



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Ana Flávia Teixeira Rossi

Efeito do tratamento da *H. pylori* na expressão de citocinas e microRNAs
associados ao processo inflamatório

São José do Rio Preto
2015

Ana Flávia Teixeira Rossi

Efeito do tratamento da *H. pylori* na expressão de citocinas e microRNAs
associados ao processo inflamatório

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Elizabete Silva

São José do Rio Preto
2015

Rossi, Ana Flávia Teixeira.

Efeito do tratamento da *H. pylori* na expressão de citocinas e microRNAs associados ao processo inflamatório / Ana Flávia Teixeira Rossi. -- São José do Rio Preto, 2015
107 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ana Elizabete Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Expressão gênica. 3. *Helicobacter pylori*. 4. Mucosa gástrica – Inflamação. 5. MicroRNAs. 6. Citocinas.
I. Silva, Ana Elizabete. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 575.113

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Flávia Teixeira Rossi

Efeito do tratamento da *H. pylori* na expressão de citocinas e microRNAs
associados ao processo inflamatório

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Ana Elizabete Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a Dr^a Cláudia Aparecida Rainho
UNESP – Botucatu

Dr^a Marília de Freitas Calmon Saiki
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
06 de março de 2015

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, do Departamento de Biologia, IBILCE/UNESP e no GENOA/LPCM - Laboratório de Patologia Molecular e Celular Humana, SP. O projeto foi desenvolvido com bolsa e auxílio financeiro FAPESP (Processo nº 2013/03625-1; 2012/15036-8) e auxílio financeiro CNPq (Processo nº 474.776/2013-1).

Dedico esta conquista as pessoas mais importantes da minha vida: Aos meus pais pelo amor incondicional, a minha irmã pelo apoio e amizade e ao meu noivo pelo companheirismo, compreensão e por estar sempre ao meu lado. Tenho certeza que se não fosse o apoio de vocês eu não teria alcançado mais esta vitória.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela vida e pelas oportunidades que colocou no meu caminho e que me permitiram alcançar esta conquista.

À Profa. Dra. Ana Elizabete Silva pela orientação, incentivo e dedicação desde o início da minha formação acadêmica, contribuindo para meu desenvolvimento científico e aquisição de um pensamento crítico.

À banca examinadora Prof^ª Dr^ª Cláudia Aparecida Rainho e Dra. Marília de Freitas Calmon por terem aceitado participar da análise e enriquecimento deste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Cláudia Márcia Aparecida Carareto, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), por possibilitar a realização desse trabalho.

A toda equipe de médicos e enfermeiros do Serviço de Endoscopia do Hospital de Base e do Ambulatório Médico de Especialidades pela colaboração com a coleta de amostras. Agradeço também ao Dr. Alaor Caetano e toda a sua equipe do Centro de Endoscopia Rio Preto pelo acolhimento e colaboração sempre que necessário.

Aos pacientes, pois sem eles a realização deste trabalho não seria possível.

À Prof^ª Dr^ª Kátia Ramos Moreira Leite pelo acolhimento e disponibilização do laboratório para realização da técnica de imuno-histoquímica e pela preciosa contribuição na análise de expressão protéica. Agradeço também aos técnicos do Laboratório GENOA-LPCM Robson, Leandro e Michelli pela ajuda.

À Prof^ª Dr^ª Patrícia Pintor dos Reis e Fábio Eduardo Severino pela análise de redes e disponibilidade de ajudar sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro pela inestimável contribuição nas análises estatísticas.

À Prof^ª Dr^ª Sonia Maria Oliani pela disponibilização do equipamento para captura das imagens de imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior pela realização dos corte histológicos necessários para análise imuno-histoquímica.

Ao Dr. Dalísio de Santi Neto e todos os funcionários do Laboratório de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto pela disponibilização dos blocos e colaboração.

À Dra. Maria Regina Funes Bastos e ao técnico Paulo Roberto do Laboratório CPC e ao Dr. Jorge Alberto Thomé do Laboratório IAPC pela disponibilização dos blocos e realização dos corte histológicos necessários para análise imuno-histoquímica.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana Aline, Nathália, Marcela, Ayla, Beatriz e Fernanda. Obrigada a todas pela agradável convivência, pelos momentos de descontração e por todos os conhecimentos compartilhados. Não esqueço também da Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira que foi minha primeira co-orientadora e por quem possuo grande respeito e admiração. Agradeço também a Dra. Joice Matos Biselli Périco pela disponibilidade e ajuda com as análises estatísticas e protocolos experimentais, não negando esforços para ajudar. Obrigada a todos!

Também agradeço a Nedenia, Bruna e à Profa. Dra. Maria Elisabete Jorge Amaral do Laboratório de Genômica Estrutural e Comparativa pela convivência diária e disponibilização de materiais e equipamentos sempre que necessário.

A todos os professores e alunos da pós-graduação, como também aos funcionários da Seção de Pós-Graduação que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (FAPESP processos nº2013/03625-1; 2012/15036-8 e CNPq processo nº474.776/2013-1)

Às minhas queridas amigas de faculdade Ana Beatriz, Ayla e Lara pela ajuda durante toda a faculdade e pelos momentos de distração que passamos juntas. Saibam que, com certeza, vocês foram e continuarão sendo parte importante da minha vida. Obrigada por tudo!

Às minhas avós, Olga e Aparecida, tias e tios, Cristina, Cleusa, Jaqueline, Ana Carolina, Eliezer, Heverthon, Euler e Moacir, e primos pela compreensão e incentivo. Agradeço também ao meu padrasto Carlos e meu cunhado Gianderson pela convivência e colaboração. Obrigada!

À minha irmã, Ana Carolina, pela cumplicidade e pelos momentos compartilhados. Obrigada pela colaboração com a minha educação, pela amizade, incentivo e por ter contribuído para eu me tornar a pessoa que sou hoje. Amo você!

Ao meu noivo, Nacim, que me apoiou durante todos estes anos e me ajudou a encarar a vida de um jeito diferente. Obrigada pelo amor, dedicação, carinho, incentivo e pela

convivência. Você faz parte da minha vida e teve uma imensa contribuição nesta conquista. Amo você!

Agradeço em especial aos meus pais, Regina e Gilberto, pois sem vocês eu não seria a pessoa que sou hoje. Obrigada pela educação que me deram e por todos os momentos felizes que compartilhamos. Mãe, agradeço pela convivência diária e pela compreensão durante toda os anos da minha formação. Pai, mesmo não estando mais presente hoje, me inspiro na pessoa maravilhosa que você foi e tenho certeza que estaria muito feliz e realizado com esta conquista. Não tenho palavras para descrever a importância de vocês em minha vida. Amo vocês!

Muito obrigada!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

RESUMO

Infecção persistente pela *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) promove inflamação crônica que resulta em danos na mucosa e o consequente desenvolvimento de lesões gástricas, como a gastrite crônica. Esta bactéria e seus fatores de virulência *vacA* e *cagA* influenciam na resposta imune do hospedeiro, desregulando a expressão de mediadores inflamatórios e microRNAs (miRNAs), assim ativando vias relacionadas ao processo carcinogênico. Portanto, a erradicação da *H. pylori* pode ter um papel importante para reverter lesões precursoras, prevenindo a transformação maligna. O presente estudo avaliou a influência da terapia de erradicação da bactéria na expressão do RNAm e da proteína de mediadores inflamatórios (*TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* e *TGFBRII*) e de miRNAs (hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-375 e miR-223-3p) em pacientes com gastrite crônica *H. pylori* positivos (Hp+), em comparação com pacientes com gastrite não infectados (Hp-). Também avaliou a relação entre os níveis de expressão dos miRNAs e os dos RNAm e proteínas e a participação em redes de interação, assim como a influência dos fatores de virulência bacteriano *cagA* e *vacA* sobre estes mediadores. A quantificação relativa (RQ) do RNAm e dos miRNAs foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) usando ensaio TaqMan® em 20 pacientes Hp- e 31 Hp+, os quais foram também avaliados três meses após o tratamento de erradicação da bactéria. A genotipagem de *cagA* e *vacA* foi realizada pela técnica de PCR, enquanto que a expressão protéica foi avaliada por imuno-histoquímica. Pacientes Hp+ apresentaram níveis aumentados do RNAm de *TNFA*, *IL6*, *IL1B* e *IL12A*, enquanto que *IL2* e *TGFBRII* bem como os miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370 e miR-375 mostraram expressão reduzida. Após o tratamento, o RNAm de *TNFA* e *IL6* apresentou-se significativamente reduzido e de *TGFBRII* aumentado em pacientes erradicados ($p < 0,05$). Por outro lado, a expressão de todos os miRNAs, com exceção de miR-223, aumentou após a erradicação da bactéria ($p < 0,05$). De modo geral, os pacientes Hp- apresentaram expressão reduzida tanto para os RNAm quanto para os miRNAs avaliados em relação a pacientes Hp+ antes do tratamento. As proteínas avaliadas apresentaram imunomarcagem no epitélio e células inflamatórias no grupo Hp+ antes do tratamento, exceto IL-6 que mostrou imunomarcagem predominantemente estromal. Após a erradicação da bactéria, apenas a expressão das proteínas IL-2 e TGF- β -RII foi significativamente reduzida nas células epiteliais, mas não em células inflamatórias. No grupo de pacientes Hp+ antes do tratamento foram observadas correlações negativas entre a expressão do RNAm de *TNFA* com miR-103 ($r = -0.46$; $p = 0.016$), miR-181c ($r = -0.39$; $p = 0.042$) e miR-370 ($r = -0.67$; $p < 0.001$), e a expressão das

proteínas TGF- β -RII e IL-12-p40 foi inversamente relacionada a do miR-103 ($p=0.018$) e do miR-370 ($p=0.017$), respectivamente. Também foi observado que os miRNAs e genes avaliados participam de redes de interação da cascata inflamatória. Os genótipos *cagA* e *vacA* não foram associados com a taxa de erradicação e nem com os níveis de expressão gênica, mas a expressão do miR-181c foi maior em indivíduos portadores de cepas *vacA s1m1* comparado a outras cepas de *vacA*. Em conclusão, nossos resultados mostram desregulação na expressão de mediadores inflamatórios e miRNAs como uma consequência da infecção pela *H. pylori* e mudanças nestes padrões após a erradicação da bactéria para a maioria dos genes e miRNAs avaliados, indicando que a terapia de erradicação favorece a normalização da expressão gênica e protéica na mucosa gástrica, potencialmente controlada por miRNAs.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*. Gastrite crônica. Inflamação. microRNAs. Citocinas. Terapia de erradicação

