.

Hefferin, M. L.; Tomkinson, A. E. Mechanism of DNA double- strand break repair by non- homologous end joining. **DNA repair**, 4:639- 648, 2005.

Holcombe, C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. **Gut**, 33: 429-31, 1992.

Inagaki, A.; Sleddens-Linkels, E.; Cappellen, W. A.; Hibbert, R. G.; Sixma, T. K.; Hoeijmakers, J. H. J.; Grootegeed, J. A.; Baarends, W. M. Human RAD18 Interacts with Ubiquitylated Chromatin Components and Facilitates RAD9 Recruitment to DNA Double Strand Breaks. **PLoS ONE**, 6(8): 1-14, 2011.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2009.

International Agency for Research on Cancer. **The Globocan Project**, 2009.

Isomoto, H.; Moss, J.; Hirayama, T. Pleiotropic Actions of *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin, VacA. **Tohoku j Exp Med**, 220:3- 14, 2010.

Israel, D. A.; Salama, N.; Krishina, U.; Rieger, U. M.; Atherton, J. C.; *et al.* *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 14625-30, 2001.

Jang, J.; Lee, S.; Jung, Y.; Fukumoto, M.; Gould, V. E.; Lu, I. Malgun (Clear) Cell Change in *Helicobacter pylori* Gastritis Reflects Epithelial genomic Damage and Repair. **Am J Pathol**, 1-12, 2010.

Kamangar, F.; Scheikhattari, P.; Mohebtash, M. *Helicobacter pylori* and its Effects on Human Health and Disease. **Arch Iran Med**, 14(3): 192-9, 2011.

Karanjawala, Z. E.; Murphy, N.; Hinton, D. R. Hsieh, C. L.; Lieber, M. R. Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. **Curr Biol**, 12: 397-402, 2002.

Katsios, C.; Baltogiannis, G.; Roukos, Gh. Progress, challenges and new genome-based concepts in the multidisciplinary treatment of gastric cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, 11(4): 503-506, 2011.

Kelley, J. R.; Duggan, J. M. Gastric Cancer epidemiology and risk factors. **J Clin Epidemiol**, 56:1- 9, 2003.

Kim, D. Y.; Cha, S. T.; Ahn, D. H.; *et al.* STAT3 expression in gastric cancer indicates a poor prognosis. **J Gastroenterol Hepatol**, 24(4): 646-51, 2009.

Kim, J. J.; Tao, H.; Carloni, E.; Leung, W. K.; Graham, D. Y.; Sepulveda, A. R. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. **Gastroenterol**, 123: 524-53, 2002.

Kongruttanachok, N.; Phuangphairoj, C.; Thongnak, A.; Ponyeam, W.; Rattanatanyong, P.; Pornthanakasem, W.; Mutirangura, A. Replication independent DNA double-strand break retention may prevent genomic instability. **Mol Canc**, 2 (70): 2-14, 2010.

Kusters, J. G.; Vliet, A. H. M.; Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Rev**, 12:82- 88, 2006.

Letley, D. P.; Rhead, J. L.; Twells, R. J.; Done, B.; Atherton, J. C. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem**, 278:26734- 26741, 2003

Lindholm, C.; Quiding-Jarbrink, M.; Lonroth, H.; Hamlet, A.; Svennerholm, A. M. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. **Infect Immun**, 66: 5964-71, 1998.

Machado, A.; Figueiredo, C.; Touati, E.; Maximo, V.; Sousa, S.; Michel, V.; Carneiro, F.; Nielsen, F. C.; Seruca, R.; Rasmussen, L. J. *Helicobacter pylori* infection downregulates nuclear and mitochondrial DNA repair in gastric cells. **Clin Cancer Res**, 15: 2995-3002, 2009.

Machado, J. C.; Figueiredo, C.; Canedo, P.; et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. **Gastroenterol**, 125: 364-71, 2003.

Maekita, T.; Nakazawa, K.; Mihara, M.; et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res**, 12(13 Pt 1): 989-995, 2006.