ABSTRACT

Persistent infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) promotes chronic inflammation resulting in damage to the mucosa and the consequent development of gastric lesions as chronic gastritis. This bacterium and its virulence factors *vacA* and *cagA* influence the host immune response, deregulating the expression of inflammatory mediators and microRNAs (miRNAs), and activate pathways related to carcinogenic process. Thus, *H. pylori* eradication may have a key role to reverse precursor lesions, preventing malignant transformation. In the present study evaluated whether the eradication therapy of bacterium influences the mRNA and protein expression of inflammatory mediators (*TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* and *TGFBR1I*) and miRNAs (hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-375 and miR-223-3p) in *H. pylori*-positive chronic gastritis patients (Hp+) and compared with non-infected gastritis patients (Hp-). We also evaluated the relationship between the expression levels of miRNAs with of mRNA and protein and participation in interaction networks, as well as the influence of bacterial virulence factors *cagA* and *vacA* on these mediators. Relative quantification (RQ) of mRNA and miRNAs was performed by qPCR-real time using TaqMan® assay in 20 patients Hp- and 31 Hp+, which were also evaluated three months after eradication treatment of the bacterium. Genotyping of *cagA* and *vacA* was performed by PCR, while the protein expression was assessed by immunohistochemistry. Hp+ patients showed increased mRNA levels for *TNFA*, *IL6*, *IL1B* and *IL12A*, while for *IL2* and *TGFBR1I* as well as for the miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370 and miR-375 it were decreased. After treatment, only *TNFA* and *IL6* mRNA were significantly reduced and *TGFBR1I* increased in eradicated patients ($p < 0.05$). On the other hand, all miRNAs, except to miR-223, were significantly increased after bacterium eradication ($p < 0.05$). In general, the Hp- patients showed low expression levels for both mRNA and miRNA evaluated in relation to Hp+ patients before treatment. The proteins evaluated showed immunostaining in the epithelium and inflammatory cells in the Hp+ group before treatment, except IL-6 that presented mainly stromal immunostaining. After bacterium eradication, only IL-2 and TGF- β -R1I had significantly reduced protein expression in the epithelial cells, but not in inflammatory cells. In the group of patients Hp+ before treatment, negative correlations were observed between *TNFA* mRNA expression and miR-103 ($r = -0.46$; $p = 0.016$), miR-181c ($r = -0.39$; $p = 0.042$) and miR-370 ($r = -0.67$; $p < 0.001$) and the expression of proteins TGF- β -R1I and IL-12-p40 were inversely related to miR-103 ($p = 0.018$) and miR-370 ($p = 0.017$), respectively. It was also observed that miRNAs and genes evaluated participate of the

inflammatory cascade interaction networks. *cagA* and *vacA* genotypes were not associated with eradication rate nor the gene expression levels, but higher expression of miR-181c was observed in individuals carriers of *vacA s1m1* of *vacA* in relation to others strains. In conclusion, our results show deregulation in the expression of the important inflammatory mediators and miRNAs as a consequence to *H. pylori* infection and changes of these patterns after bacterium eradication for the majority of genes and miRNAs evaluated, indicating that eradication therapy favors the normalization of gene and protein expression of gastric mucosa, potentially addressed by control of miRNAs.

Key-words: *Helicobacter pylori*. Chronic gastritis. Inflammation. microRNAs. Cytokines. Eradication therapy

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>ACTB</i>	do inglês <i>Actin beta</i>
Ago 2	do inglês <i>argonaute RISC catalytic component 2</i>
AG	do inglês <i>atrophic gastritis</i>
AP-1	do inglês <i>Activator protein 1</i>
BabA	do inglês <i>blood group antigen-binding adhesion</i>
<i>BCL2</i>	do inglês <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
bp	do inglês <i>base pairs</i>
cDNA	DNA complementar
c-fos	do inglês <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
c-jun	do inglês <i>jun proto-oncogene</i>
<i>cagA</i>	do inglês <i>cytotoxin-associated gene</i>
CagA	Citotoxina A
<i>cagPAI</i>	do inglês <i>cag Pathogenicity Island</i>
Células T _h	células T helper
Células Tregs	células T regulatórias
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	do inglês <i>chronic gastritis</i>
COX-2	do inglês <i>Cyclooxygenase-2</i>
<i>CYP2C19</i>	do inglês <i>cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19</i>
DAB	do inglês <i>3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	do inglês <i>desoxirribonucleic acid</i>
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<i>ERBB2</i>	do inglês <i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
DTTP	desoxitimidina trifosfato
ERK/MAP	do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein kinase</i>
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
et al	e outros, do latim <i>et alii</i>
FOXP3	do inglês <i>forkhead box P3</i>

<i>FoxM1</i>	do inglês forkhead box M1
<i>GAPDH</i>	do inglês <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
<i>hBD2</i>	do inglês defensin, beta 2
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hp+	<i>H. pylori</i> positivo
Hp-	<i>H. pylori</i> negativo
HRP	do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Câncer</i>)
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons
ICAM-1	do inglês <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
<i>INFG</i>	do inglês <i>interferon, gamma</i>
IFN- γ	Interferon- γ
<i>IL1B</i>	do inglês <i>interleukin 1, beta</i>
IL-1 β	Interleucina-1 Beta
IL-1R1	Receptor Tipo I da Interleucina-1
<i>IL2</i>	do inglês <i>interleukin 2</i>
IL-2	Interleucina-2
IL-2R	Receptor da Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
<i>IL6</i>	do inglês <i>interleukin 6</i>
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
<i>IL10</i>	do inglês <i>interleukin 10</i>
IL-10	Interleucina-10
<i>IL12A</i>	do inglês <i>interleukin 12A</i>
<i>IL12B</i>	do inglês <i>interleukin 12B</i>
IL-12-p40	Subunidade p40 da Interleucina-12
<i>JAK2</i>	do inglês <i>Janus kinase 2</i>
<i>KRAS</i>	do inglês <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Log ₂	Logaritmo na base 2
M	molar
MAG	do inglês <i>metaplastic atrophic gastritis</i>

MDR1	do inglês <i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>
mirDIP	do inglês <i>microRNA Data Integration Portal</i>
miRNAs	microRNAs
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mM	milimolar
mRNA	do inglês <i>messenger RNA</i>
N	Número Amostral
NF-κB	do inglês <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
ng	nanograma (unidade de massa: 10 ⁻⁹ grama)
NK	Células Natural Killer
NM	do inglês <i>normal mucosa</i>
NOTCH4	do inglês <i>notch 4</i>
OipA	do inglês <i>outer inflammatory protein</i>
p	Probabilidade
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	do inglês <i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PLA2	do inglês <i>phospholipase A2</i>
PMN	células polimorfonucleares
Pré-miRNAs	microRNA precursor
Pri-miRNAs	microRNA primário
qPCR	do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
r	Coefficiente de Correlação
Ras/MEK/ERK	do inglês <i>Rãs/Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase/extracellular-signal-regulated kinase cascade</i>
Ran-GTP	do inglês <i>ras-related nuclear protein – Guanosine-5'-triphosphate</i>
RISC	do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
rRNA	do inglês <i>ribosomal RNA</i>
RNA pol II	RNA polimerase II
RQ	do inglês <i>relative quantification</i>

RT	do inglês <i>Reverse transcriptase</i>
SabA	do inglês <i>sialic acid-binding adhesion</i>
T4SS	do inglês <i>type- IV secretion system</i>
<i>Taq</i>	do inglês <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TGF-β	do inglês <i>transforming growth factor beta 1</i>
<i>TGFBRII</i>	do inglês <i>transforming growth factor, beta receptor II</i>
TGF-β-RII	Receptor tipo II do Fator de crescimento Transformante Beta
Tip-α	do inglês <i>TNF-α-inducing protein</i>
<i>TNFA</i>	do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRBP	do inglês <i>TAR RNA binding protein</i>
<i>tsaA</i>	do inglês <i>alkyl hydroperoxide reductase subunit C</i>
U	Unidade
<i>ureA</i>	do inglês <i>urease subunit alpha</i>
<i>vacA</i>	do inglês <i>vacuolating cytotoxin</i>
VacA	Citotoxina vacuolizante
VCAM-1	do inglês <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
Δ	Delta
®	marca registrada
°C	graus Celsius (medida de temperatura)
μL	microlitro (unidade de volume: 10 ⁻⁶ litro)
μM	micromolar
3'-UTR	do inglês <i>3' untranslated</i>
14-3-3-zeta	do inglês <i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Inflamação e câncer gástrico.....	18
1.2	<i>Helicobacter pylori</i> , fatores de virulência e resposta imune.....	19
1.3	Tratamento de erradicação da <i>H. pylori</i>	23
1.4	Citocinas e receptores envolvidos na inflamação e carcinogênese.....	25
1.5	MicroRNAs, infecção pela <i>H. pylori</i> e carcinogênese.....	27
2	OBJETIVOS.....	33
3	ARTIGO.....	34
4	DISCUSSÃO.....	78
5	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação e câncer gástrico

A inflamação crônica caracteriza-se pela permanência de células do sistema imune no tecido lesionado, sendo decorrente de resposta inflamatória não resolvida corretamente (KUNDU; SURH, 2012). Esta resposta persistente resulta na produção de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) que induzem alterações genéticas e epigenéticas no genoma (CHIBA; MARUSAWA; USHIJIMA, 2012), além de causar danos tissulares crônicos que desencadeiam uma resposta de reparo pelo estímulo de fatores de crescimento, sobrevivência e citocinas regulatórias (LEE; HWANG; NAM, 2014) favorecendo o surgimento de diversos tipos de cânceres (CHIBA; MARUSAWA; USHIJIMA, 2012) No microambiente tumoral, a ocorrência de células e mediadores inflamatórios propicia a transformação celular e a progressão de doenças invasivas (BALKWILL; MANTOVANI, 2012; LEE; HWANG; NAM, 2014).

Agentes infecciosos causadores de inflamação crônica estão associados à cerca de 10-15% dos cânceres (CHIBA; MARUSAWA; USHIJIMA, 2012) e aproximadamente 75% dos casos de câncer gástrico são atribuídos a infecção pela *Helicobacter pylori* (DE MARTEL et al., 2012). Em comparação com outros patógenos Gram-negativos, esta bactéria possui grande habilidade para persistir no ambiente inóspito do estômago e estabelecer infecção crônica (SALAMA et al., 2013), levando a inflamação persistente, instabilidade genética (GRAHAM, 2015), aumento no crescimento e na mobilidade celular, angiogênese e inibição da apoptose, contribuindo, assim, para a carcinogênese gástrica (AMIEVA; EL-OMAR, 2008; CHIBA; MARUSAWA; USHIJIMA, 2012).

O câncer gástrico continua como uma das doenças mais relevantes da atualidade, pois é a quinta neoplasia mais comum e a terceira causa de morte relacionada ao câncer em ambos os sexos mundialmente (McLEAN; EL-OMAR, 2014). Segundo o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa no Brasil para 2014 foi de 20.390 casos novos, dos quais 12.870 em homens e 7.520 em mulheres (INCA, 2014). A alta incidência é preocupante, pois os sintomas aparecem tarde no desenvolvimento da doença e, com isto, o prognóstico é pobre e as opções terapêuticas curativas escassas com taxa de sobrevivência dos pacientes após cirurgia e terapia menor que 40% (JANG; KIM, 2011; McLEAN; EL-OMAR, 2014). A neoplasia de estômago é um tumor sólido que ocorre como resultado de uma complexa combinação de fatores genéticos e ambientais (McLEAN; EL-OMAR, 2014). Além da infecção pela *H. pylori*, destacam-se outros fatores ambientais como o consumo elevado de sal e nitratos, alimentos defumados, fumo e álcool (SMITH et al., 2006; HERRERA; PARSONNET, 2009;

RESENDE et al., 2011). Com relação aos fatores genéticos, diversas alterações em oncogenes, genes supressores tumorais, genes de reparo do DNA, reguladores do ciclo celular, genes que codificam moléculas de adesão, além de polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-8, estão relacionados à carcinogênese gástrica (SMITH et al., 2006; ZHAO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

O adenocarcinoma gástrico compreende a maioria das neoplasias malignas de estômago (McLEAN; EL-OMAR, 2014) e, segundo Lauren (1964), pode ser dividido em dois tipos histológicos distintos: intestinal e difuso. Estes subtipos apresentam perfis moleculares e vias de desenvolvimento distintos (McLEAN; EL-OMAR, 2014). O tipo difuso é pouco diferenciado e surge a partir da mucosa gástrica normal não apresentando nenhum estágio pré-maligno definitivo e pode ser associado com a presença da *H. pylori* (BARBER et al., 2008). O tipo intestinal surge a partir de mudanças gástricas pré-cancerosas, como gastrite atrófica que progride para metaplasia intestinal, displasia e, por fim, carcinoma, sendo estes estágios iniciados pela inflamação crônica induzida pela *H. pylori* (CORREA, 1995). A gastrite crônica engloba desde inflamação superficial até atrofia do epitélio, sendo caracterizada pela presença de linfócitos e plasmócitos (CHELI; GIACOSA, 1983). Juntamente com a gastrite ou durante a cicatrização da mucosa é observada a metaplasia intestinal definida como a transformação das células do epitélio gástrico em células colunares absorptivas que se intercalam com células caliciformes de morfologias intestinais, sendo também associada com infecção pela *H. pylori* (GUTIERREZ-GONZALEZ; WRIGHT, 2008).

1.2 *Helicobacter pylori*, fatores de virulência e resposta imune

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa, microaerófila, de formato espiral (SMITH et al., 2006) com alto grau de especialização (KALALI et al., 2014) e que cresce na camada de muco que reveste o epitélio gástrico (ZHOU et al., 2014). A prevalência da *H. pylori* varia com a região geográfica, idade, condição sócio-econômica, nível educacional e ocupação, sendo que 80% dos adultos são infectados nos países em desenvolvimento (WANG et al., 2014). Mundialmente, esta bactéria infecta mais da metade da população (PARK et al., 2013) induzindo gastrite em todos os pacientes infectados, embora apenas 10-15% deles apresentem sintomas clínicos (POSSELT et al., 2013). A gastrite pode progredir para mudanças atróficas severas em aproximadamente 10% dos indivíduos, e até 5% dos pacientes com gastrite atrófica podem desenvolver câncer gástrico do tipo intestinal (VARIS et al., 2000). No entanto, cerca de 75% dos casos de câncer gástrico (DE MARTEL et al., 2012) e 90 % de gastrite crônica e metaplasia intestinal são positivos para esta bactéria (SCHOLTE et al., 2002; AKÇAM, 2010), o que levou a Agência Internacional para a investigação sobre o

câncer (IARC) a classifica-la como um carcinógeno classe I em 1994 e reafirmar esta classificação em 2009 (IARC, 2012). As razões para estas diferenças observadas não são totalmente compreendidas, mas sabe-se que a combinação de fatores ambientais, do hospedeiro e da bactéria determina a severidade do resultado da infecção pela *H. pylori* (KALALI et al., 2014).

A *H. pylori* apresenta inúmeras estratégias para colonizar o estômago humano (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004). Dentre elas, a enzima urease hidrolisa uréia em amônia e gás carbônico neutralizando o pH e, com isto, permite a sobrevivência e proliferação da bactéria no ambiente ácido do estômago (HATAKEYAMA, 2009). Outras estratégias incluem os fatores de virulência que podem ser secretados, associados à membrana ou translocados para dentro da célula do hospedeiro, onde interferem diretamente na sua função (POSSELT et al., 2013). Estes fatores de virulência podem desregular vias de sinalização intracelular do hospedeiro e estimular células da imunidade inata, o que reduz o limiar para transformação neoplásica (WANG et al., 2014; KALALI et al., 2014). Dentre eles, as proteínas de membrana externa são responsáveis pela forte interação da *H. pylori* com as células gástricas epiteliais e incluem os fatores BabA, OipA e SabA (POSSELT et al., 2013). Os principais fatores de virulência relacionados à patogenicidade desta bactéria são o CagA e o VacA (WANG et al., 2014). As populações de *H. pylori* são altamente heterogêneas com relação a estes fatores de virulência (WEN; MOSS, 2009) e evidências indicam que estas diferenças genéticas influenciam nos resultados clínicos da infecção pela bactéria (BAUER; MEYER, 2011), embora todas as cepas possam causar inflamação gástrica (GRAHAM, 2015).

O gene *cagA* (*cytotoxin-associated gene*) produz um dos fatores de virulência mais importantes desta bactéria, estando localizado em um segmento de DNA denominado ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*) que contém, além do *cagA*, genes que vão originar o sistema de secreção bacteriano tipo IV (T4SS – *type-IV secretion system*) (CENSINI et al. 1996). Este sistema funciona como uma seringa molecular, injetando CagA, lipoproteínas e outros produtos bacterianos dentro da célula epitelial gástrica (BACKERT et al., 2000). Esta oncoproteína exerce diversos efeitos de maneira dependente ou independente de fosforilação, interagindo com várias proteínas do hospedeiro de modo a ativar vias de sinalização, como Ras/MEK/ERK, NF- κ B e β -catenina (WANG et al., 2014). Esta interação resulta em rearranjo do citoesqueleto, rompimento da polaridade celular, além de provocar respostas mitogênicas e pró-inflamatórias (POLK; PEEK, 2010). A presença de CagA induz, também, a secreção de IL-8 pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (KEATES et al, 1999),