Mansour, K. B.; Fendri, C.; Zribi, M.; Masmoudi, A.; Labbene, M.; Fillali, A.; Mami, N. B.; Najjar, T.; Meherzi, A.; Sfar, T.; Burucoa, C. Prevalence of *Helicobacter pylori* *VacA*, *CagA*, *iceA* and *oipA* genotypes in Tunisian patients. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 9(22): 1-7, 2010.

Marshall, B. The discovery that *Helicobacter pylori*, a spiral bacterium, caused peptic ulcer disease. **Helicobacter Pioneers**, 165-202, 1983.

Marx, A. H.; Tharun, L.; Muth, J.; et al. HER-2 amplification is highly homogeneous in gastric cancer. **Hum Pathol**, 40(6): 769-77, 2009.

Meza-Junco, J.; Au, H.-J.; Sawyer, M.B. Critical appraisal of trastuzumab in treatment of advanced stomach cancer. **Canc Manag Res**, 3: 57-64, 2011.

Michiels, S.; Laplanche, A.; Boulet, T.; Dessen, P.; Guillonneau, B.; Mejlan, A.; Desgrandchamps, F.; Lathrop, M.; Sarasin, A.; Benhamou, S. Genetic polymorphisms in 85 DNA repair genes and bladder cancer risk. **Carcinogenesis**, 30(5):763- 766, 2009.

Miehlke, S.; Yu, J.; Schupler, M.; Frings, C.; Kersh, C.; Negraszus, N.; Morgner, A.; Stolte, M.; Ehninger, G.; Bayerdorffer, E. *Helicobacter pylori* VacA, iceA e CagA status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. **Am J Gastroenterol**, 96:1008- 1013, 2001.

Mimuro, H.; Suzuki, T.; Tanaka, J.; Asahi, M.; Haas, R., Sasakawa, C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. **Mol Cell**, 10(4): 745-55, 2002.

Mitchell, H. M. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Curr Top Microbiol Immunol**, 241:11-30, 1999.

Morelli, G.; Didelot, X.; Kuseck, B.; Schwarz, S.; Bahlawane, C.; Falush, D.; Suerbaum, S.; Atchman, M. Microevolution of *Helicobacter pylori* during Prolonged Infection of Single Hosts and within Families. **PLoS Genet**, 6(7):e2001036, 2010.

Nagy, T. A.; Frey, M. R.; Yan, F.; Israel, D. A.; Polk, D. B.; Peek, R. M. Jr. *Helicobacter pylori* regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. **J Infect Dis**, 199(5): 641-51, 2009.

Naito, Y.; Yoshikawa, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 33(3):323-36, 2002.

Nakamura, T.; Ishikawa, S.; Koga, Y. ;Nagai, Y.; Imamura, Y.; Ikeda, K.; Mori, T.; Nomori, H.; Baba, H. Mutation analysis of *RAD18* in human cancer cell lines and non-small cell lung cancer tissues. **J Exp Cli Canc Res**, 28:106, 2009.

Nardone, G.; Compare, D.; De Colibus, P.; Nucci, G.; Rocco, A. *Helicobacter pylori* and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis. **Dig Dis**, 25(3): 225-29, 2007.

Pandey, R.; Misra, V.; Misra, S. P.; Dwivedi, M.; Kumar, A.; Tiwari, B. K. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer. **Asian Pacific J Cancer Prev**, 11: 583-8, 2010.

Peek Jr, R. M.; Crabtree, J. E. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. **J Pathol**, 208(2): 233-48, 2006

Peek, R. M.; Thompson, S. A.; Donahue, J. P.; Tham, K. T.; Atherton, J. C.; Blaser, M. J.; Miller, G. G. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. **Proc Assoc Am Phys**, 110:531-44, 1998.

Pharoah, P. D.; Dunning, A. M.; Ponder, B. A.; Easton, D. F. Association studies for finding cancer- susceptibility genetic variants. **Nature Rev Cancer**, 4: 850-860, 2004.

Phoa, N.; Epe, B. Influence of nitric oxide on the generation and repair of oxidative DNA damage in mammalian cells. **Carcinogenesis**, 23: 469-75, 2002.