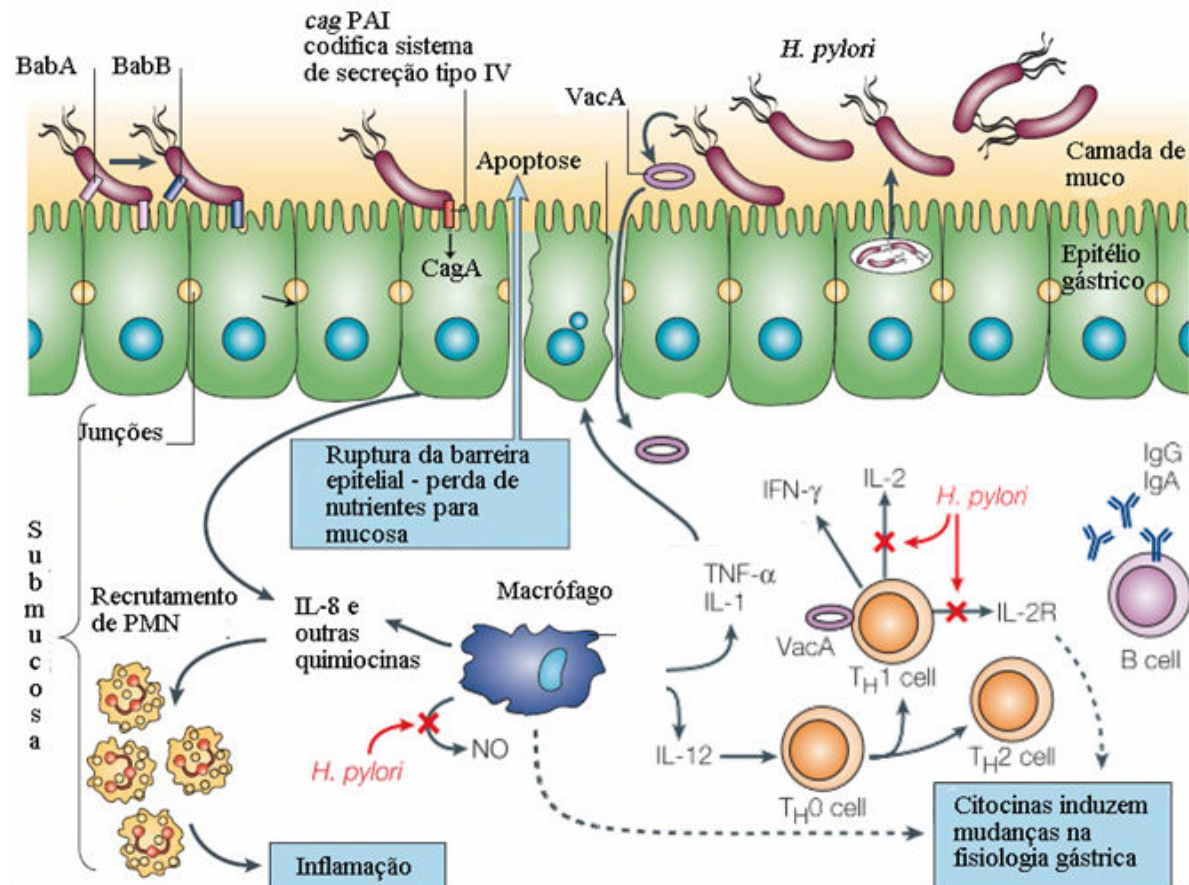
ativação do fator transcricional AP-1 e expressão de proto-oncogenes, como *c-fos* e *c-jun* pela ativação da cascata de quinase ERK/MAP (BASSO et al., 2008). Além de células epiteliais gástricas, estudo recente mostrou que CagA pode também ser injetado em células dendríticas, suprimindo a resposta imune do hospedeiro pela redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12-p40, e aumento na expressão de citocinas supressoras, como IL-10 (TANAKA et al., 2010). Mesmo com este papel duplo, cepas que portam *cagPAI* são associadas a altos graus de inflamação da mucosa gástrica (HATAKEYAMA, 2009), conferindo maior risco para o desenvolvimento de câncer de estômago (TRUONG et al., 2009; BAUER; MEYER, 2011).

A proteína VacA é uma citotoxina indutora de vacuolização em células epiteliais codificada pelo gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin*) e que compreende duas subunidades: p33 e p55. A primeira forma um canal para transporte de cloreto, enquanto que o outro segmento é indispensável para ligação na célula do hospedeiro (BOQUET; RICCI, 2012) Esta proteína também estimula a apoptose de células gástricas pela dissipação do potencial transmembrana mitocondrial, liberação de citocromo c e ativação do fator pró-apoptótico Bax (RASSOW; MEINECKE, 2012). Além disto, exerce efeitos na resposta imune do hospedeiro pela perturbação da apresentação de antígenos (AMIEVA; EL-OMAR, 2008; WEN; MOSS, 2009; POLK; PEEK, 2010) e supressão da proliferação de linfócitos T e B (SUNDRUD et al., 2004). Diferentemente de *cagPAI*, todas as linhagens possuem o gene *vacA*, embora aproximadamente 50% delas expressam a proteína VacA. Esta diferença resulta de polimorfismos existentes no gene (WEN; MOSS, 2009), sendo a linhagem *vacA s1ml* altamente toxigênica (BASSO et al., 2008). Cepas que expressam as formas ativas de VacA são associadas com um maior risco de câncer gástrico (POLK; PEEK, 2010).

A *H. pylori* adere-se às células gástricas epiteliais por meio de BabA e outras adesinas e, com isto, introduz CagA e outras moléculas efetoras dentro das células do hospedeiro levando a ativação do fator de transcrição NF- κ B e consequente produção de Interleucina (IL)-8 e outras quimiocinas (NOTO; PEEK, 2012). Estas recrutam células polimorfonucleares para o local da infecção causando inflamação (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004). Os macrófagos recrutados para o local produzem inúmeras citocinas, como IL-1, Fator de Necrose tumoral (TNF)- α , IL-6, IL-10 (CHEN et al., 2012) e IL-12, sendo esta a principal responsável pelo recrutamento de células T helper (T_h) e células B, iniciando a resposta imune adaptativa (Figura 1). Dentre as citocinas desta resposta, IL-2 permite a expansão clonal de células T antígeno-específicas (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2003) e o TGF- β , produzido pelas células do epitélio gástrico (BESWICK et al., 2011), atua contrabalanceando o efeito

das citocinas pró-inflamatórias por meio da ligação ao receptor do tipo II (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2003). Portanto, a maioria dos danos no estômago não são causados diretamente pela *H. pylori*, mas pelas células inflamatórias presentes neste ambiente (BERG et al., 2007).

Figura 1: Interação entre fatores de virulência da *H. pylori* e resposta do hospedeiro



Fonte: Adaptada de MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004, p.758.

H. pylori adere-se nas células gástricas epiteliais através de BabA e outras adesinas. Cepas *cagA+* translocam CagA para estas células através do sistema de secreção tipo IV, resultando na produção de IL-8 e outras quimiocinas. Estas recrutam células polimorfonucleares (PMN), resultando em inflamação. CagA também pode romper a barreira epitelial, causando alterações displásicas na mucosa gástrica e perda de nutrientes para a camada de muco facilitando a entrada da citotoxina VacA que atua nas mitocôndrias liberando citocromo c, o que resulta na apoptose de células epiteliais. Macrófagos ativados produzem citocinas como TNF- α e IL-1 β que contribuem para o recrutamento de leucócitos do sangue e IL-12 que ativa células T_{H0} a se diferenciarem em T_{H1}, resultando na produção de IFN- γ . *H. pylori* possui a enzima arginase que bloqueia a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, além de bloquear, via VacA, a transcrição de IL-2 e IL-2R interferindo na proliferação de células T.

Apesar da noção de que a *H. pylori* promove uma forte resposta inflamatória, o sistema imune é insuficiente para eliminar a infecção devido a estratégias de evasão imune do

patógeno (LEE; HWANG; NAM, 2014). Dentre estas estratégias, a *H. pylori* possui habilidade de escapar da detecção por vários receptores da imunidade inata por meio da modificação de seus alvos. Em adição, possui enzimas responsáveis pela detoxificação de espécies reativas de oxigênio, como catalase e superóxido dismutase, e arginase que limita a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (Figura 1), além de apresentar múltiplas vias de reparo de DNA que contribuem para a colonização da mucosa gástrica por este patógeno (SALAMA et al., 2013). Interfere também na ativação e proliferação de células T por bloquear a transcrição de genes que codificam IL-2 e seu receptor IL-2R (GEBERT et al., 2003) (Figura 1). Esta habilidade de evadir da resposta imune provavelmente possui um papel importante na tendência desta bactéria para persistir no estômago por décadas, estimulando uma resposta inflamatória de baixo nível que promove a carcinogênese gástrica (DALAL; MOSS, 2014).

A resposta imune sistêmica causada pela colonização da mucosa gástrica pela *H. pylori* reduz a acidez do estômago, o que favorece o crescimento de outras bactérias. A inibição da secreção de ácido favorece alteração na localização da gastrite que passa a predominar no corpo e inicia lesões pré-cancerosas (KIM; KIM, 2009). Além disto, a *H. pylori* pode afetar a metilação de genes (CHAN et al., 2003), induzir expressão aberrante da enzima Citidina Desaminase Induzida por Ativação o que leva a alterações genéticas (SHIMIZU et al., 2012), quebras na fita dupla do DNA e desregulação na expressão gênica e de microRNAs, o que leva ao aumento na instabilidade genética favorecendo a transformação maligna (GRAHAM, 2015).

Alguns estudos tem evidenciado desregulação na expressão de genes e proteínas do hospedeiro em resposta a infecção pela *H. pylori*, afetando receptores e co-receptores envolvidos no reconhecimento bacteriano, transdução de sinal, mediadores de resposta imune e inflamatória, apoptose, proliferação e metabolismo comparando indivíduos infectados com não infectados (HOFMAN et al., 2007; YANG et al., 2012). Como consequência, mudanças na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta imune e inflamatória podem influenciar na resposta do hospedeiro contra a infecção.