Polk, D.B.; Peek Jr, R.M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nat Rev Cancer**, 10(6): 403-14, 2010.

Queiroz, D. M.; Mendes, E. N.; Rocha, G. A. Indicator Medium for Isolation of *Campylobacter pylori*. **Am Soc Microbiol**, 25(12): 2378-79, 1987.

Ricci, V.; Romano, M.; Boquet, P. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. **WJG**, 17(11): 1383-99, 2011

Robbins e Cotran. Patologia: **Bases patológicas das doenças**. 8ª edição, 17:782-798, 2010.

Rodrigues, M. N.; Queiroz, D. M.; Rodrigues, R. T.; Rocha, A. M.; Luz, C. R.; Braga, L. L. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Rev Saúde Pública**, 39:847- 849, 2005.

Roos, W. P.; Nikolova, T.; Quiros, S.; Naumann, S. C.; Kiedron, O.; Zdzienicka, M. Z.; Kain, B. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O⁶-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. **DNA Repair**, 8: 72-86, 2009.

Salama, N.; Guillemin, K.; McDaniel, T. K.; et al. A whole genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. **Proc Natl Acad Sci USA**, 19(97):14668- 14673, 2000.

Schmidt, N.; Peitz, U.; Lippert, H.; et al. Missing gastric cancer in dyspepsia. **Aliment Pharmacol Ther**, 21: 813-20, 2005.

Sepulveda, A. R.; Yao, Y.; Yan, W.; Park, D. I.; Kim, J. J.; Gooding, W.; Abudayeh, S.; Graham, D. Y. CpG methylation and reduced expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase is associated with *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterol**, (3815): 1836-44, 2010.

Sewald, X.; et al. Integrin subunit CD18 is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. **Cell Host Microbe**, 3: 20-29, 2008.

Suerbaum, S.; Josenhans, C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotype diversification in a changing host. **Nat Rev Microbiol**, 5:441- 452, 2007.

Sundrud, M. S.; Torres, V. J.; Unutmaz, D.; Cover, T. L. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101: 7727-32, 2004.

Tabassam, F. H.; Graham, D. Y.; Yamaoka, Y. *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent AKT and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. **Cell Microbiol**, 11(1): 70-82, 2009.

Takahashi, H.; Murai, Y.; Tsuneyama, K.; et al. Overexpression of phosphorylated histone H3 is indicator of poor prognosis in gastric adenocarcinoma patients. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, 14(3): 296-302, 2006.

Talarico, S.; Gold, B. D.; Fero, J.; Thompson, D. T.; Guarner, J.; et al. Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. **J Clin Microbiol In Press**, 47(6): 1680-8, 2009.

Tombola, F.; Morbiato, L.; Del, Guidice, G.; Rappuoli, R.; Zonatti, M.; Papini, E. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease diffusion across epithelia. **J Clin Invest**, 108:929- 937, 2001.

Toller, I. M.; Neelsen, K. J.; Steger, M.; Hartung, M. S.; Hottiger, M. O.; Stucki, M.; Kalali, B.; Gerhard, M.; Sartori, A. A.; Lopes, M.; Müller, A. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. **PNAS**, 108(36): 14944-49, 2011.

Touati, E. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: Lessons from *Helicobacter pylori*. **Mutation Res Gent Toxicol Environ Mutagen**, 10.1016, 2010.

Vinagre, R. M. D. F.; Corvelo, T. C. O.; Arnaud, V. C.; Leite, A. C. K.; Barile, K. A. S.; Martins, L. C. Determination of Strains of *Helicobacter pylori* and of Polimorphism in the Interleukin-8 Gene in Patients with Stomach Cancer. **Arq Gastroenterol**, 48(1): 46-51, 2011.

Wen, S.; Moss, S. F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, 282: 1- 8, 2009.

Wong, B. C.; et al. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. **JAMA**, 291: 187-94, 2004.