1.3 Tratamento de erradicação da *H. pylori*

Estratégias potenciais para prevenção do câncer gástrico decorrente da infecção incluem vacinação efetiva contra *H. pylori* e erradicação deste patógeno em pacientes com alto risco. A vacinação seria a melhor opção para prevenir o câncer gástrico, pois evitaria os efeitos adversos do tratamento com antibióticos, mas poucos ensaios clínicos estão sendo realizados (MALFERTHEINER; VENERITO; SELGRAD, 2013). Por outro lado, a

erradicação desta bactéria pode reverter lesões gástricas, prevenindo a transformação maligna (PARK et al., 2013; ZHOU et al., 2014; CHEN et al., 2015). Vários estudos mostraram que a erradicação da *H. pylori* resulta em regressão significativa de atrofia gástrica (WANG et al., 2011; MASSARRAT et al., 2012; LEE et al., 2013) e úlcera (LEE et al., 2013), mas não de metaplasia intestinal (WANG et al., 2011; MASSARRAT et al., 2012; LEE et al., 2013) e displasia (LEE et al., 2013). Contudo, a erradicação da bactéria não garante a prevenção do câncer gástrico e nem a regressão de lesões precursoras em pacientes com metaplasia intestinal e displasia, indicando que, quando as mudanças histológicas atingem certo grau, o processo carcinogênico ocorre independentemente da presença da bactéria (CHEN et al., 2015). Portanto, a erradicação do patógeno em estágios iniciais da infecção é mais efetiva para impedir o desenvolvimento de câncer de estômago (MABE et al., 2009; ZHOU et al., 2014).

Os esquemas de tratamento da infecção incluem a administração de dois ou três antibióticos e um inibidor de bomba de prótons (IBP), com ou sem sal de bismuto, por uma ou duas semanas (RIMBARA et al., 2011). A terapia tripla padrão é considerada o tratamento padrão de primeira linha e inclui um IBP, claritromicina e amoxicilina ou metronidazol por sete a quatorze dias (CHUAH et al., 2011; ROESLER; COSTA; ZEITUNE, 2012). Entretanto, a taxa de cura tem declinado ao longo dos anos, devido principalmente à resistência bacteriana a antibióticos (PARREIRA et al., 2014). Neste caso, terapias alternativas estão sendo desenvolvidas, como a terapia quádrupla contendo bismuto ou a terapia contendo levofloxacina, sendo que este último alcança taxa de erradicação mais alta que a terapia quádrupla e tem poucos efeitos adversos (CHUAH et al., 2011; ROESLER; COSTA; ZEITUNE, 2012). O IBP possui influência principal no sucesso terapêutico, pois converte formas dormentes e não proliferativas da bactéria em formas ativas devido ao aumento no pH, aumentando a eficácia dos antibióticos (MARCUS et al., 2012). Mesmo apresentando inúmeros benefícios, o alto custo do tratamento dificulta sua realização em portadores assintomáticos, principalmente nos países em desenvolvimento (WU et al., 2008).

Vários estudos têm demonstrado que a erradicação nem sempre é bem sucedida (CHUAH et al., 2011). O sucesso terapêutico depende de vários fatores, incluindo suscetibilidade bacteriana a antibióticos e o genótipo do hospedeiro, como polimorfismos do citocromo *CYP2C19*, *MDR1* e de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF α , que são potentes inibidores da secreção ácida, aumentando a eficácia do tratamento (FURUTA et al., 2002; SUGIMOTO et al., 2007; GRAHAM et al., 2008; SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009). Outros fatores como tabagismo, submissão do paciente, duração da terapia de erradicação,

esvaziamento gástrico também afetam as taxas de cura, assim como fatores de virulência bacterianos, sendo a erradicação mais eficiente em cepas *cagA/vacA s1a* positivas (ZHAO et al., 2007; GRAHAM et al., 2008; SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009; FIGURA et al., 2012). Portanto, estes fatores são marcadores prognósticos do sucesso ou falha da terapia de erradicação da *H. pylori* (SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009).

Embora vários estudos apontem os efeitos do tratamento de erradicação em lesões gástricas, poucos avaliam sua influência na expressão gênica e protéica. Tsai et al (2006) mostraram que a expressão de genes relacionados a dano celular, inflamação, proliferação, apoptose e diferenciação é alterada após erradicação da *H. pylori*, sugerindo que este procedimento pode reverter o processo molecular relacionado ao desenvolvimento de câncer (CADAMURO et al., 2014). Redução na expressão do fator de transcrição FOXP3 e dos genes *INFG*, *IL10* e *hBD2* também indicam que a eliminação do patógeno pode influenciar no padrão de expressão gênica encontrado em indivíduos infectados (KINDLUND et al., 2009; BAUER et al.; 2013). Assim, embora a erradicação da *H. pylori* elimina o estímulo nocivo, a resolução da inflamação é um processo altamente regulado e que depende de inúmeros mediadores, de modo que estudos são necessários para avaliar quando e se a inflamação induzida por esta bactéria é resolvida após a erradicação (LEE; NA; SURTH, 2013).

Estas informações nos motivaram a investigar a ocorrência de mudanças nos níveis de expressão em genes de citocinas induzidas pela *H. pylori* na mucosa gástrica de pacientes com gastrite crônica infectada em comparação com a não infectada, assim como avaliar se após a erradicação da bactéria há um restabelecimento da expressão gênica. Para isto, foram selecionados os genes *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* e *TGFBR2* devido ao envolvimento nos processos inflamatório e carcinogênico.

1.4 Citocinas e receptores envolvidos na inflamação e carcinogênese

O fator de necrose tumoral (TNF)- α é uma proteína transmembrana tipo II (JONES; STUART; WALKER, 1989) que pode ser clivada pela metaloprotease conhecida como enzima conversora de TNF- α , dando origem a citocina solúvel (BLACK et al., 1997). Macrófagos e células não-imunes, como células tumorais, contribuem para a produção desta proteína (SZLOSAREK, 2003; ZHAO et al., 2010). No contexto de carcinogênese desencadeada por inflamação crônica, TNF- α é um promotor tumoral essencial (FUJIKI et al., 2000), sendo requerido mesmo quando a rede inflamatória de outras citocinas e quimiocinas está presente (OSHIMA et al., 2014). Esta rede de citocinas envolvidas na promoção tumoral inicia-se com a produção de TNF- α pelos macrófagos ativados, sendo que este estimula a produção de IL-1 e IL-6 (SUGANUMA et al., 2002). A principal função fisiológica do TNF- α

é recrutar monócitos e neutrófilos para o sítio de infecção por meio da expressão de receptores de superfície nas células endoteliais vasculares e pela estimulação da secreção de quimiocinas pelos macrófagos e células endoteliais (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2003).

A Interleucina-1 β (IL-1 β) é essencial para a resposta inata do hospedeiro contra a infecção e, conseqüentemente, pode acarretar danos ao tecido durante doenças crônicas e agudas (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). IL-1 β é sintetizado como um precursor inativo denominado Pro-IL-1 β que se converte na forma madura por clivagem proteolítica pela caspase-1 (BANERJEE, SAXENA, 2012). É produzida por monócitos primários do sangue, macrófagos do tecido e células dendríticas (DINARELLO, 2011). Como outras citocinas de sua família, a IL-1 β promove adesão de neutrófilos e outras células antes da imigração para o tecido pelo aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e L-selectina (TSANG et al., 1997), além de induzir a expressão da Fosfolipase A2 (PLA2) e COX-2 (BANERJEE, SAXENA, 2012). Recentes estudos têm demonstrado que IL-1 β e seu receptor IL-1R1 são importantes para diferenciação inicial da resposta T_h17, a qual possui um importante papel na resposta do hospedeiro durante a infecção (van de VEERDONK et al., 2011). Esta interleucina é também um importante inibidor da secreção de ácido gástrico (FURUTA et al., 2002).

A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional produzida por células imunes, como macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células B e, em menor extensão, células T CD4⁺ efectoras, além de células não imunes como células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais e várias células malignas (HIRANO, 1998). IL-6 promove a diferenciação de células T_h2 por aumentar a produção de IL-4 pelas células T CD4⁺ (DIEHL et al., 2002; YANG et al., 2005) e inibe a diferenciação de células T_h1, resultando em diminuição da sinalização de INF- γ (DIEHL et al., 2000). Esta citocina também induz a maturação final de células B, servindo como um potente coadjuvante para aumentar a imunidade humoral (DIENZ et al., 2009) e promove recrutamento de neutrófilos e macrófagos (RINCON, 2012). IL-6 é uma das citocinas mais abundantes durante ativação prolongada e descontrolada da inflamação (MAUER et al., 2015), sendo um dos principais condutores do estado de inflamação crônica para câncer associado à inflamação (RATH et al., 2015). Além disto, a ação desta citocina no processo carcinogênico é ligada com crescimento, progressão e reincidência tumoral (GRIVENNIKOV et al., 2009; GILBERT; HERMANN, 2010; PARK et al., 2010).

A Interleucina-12 (IL-12) é produzida por células fagocíticas e dendríticas durante infecção bacteriana (DEL VECCHIO et al., 2007). Quando ativa é um heterodímero composto de duas subunidades dissulfídicas ligadas, denominadas p40 e p35, e que são codificadas por

dois genes *IL12A* e *IL12B*, respectivamente (SIEBUTH et al., 1992). Esta citocinas age como um regulador chave da resposta imune mediada por células, ligando a imunidade inata com a adaptativa (DEL VECCHIO et al., 2007). Dentre suas ações na imunidade celular, IL-12 induz a diferenciação de células T_{h0} em T_{h1} e causa proliferação e aumento da atividade citolítica de células T $CD8^+$ e NK (Natural Killer), promovendo a produção de IFN- γ e consequente ativação de macrófagos (DEL VECCHIO et al., 2007).

Outra citocina importante na resposta inflamatória contra a *H. pylori* é a interleucina-2 (IL-2) produzida por células T ativadas ou células apresentadoras de antígenos após interação antígeno/complexo de histocompatibilidade principal, estando envolvida na resposta imune celular (SEDER; PAUL, 1994). Esta citocina age de modo autócrino, levando a proliferação de células T antígeno específicas, aumento da atividade citotóxica de células T $CD8^+$ e de células NK, proliferação e aumento na secreção de anticorpos pelas células B, além de exercer efeito sobre a produção de citocinas pelos neutrófilos (LIAO et al., 2011). IL-2 também contribui para a diferenciação de células T_{h0} em T_{h1} ou T_{h2} por poder induzir a expressão de cadeias dos receptores de IL-12 e IL-4 que são as citocinas chaves para a diferenciação nestes tipos celulares, respectivamente (LIAO et al., 2011), e, assim, contribui para a resposta imune adaptativa (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004). Além disto, sinalização de IL-2 pode diminuir a geração de células T_{h17} (LAURENCE et al., 2007) e contribui para o desenvolvimento de células Tregs (células T regulatórias), responsáveis por suprimir a ativação do sistema imune e conferir tolerância a auto-antígenos (MALEK, 2008).

O *TGFBR2* é um dos dois tipos principais de receptor da citocina multifuncional TGF- β , que após sua ligação causa fosforilação no receptor do Tipo I e inicia a sinalização intracelular (ACHYUT; YANG, 2011). TGF- β é secretada por células T ativadas, fagócitos mononucleares e por células não-imunes, como as células epiteliais gástricas (BESWICK et al., 2011). Esta citocina anti-inflamatória inibe a proliferação e diferenciação de células T e favorece o desenvolvimento de células T regs (BESWICK et al., 2011). A via de sinalização TGF- β é considerada uma via supressora de tumor (MIVAZONO et al., 2003; HONG et al., 2010) e sua desregulação pode ser associada com carcinogênese relacionada a inflamação no trato gastrointestinal (HONG et al., 2010). Deleção do gene *TGFBR2* em fibroblastos induz o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (BHOWMICK et al., 2004).

1.5 MicroRNAs, infecção pela *H. pylori* e carcinogênese

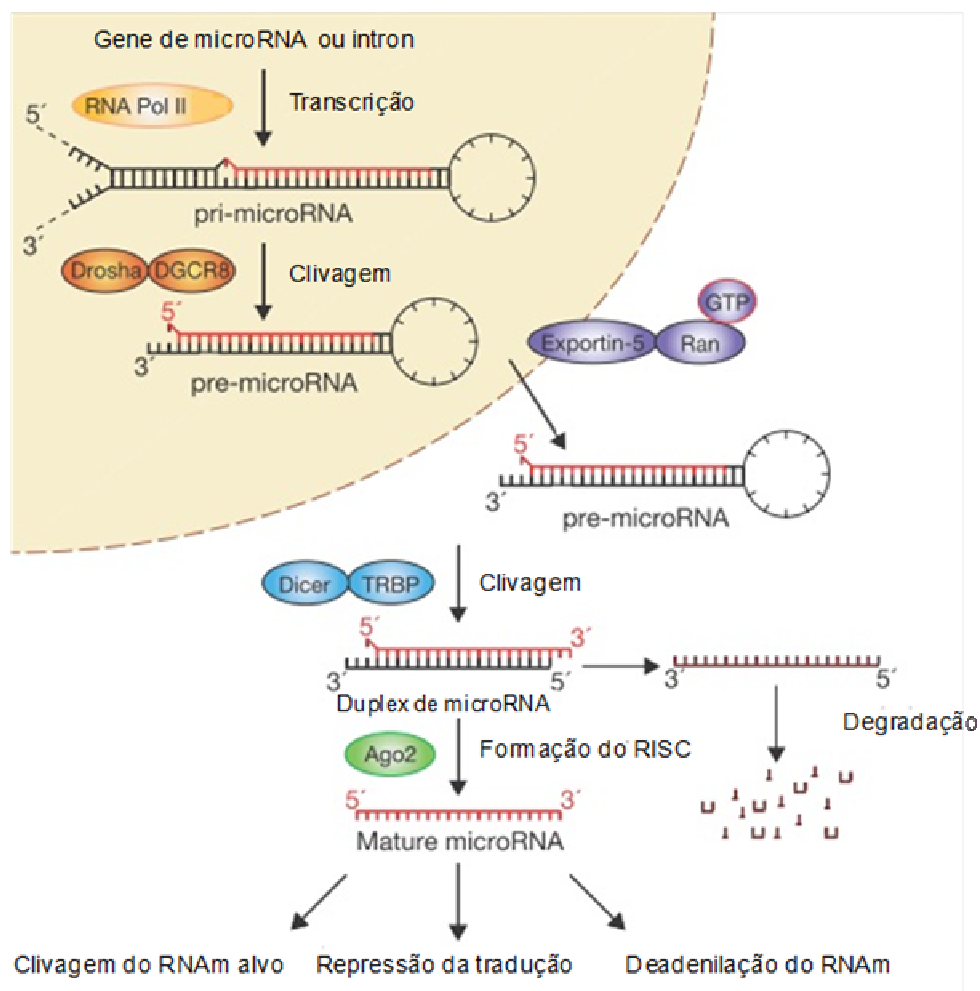
Como destacado, infecção pela *H. pylori* pode alterar a expressão de genes na mucosa gástrica. Em adição, esta expressão também é influenciada por eventos epigenéticos, como a inativação pós-transcricional pelos microRNAs (miRNAs) (KANG et al., 2014). Além disto,

existem relatos indicando que a *H. pylori* pode alterar a expressão de miRNAs na mucosa gástrica (MATSUSHIMA et al., 2011).

Os miRNAs são pequenos RNA endógenos não-codantes de aproximadamente 22 nucleotídeos (BARTEL, 2004). A maioria dos genes de miRNAs localizam-se em regiões intrônicas (YING, LIN, 2005), intergênicas ou em orientação antisense de genes anotados (MOURELATOS et al, 2002). A partir do DNA genômico, RNA polimerase II (RNA pol II) produz transcritos primários longos (pri-miRNAs) (LEE et al., 2004) que são posteriormente clivados por um complexo formado pela RNase III Droscha (LEE et al., 2003) no núcleo. O precursor formado (pré-miRNA) dobra-se por pareamento intramolecular de bases adquirindo uma estrutura em grampo (*hairpin*) (LI, PAN, LIN, 2006) e é exportado para o citoplasma pela Exportina-5 na presença de Ran-GTP (YI et al., 2003). No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela RNase III Dicer resultando em um duplex com aproximadamente 22 nucleotídeos (BERNSTEIN et al., 2001). Este pode originar um miRNA maduro proveniente da extremidade 5' do *hairpin* e outro da extremidade 3', sendo que, em alguns casos, apenas um deles é funcional e o outro degradado (KHVOROVA, et al., 2003; SCHWARZ et al., 2003) (Figura 2). Quando ambas as fitas são expressas, dois miRNAs maduros diferentes são produzidos a partir de uma mesma sequência de miRNA, sendo que cada um possui diferentes alvos e, portanto, diferentes funções biológicas (MARCO et al., 2012).

O miRNA maduro é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Figura 2), guiando o silenciamento gênico pós transcricional por meio do pareamento entre o miRNA e o RNAm alvo (HAMMOND et al., 2000; ELBASHIR et al., 2001a, 2001b). Este é reconhecido devido a complementaridade entre a região 3' não-traduzida (3'-UTR) e os primeiros nove nucleotídeos da extremidade 5' do miRNA, denominada região *seed* (LEWIS, BURGE, BARTEL, 2005; GU et al., 2009). Quando existe complementaridade completa entre estas sequências, o RNAm é degradado (ELBASHIR et al., 2001a, 2001b). No entanto, a maioria dos casos em animais envolve complementaridade parcial que causa repressão da tradução do RNAm (SELBACH et al., 2008; BEILHARZ et al., 2009). Devido a este pareamento imperfeito, um miRNA pode regular muitos RNAm diferentes e, de modo contrário, a região 3'UTR do RNAm pode ser alvo de inúmeros miRNAs (LEWIS et al., 2003; ZHOU et al., 2013; CHAN; WANG, 2015). Além da expressão gênica, eles são capazes de modificar a cromatina, regulando a metilação do DNA e modificação de histonas pela alteração na expressão de enzimas responsáveis pelo controle epigenético (HAWKINS; MORRIS, 2008).

Figura 2: Biogênese e processamento dos microRNAs



Fonte: Adaptada de WINTER et al., 2009, p. 229.

A RNA polimerase II produz o transcrito primário (pri-microRNA) a partir de DNA genômico. Este transcrito é clivado pelo complexo microprocessador Drosha-DGCR8 no núcleo resultando no precursor de miRNA (pré-microRNA). Este é exportado do núcleo pela Exportina-5 dependente de Ran-GTP. No citoplasma, a RNase Dicer em complexo com a proteína de ligação de RNA fita dupla (TRBP) cliva o pré-miRNA originando um duplex de miRNA. A fita funcional do miRNA maduro (vermelha) junta-se com proteínas Argonautas (ago2) no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde ela guia RISC para o silenciamento de RNAm alvos por meio de clivagem, repressão da tradução ou deadenilação, enquanto que a fita passageira (preta) é degradada.