Wu, W.; Liu, H.; Lei, R.; Chen, D.; Zhang, S.; Lv, J.; Wang, Y.; Fan, W.; Qian, J.; Jin, G.; Ma, H.; Wei, Q.; Shen, H.; Huang, W.; Lu, D. genetic variants in *GTF2H1* and risk of lung cancer: a case- control analysis in a Chinese population. **Lung Cancer**, 63(2):180-186, 2009.

Yamaoka, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 7(11): 629-41, 2010.

Zarrilli, R.; Ricci, V.; Romano, M. Molecular response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*- induced cell damage. **Cell Microbiol**, 1: 93-99, 1999.

Zaterka, S.; Eisig, J. N.; Chinzon, D.; Rothstein, W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter**, 2(1): 2-8, 2007.

8. ANEXOS

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DECORRENTES DA INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori* NA GÊNESE DO CÂNCER GÁSTRICO

Responsável: Marcelo Lima Ribeiro

O abaixo-assinado (nome, idade, RG, endereço) declara que é de livre e espontânea vontade que está participando do projeto de pesquisa supra-citado. O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é estudar a associação entre a infecção por *Helicobacter pylori* e o desenvolvimento do câncer gástrico.

ii - Será submetido aos seguintes exames laboratoriais: teste rápido da urease para a detecção do *H. pylori*, bem como a endoscopia digestiva alta.

iii - Está livre para interromper a participação no ensaio clínico a qualquer momento, sem que isto lhe acarrete prejuízo ao seu atendimento.

iv - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e o HUSF não identificará o paciente por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

v - Poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico (fone 4034-8442).

vi - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

vii - Poderá contatar o responsável pelo estudo, sempre que necessário pelo telefone 4034-8134

xi - Este Termo de consentimento é feito em duas vias sendo que uma permanecerá em meu poder e as outras com o pesquisador responsável

Bragança Paulista, de de 20

Nome do Voluntário

Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Anexo II

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Instituto Paulista, 05 de Março de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: **ESTUDO DE INIÇÃO POR HELICOBACTER PYLODI NO PADRÃO DE MOTIVADO E NÃO VITAS DE SINTOMAS DE ESTÔMAGO NO USA.**

Curso: **MEDICINA**
Grupo: **III**

Autor(es) **MARCELO LIMA STELLIO**

Instituição: **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**

Protocolo **CAME:0007.0.142.000-05** (utilizar este número nas correspondências referentes a este projeto)

Exatidão: () Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, realizou em reunião extraordinária de dia **19/02/2009** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de **Yoga Senkovic**.

Este Comitê, entendendo o parecer do parecerista indicado, manifesta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: **APROVADO**

Respeitosamente,


JOSE PEDRAZZOLI JUNIOR
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP
Universidade São Francisco

Anexo III

Genes escolhidos para validação em humanos:

Genes	Grupos				
	Criança Hp-	Criança Hp+	Adulto Hp+ CagA+	Adulto Hp+ CagA-	Adulto Hp-
<i>FEN1</i>	1,02 ± 0,68	1,44 ± 0,59	3,21 ± 0,85	3,60 ± 0,79	2,38 ± 0,39
<i>LIG1</i>	1,21 ± 0,36	1,68 ± 0,85	0,53 ± 0,16	0,95 ± 0,52	0,72 ± 0,39
<i>PMS1</i>	1,34 ± 0,51	2,63 ± 1,09	0,23 ± 0,09	0,34 ± 0,08	0,26 ± 0,05
<i>SMC1A</i>	4,05 ± 2,41	7,91 ± 2,85	1,76 ± 0,85	2,00 ± 0,89	2,75 ± 1,63
<i>MPG</i>	3,27 ± 1,55	4,06 ± 2,18	2,66 ± 0,97	3,27 ± 1,54	2,83 ± 0,90
<i>CHK1</i>	2,99 ± 0,82	2,01 ± 0,80	2,35 ± 0,59	3,45 ± 0,73	2,57 ± 1,37
<i>CHK2</i>	1,66 ± 0,62	1,53 ± 0,77	1,90 ± 0,85	2,07 ± 0,36	1,85 ± 0,79
<i>GADD45A</i>	6,29 ± 1,97	3,62 ± 1,77	5,67 ± 1,83	7,96 ± 2,92	11,32 ± 3,13
<i>GADD45G</i>	3,49 ± 2,3	4,99 ± 2,74	0,50 ± 0,43	0,73 ± 0,63	0,44 ± 0,14
<i>PPP15A</i>	15,49 ± 3,38	23,00 ± 8,06	8,17 ± 4,35	7,56 ± 1,57	10,40 ± 6,76
<i>FANCG</i>	3,31 ± 1,00	3,60 ± 1,14	2,37 ± 1,61	2,51 ± 0,52	2,32 ± 1,03
<i>SMC1A</i>	5,24 ± 3,84	7,91 ± 2,85	1,76 ± 0,85	2,00 ± 0,89	2,75 ± 1,63
<i>ERCC1</i>	4,24 ± 1,74	4,66 ± 2,63	0,41 ± 0,11	0,63 ± 0,18	0,60 ± 0,15
<i>GTF2H1</i>	0,81 ± 0,31	1,00 ± 0,33	3,52 ± 1,09	4,58 ± 0,86	4,15 ± 0,98
<i>PCNA</i>	1,99 ± 0,54	1,56 ± 0,41	1,69 ± 0,43	2,47 ± 0,46	2,09 ± 0,71
<i>RAD21</i>	4,12 ± 1,83	4,44 ± 0,87	1,59 ± 0,50	2,63 ± 0,53	3,09 ± 1,51
<i>XRCC2</i>	0,77 ± 0,72	1,29 ± 0,83	1,77 ± 0,35	2,62 ± 0,93	5,41 ± 2,71
<i>PI3K</i>	4,66 ± 1,11	4,60 ± 1,32	4,13 ± 0,86	5,15 ± 1,53	6,34 ± 2,68
<i>RAD18</i>	3,44 ± 2,69	25,21 ± 8,40	2,73 ± 0,60	2,77 ± 0,37	2,20 ± 0,62
<i>Ku86</i>	34,99 ± 2,26	59,83 ± 11,10	48,89 ± 18,09	48,96 ± 6,47	49,91 ± 5,26

Anexo IV

Resultados dos arrays das co-culturas:

Gene	Co-Cultura 24h	Co-Cultura 48h
<i>ABL1</i>	1,2797	1,1678
<i>ANKRD17</i>	-1,3416	-1,3159
<i>APEX1</i>	-1,3188	-1,7547
<i>ATM</i>	1,8997	1,884
<i>ATR</i>	-1,9124	-1,4922
<i>ATRX</i>	2,6677	1,8578
<i>BRCA1</i>	-1,2335	-1,8722
<i>BTG2</i>	2,9878	4,9147
<i>CCNH</i>	-1,8191	-1,5002
<i>CDK7</i>	-1,3332	-1,0048
<i>CHEK1</i>	-2,0476	-2,0504
<i>CHEK2</i>	-1,4834	-2,0152
<i>CIB1</i>	2,2661	1,4522
<i>CIDEA</i>	-1,5226	-1,0129
<i>CRY1</i>	-1,2187	-1,7139
<i>DDB1</i>	-1,2655	-1,5494
<i>DDIT3</i>	8,0211	20,4184
<i>DMC1</i>	7,7495	11,6487
<i>ERCC1</i>	5,5674	4,5473
<i>ERCC2</i>	1,0307	-1,4225
<i>EXO1</i>	-1,9247	-2,4736
<i>FANCG</i>	-1,5444	-2,0835
<i>FEN1</i>	-2,1075	-3,1329
<i>XRCC6</i>	-1,2176	-1,7243
<i>GADD45A</i>	7,7291	47,7788
<i>GADD45G</i>	5,7263	12,6022
<i>GML</i>	7,5094	11,3664
<i>GTF2H1</i>	2,3406	2,685
<i>GTF2H2</i>	-1,0041	1,1424
<i>GTSE1</i>	7,9387	14,0929
<i>HUS1</i>	-1,9409	1,2069
<i>IGHMBP2</i>	-1,1525	1,1918
<i>IP6K3</i>	1,4905	1,964
<i>XRCC6BP1</i>	1,9598	1,0933
<i>LIG1</i>	1,2209	-3,0823
<i>MAP2K6</i>	2,3802	2,0267
<i>MAPK12</i>	2,3492	2,0565
<i>MBD4</i>	1,0456	-1,0627
<i>MLH1</i>	-2911,0018	1,0873
<i>MLH3</i>	1,3969	1,6135