Atualmente, 2.588 miRNAs maduros foram encontrados em humanos (miRBase, 2014), regulando cerca de 60% de todos os genes que codificam proteínas (FRIEDMAN et al., 2009). Por apresentarem múltiplos alvos, miRNAs modulam várias funções celulares, como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo, além de regular funções sistêmicas, como a inflamação (VIRTUE; WANG; YANG, 2012; RANJHA; PAUL, 2013). Em decorrência disto, alteração na expressão de miRNAs pode perturbar várias vias de sinalização celular (ACUNZO et al., 2015), influenciando em inúmeras doenças inflamatórias (VIRTUE; WANG; YANG, 2012; RANJHA; PAUL, 2013) e diferentes tipos de cânceres

humanos (RANJHA; PAUL, 2013). Expressão aberrante de miRNAs relaciona-se a deleção da região genômica onde ele está localizado, alteração na função ou expressão de enzimas envolvidas na biogênese e alterações epigenéticas nos promotores (ACUNZO et al., 2015).

A expressão dos miRNAs é tecido específica, podendo ser utilizados como biomarcadores de origem tumoral (LU et al., 2005). Em tecido gástrico, Ribeiro-dos-Santos et al. (2010) encontraram 404 sequências de miRNAs maduros na região da cárdia em indivíduos saudáveis, dos quais 15 foram altamente expressos. Dentre eles, os hsa-miR-148a e hsa-miR-192 são hiperexpressos apenas em tecido gástrico, de modo que podem regular genes relacionados a homeostase do estômago. Em lesões gástricas os estudos com miRNA são escassos. Shiotani et al. (2012) mostraram que glândulas com metaplasia intestinal possuem uma expressão significativamente maior de miRNAs oncogênicos que glândulas não-metaplasicas, independentemente da erradicação da *H. pylori*. Em estudo com indução experimental de gastrite crônica pela *H. pylori*, o miR-155 está envolvido com a regulação da resposta de células T_{h1} e T_{h17} de modo a controlar a infecção e, ao mesmo tempo, induz patologias pré-neoplásicas associadas a esta bactéria por meio da produção de IFN- γ (SAYI et al., 2009; OERTLI et al., 2011).

Crescente número de estudos apontam que os miRNAs estão envolvidos em praticamente todos os tipos de cânceres (ACUNZO et al., 2015) e o perfil de expressão de miRNAs é capaz de classificar tumores de acordo com o tecido de origem com uma exatidão maior que 90% (ROSENFELD et al., 2008). Em estômago, Wu et al. (2011) avaliaram a expressão de 60 miRNAs em tecido de câncer gástrico e em mucosa normal adjacente e encontraram possível envolvimento de 38 destes miRNAs com o processo de carcinogênese gástrica, sendo que miR-221, miR-15b, miR-181b, miR-199a-3p e miR-155 apresentaram os maiores níveis de expressão. Outro estudo mostrou que os níveis plasmáticos de miR-223 e miR-21 são significativamente maiores em pacientes com neoplasia gástrica do que em controles saudáveis (LI et al., 2012), sendo que o papel dos miRNAs no câncer gástrico depende do balanço entre miRNA pró e anti-tumorigênicos (ZABATELA, 2012).

Além da presença de lesões, a infecção gástrica por *Helicobacter pylori* pode alterar o padrão de expressão de miRNAs e, com isto, contribuir para o desbalanço de eventos celulares. Matsushima et al. (2011) encontraram, por microarray, 55 miRNAs diferencialmente expressos em indivíduos positivos para infecção pela bactéria em comparação aos negativos. Os autores também mostraram que o miR-223 foi o único que apresentou aumento de expressão em indivíduos *H. pylori* positivos. Em um subgrupo de cinco pacientes submetidos à terapia de erradicação da bactéria, os autores mostraram que o

nível de expressão de 14 miRNAs foram restaurados, apresentando expressão aumentada, após quatro semanas da eliminação da bactéria, porém em um paciente em que a terapia não foi satisfatória, os níveis destes miRNAs não foram alterados (MATSUSHIMA et al., 2011). Em outro estudo que avaliou o efeito da erradicação da bactéria um ano após o tratamento, Shiotani et al. (2012) mostraram que os hsa-miR-21, hsa-miR-25, hsa-miR-93, hsa-miR-194 e hsa-miR-196 estavam hiperexpressos no grupo com câncer gástrico em relação ao grupo controle, sendo que a erradicação diminuiu a expressão destes miRNAs apenas no grupo controle. Neste trabalho, a erradicação não resultou em mudança na expressão de miRNAs oncogênicos em glândulas metaplásicas, mas a expressão diminuiu em glândulas não metaplásicas, indicando que o tratamento é efetivo no restabelecimento da expressão de miRNAs apenas em estágios iniciais da transformação gástrica (Shiotani et al., 2012). Assim, torna-se evidente que a infecção pela *H. pylori* afeta os padrões de expressão de miRNAs na mucosa gástrica, sendo este processo decorrente, em parte, das respostas imune e inflamatória do hospedeiro (MATSUSHIMA et al., 2011; NOTO; PEEK, 2012).

Os miRNAs podem regular a inflamação por meio de sua ação sobre os mRNAs de citocinas pró e anti-inflamatórias (XU et al., 2011). Isomoto et al. (2012), investigando a associação entre vários miRNA com expressão de citocinas em lesões gástricas, encontraram correlação negativa entre let7b, miR-200c, miR-375 e miR-103 e as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , respectivamente. Outras relações entre fatores inflamatórios e miRNAs estão descritas como, por exemplo, miR-370 e expressão reduzida de TGF β -RII (LO et al., 2012), miR-365 que regula negativamente IL-6 (XU et al., 2011) e miR-223 e a redução de IL-6 e IL-1 β (CHEN et al., 2012). Em decorrência desta ação e considerando que a *H. pylori* altera a expressão dos miRNAs, é possível que a alteração no padrão de expressão de genes em condições de infecção por esta bactéria seja resultante da alteração causada por este patógeno na expressão de miRNAs. Estas informações nos motivaram também a investigar os níveis de expressão de miRNAs na mucosa gástrica não infectada e infectada, assim como após o tratamento de erradicação. Para isto, foram selecionados os miRNAs hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-375 e miR-223-3p com base em seu envolvimento na inflamação e carcinogênese gástrica (Tabela 1).

Tabela 1: miRNAs com atuação no processo inflamatório e carcinogênese gástrica.

miRNA	ID-miRBase ¹	Alvos Preditos ² ou validados*	Associações	Referências
hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	<i>TNF</i> <i>TGFBRII</i>	- Expressão reduzida na presença da <i>H. pylori</i> - Expressão reduzida em gastrite atrófica e metaplasia intestinal - Expressão aumentada em câncer gástrico	Matsushima et al (2011) Isomoto et al (2012) Shrestha et al (2014)
hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	<i>TNF</i> <i>IL1B</i> <i>IL2*</i>	- Expressão alterada em câncer gástrico	Hashimoto et al (2010) An et al (2013) Cui et al (2013)
hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	<i>TGFBRII</i>	- Expressão reduzida na presença de <i>H. pylori</i> e <i>cagA</i> - Expressão alterada em câncer gástrico	Fan et al (2013) Feng et al (2013) Li et al (2014)
hsa-miR-375	MIMAT0000728	<i>TGFBRII</i>	- Expressão reduzida na presença de <i>H. pylori</i> - Expressão reduzida em câncer gástrico	Matsushima et al (2011) Shiotani et al (2012) Chen et al (2013) Shen et al (2014)
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	<i>IL6*</i> <i>TGFBRII</i>	- Expressão aumentada na presença de <i>H. pylori</i> - Expressão aumentada em gastrite crônica e metaplasia intestinal - Expressão aumentada em câncer gástrico	Matsushima et al (2011) Isomoto et al (2012) Shiotani et al (2012) Ma et al (2014)

¹ miRBase: <http://www.mirbase.org>

² TargetScan Human: <http://www.targetscan.org>; DIANA – microT: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>; microRNA.org: <http://www.microrna.org>; Ferrolab: <http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/>

* DIANA - TarBase: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase>; MiRTarBase: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>

A identificação de alterações na expressão de genes e microRNAs que atuam na resposta inflamatória e imune em lesões precursoras e infecção pela *H. pylori* poderá contribuir para a identificação de grupos de risco para o câncer gástrico e terapias mais efetivas para o tratamento de erradicação da *H. pylori*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- a) Avaliar a expressão quantitativa do RNAm dos genes das citocinas *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* e do receptor *TGFBR2* e de suas proteínas em tecido gástrico de pacientes com gastrite crônica *H. pylori*- positivos antes e após o tratamento de erradicação da bactéria, em comparação com um grupo sem infecção pela bactéria;
- b) Avaliar a expressão dos miRNAs hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-375 e hsa-miR-223-3p nos mesmos grupos e relacionar com a expressão do RNAm e das proteínas, assim como a interação desses marcadores por meio de ferramentas de bioinformática;
- c) Investigar a ocorrência de associação dos genótipos de virulência *cagA* e *vacA* da *H. pylori* com a taxa de erradicação da bactéria e com os níveis de expressão dos RNAm dos genes de citocinas e miRNAs.