<i>MNAT1</i>	-1,1497	-1,0304
<i>MPG</i>	7,8148	4,8373
<i>MRE11A</i>	2,3802	2,0267
<i>MSH2</i>	-1,2001	-1,5747
<i>MSH3</i>	-1,6566	-1,7535
<i>MUTYH</i>	1,2118	1,0608
<i>N4BP2</i>	1,4556	1,5153
<i>NBN</i>	-1,1408	-1,1663
<i>NTHL1</i>	5,1241	4,2143
<i>OGG1</i>	1,3064	-1,1699
<i>PCBP4</i>	8,515	11,298
<i>PCNA</i>	-1,6881	-3,9106
<i>AIFM1</i>	1,0405	-1,6411
<i>PMS1</i>	-2,5555	-1,5753
<i>PMS2</i>	1,1878	1,9674
<i>PMS2L3</i>	1,0854	1,353
<i>PNKP</i>	2,0849	1,2816
<i>PPP1R15A</i>	7,4477	15,8323
<i>PRKDC</i>	1,8516	1,7861
<i>RAD1</i>	-1,8105	-1,7757
<i>RAD17</i>	1,0965	1,5167
<i>RAD18</i>	-2,001	-2,3338
<i>RAD21</i>	-1,5859	-2,5268
<i>RAD50</i>	1,8983	1,6849
<i>RAD51</i>	3,5828	4,2548
<i>RAD51L1</i>	1,1167	1,0333
<i>RAD9A</i>	1,7405	1,1467
<i>RBBP8</i>	-1,9413	-1,669
<i>REV1</i>	1,0904	1,2595
<i>RPA1</i>	-1,3794	-1,9945
<i>SEMA4A</i>	6,4134	2,6192
<i>SESN1</i>	1,5059	1,2822
<i>SMC1A</i>	-1,9763	-3,5181
<i>SUMO1</i>	-1,3688	-1,735
<i>TP53</i>	2,8911	1,6241
<i>TP73</i>	1,7407	1,5451
<i>TREX1</i>	1,1251	-1,7075
<i>UNG</i>	-1,374	-1,0428
<i>XPA</i>	2,2386	2,7714
<i>XPC</i>	2,8054	2,6504
<i>XRCC1</i>	1,03	-1,6126
<i>XRCC2</i>	-3,1868	-3,3037
<i>XRCC3</i>	7,6105	10,1683
<i>ZAK</i>	-1,5828	-1,3328
<i>B2M</i>	-6,1169	-4,3014
<i>HPRT1</i>	-1,5972	-1,7381

<i>RPL13A</i>	2,1717	2,2765
<i>GAPDH</i>	3,1227	3,0755
<i>ACTB</i>	1,4406	1,0678
<i>HGDC</i>	2,3802	4,9215
<i>RTC</i>	2,3802	2,0267
<i>RTC</i>	2,3802	2,0267
<i>RTC</i>	2,3802	2,0267
<i>PPC</i>	1,0807	1,021
<i>PPC</i>	1,0253	-1,0323
<i>PPC</i>	1,0041	-1,0397

Anexo V

Expressão dos genes validados para o grupo CagA+:

Genes				
Adulto	<i>XRCC2</i>	<i>RAD18</i>	<i>Ku86</i>	<i>GTF2H1</i>
Hp+CagA+	2,91 ± 2,09	2,54 ± 0,84	4,52 ± 2,05	4,59 ± 3,18