3 ARTIGO

Effect of *Helicobacter pylori* eradication therapy in the expression of cytokines and microRNAs associated with the inflammatory process

Ana Flávia Teixeira Rossi¹, Aline Cristina Targa Cadamuro¹, Joice Matos Biselli-Périco¹, Katia Ramos Moreira leite², Fábio Eduardo Severino³, Patrícia Pintor dos Reis³, Ana Elizabete Silva¹

¹ UNESP, São Paulo State University, Department of Biology, São José do Rio Preto Campus, SP, Brazil

² USP, São Paulo University, School of Medicine, São Paulo, SP, Brazil

³ UNESP, São Paulo State University, School of Medicine, Botucatu, SP, Brazil

#Address correspondence to Ana Elizabete Silva

Rua Cristovão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, SP, CEP: 15054-000, Brazil

E-mail: anabete@ibilce.unesp.br

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and its virulence factors *vacA* and *cagA* causes chronic inflammation favoring the development and progression of gastric cancer. Thus, *H. pylori* eradication may have a key role to reverse gastric lesions, preventing malignant transformation.

Aims: We evaluate whether *H. pylori* eradication treatment influences the mRNA and protein expression of inflammatory mediators (*TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* and *TGFBR2*) and miRNAs (hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-375 and miR-223-3p) in *H. pylori*-positive chronic gastritis patients (Hp+) in comparison with non-infected chronic gastritis patients (Hp-). We also evaluated the relationship between the expression levels of miRNAs with of mRNA and protein and participation in interaction networks, as well as the influence of bacterial virulence factors *cagA* and *vacA* on these mediators.

Methods: Were evaluated 20 patients Hp- and 31 Hp+, which were also investigated three months after eradication therapy. Relative quantification (RQ) of mRNA and miRNAs was performed by qPCR-real time using TaqMan® assay. Genotyping of *cagA* and *vacA* was performed by PCR, while the protein expression was assessed by immunohistochemistry.

Results: Hp+ patients showed increased mRNA levels for *TNFA*, *IL6*, *IL1B* and *IL12A*, while for *IL2* and *TGFBR2* as well as for miR-103, miR-181c, miR-370 and miR-375 it were decreased. After treatment, only *TNFA* and *IL6* mRNA were significantly reduced and *TGFBR2* increased in eradicated patients ($p < 0.05$), while all miRNAs, except to miR-223, were significantly increased after bacterium eradication ($p < 0.05$). In general, the Hp- patients showed low expression levels for both mRNA and miRNA in relation to Hp+ patients. Protein expression showed positive immunostaining in the epithelium and inflammatory cells, except IL-6 that presented mainly stromal immunostaining, in the Hp+ group. Unlike mRNA expression, only IL-2 and TGF- β -R2 had significantly reduced protein expression after bacterium eradication in the epithelial cells, but not in inflammatory cells. *TNFA* mRNA expression was negatively correlated with miR-103 ($r = -0.46$; $p = 0.016$), miR-181c ($r = -0.39$; $p = 0.042$) and miR-370 ($r = -0.67$; $p < 0.001$) and the expression of proteins TGF- β -R2 and IL-12-p40 were inversely related to miR-103 ($p = 0.018$) and miR-370 ($p = 0.017$), respectively, in the Hp+ patients. *cagA* and *vacA* genotypes were not associated with eradication rate nor the gene expression levels, but higher expression of miR-181c was observed in individuals carriers of *vacA s1m1*.

Conclusion: Our results show deregulation in the expression of the important inflammatory mediators and miRNAs as a consequence to *H. pylori* infection and changes of these patterns after bacterium eradication for the majority of miRNAs and genes evaluated, indicating that eradication therapy favors the normalization of gene and protein expression of gastric mucosa, potentially addressed by control of miRNAs.

Key-words: *Helicobacter pylori*; chronic gastritis; inflammation; microRNAs; cytokines; eradication therapy

1. Introduction

The bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) have great ability to colonize the human stomach (1). Inflammatory response triggered by this pathogen in the gastric mucosa is characterized by activation of the innate and adaptive immune system with presence of polymorphonuclear cells and lymphocytes, besides the stimulation of transcription factor nuclear factor (NF)- κ B, production of survival and proliferation factors and pro- and anti-inflammatory cytokines (2,3). The persistent infection promote a chronic inflammation that causes mucosal damage and the consequent development of precursor lesions as chronic gastritis, which can progress to atrophy gastric, intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer (4,5). Thus, this pathogen is considered the main exogenous risk factor associated with gastric cancer (6) having been classified as a type I carcinogen (7, 8).

Several virulence factors related to the pathogenicity of this bacterium help to colonize the human stomach, as Cytotoxin-associated gene A (CagA) and Vacuolating cytotoxin A (VacA) (9). The *cagA* gene is located in *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) that also contains genes, which give rise to the bacterial type IV secretion system (T4SS) (10) responsible for injecting the CagA protein and other bacterial products into gastric epithelial cells (11). This oncoprotein exerts several effects on host gastric cells resulting in cytoskeleton rearrangement, disruption of cell polarity and stimulation of mitogenic and pro-apoptotic responses (11,12), as well as greater degree of mucosal inflammation (13). The VacA protein exerts effects on the host immune response, damaging antigen presentation (14) and suppressing the proliferation of T and B lymphocytes (15). Furthermore, VacA stimulates apoptosis of gastric cells by dissipation of mitochondrial transmembrane potential, release of cytochrome c and activation of pro-apoptotic factor Bax (16). Polymorphisms in *vacA* gene result in different patterns of this protein expression, like the s1m1 strains that are highly toxigenic (17).

Recently, it has been reported a deregulation in the expression of host genes in response to *H. pylori* infection. Differential expression was observed in receptors and co-receptors genes involved in the bacterial recognition, signal transduction, mediators of the immune and inflammatory response, apoptosis, proliferation and metabolism comparing infected with non-infected individuals (18, 19). As a consequence, changes in expression of genes encoding proteins involved in the immune and inflammatory responses by *H. pylori* can influence the intensity of the host response against infection.

In addition, gene expression is also influenced by epigenetic events, such as microRNAs (miRNAs) (20), short endogenous non-coding RNA that negatively regulate

post-transcriptional gene expression of targets mRNAs through messenger degradation or translational inhibition (21,22). Considering that a single miRNA can target many mRNAs, a deregulation in this expression may affect multiple signaling pathways (20) contributing to the development and progression of inflammatory disease and cancer (23). Beyond there are reports indicating that *H. pylori* can alter the miRNAs expression in gastric mucosa (24) and that they can regulate inflammation through its action on the mRNAs of pro- and anti-inflammatory cytokines (25) influencing the host defense response against this pathogen (26).

Several studies show that the *H. pylori* eradication results in significant regression of gastric atrophy (27-29) and ulcer (28), but not of intestinal metaplasia (27-29) and dysplasia (28), indicating the existence of a “point of no return” in which genetic alterations are irreversible despite bacterium elimination (27). However, at the molecular level, there are few studies and therefore we can not affirm the role of *H. pylori* eradication on changes in the gene expression. Thus, the goal of this study was to evaluate whether *H. pylori* eradication treatment interferes in mRNA and protein expression of inflammatory mediators as *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* and *TGFBR2* and miRNAs hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-375 and miR-223-3p in *H. pylori*-infected chronic gastritis patients in comparison with non-infected chronic gastritis patients. Furthermore, we investigated the relationship between the expression levels of miRNAs with of mRNA and protein and participation in interaction networks and the influence of *cagA* and *vacA* virulence genotypes in *H. pylori* eradication rate and in miRNA and mRNA expression levels.

2. Materials and Methods

2.1 Clinical Samples

Gastric biopsies from the antrum region were collected during upper endoscopy in Ambulatory of Gastro-Hepatology at the Base Hospital and João Paulo II Hospital, both of São José do Rio Preto, SP, Brazil, between May 2010 and December 2012. All specimens were kept in RNAlater® solution (*Applied Biosystems*) and stored at -20°C until acid nucleic extraction. Histological analyses were performed by pathologist for *H. pylori* diagnosis and histopathological classification of lesions according the Sydney system (30). Patients with gastric cancer, infectious diseases or inflammatory processes and had taken any antibiotics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, or corticosteroids two months prior to endoscopy, and proton-pump inhibitors, H₂ antagonists 10-15 days prior were excluded from the study. A total of 55 individuals were added, 31 diagnosed with gastric dyspepsia *H. pylori*-positive (Hp+), 20 with gastric dyspepsia *H. pylori*-negative (Hp-) without previous infection registration and four with histologically normal gastric mucosa and *H. pylori*-negative (Hp-).

Patient's information on the demographic characteristics was obtained after filled out a standard questionnaire containing questions about smoking and drinking habits, previous or ongoing treatment, medications use, previous surgeries and family history. In all groups, the majority was female, no drinking and no smoking (Table 1).

H. pylori-positive patients were submitted to standard triple therapy for bacterium eradication consisting of amoxicillin (1g), clarithromycin (500mg) and omeprazole (20mg) all twice daily for seven days. About 3 months after treatment, the patients underwent another endoscopy to evaluate the bacterium eradication. Among 31 Hp+ patients treated, 21 of them eradicate the bacterium (67.7%) and 10 remained infected (32.3%) after treatment.

This study was approved by the local Research Ethics Committee (CEP-IBILCE/UNESP, number 307.691/2013), and written informed consent was obtained from all individuals.

2.2 Molecular diagnosis of *H. pylori* and *cagA* and *vacA* virulence factors

DNA and RNA were extracted according to the protocol of TRIzol® reagent (*Invitrogen*) and quantifications were performed by NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (*Thermo Scientific*). The RNA integrity was assessed by the presence of subunits 18S and 28S of ribosomal RNA (rRNA) in 1.0% agarose gel electrophoresis.

DNA samples were subjected to multiplex PCR to confirm the histopathological diagnosis of *H. pylori*. Samples with discordant results between molecular and histopathological diagnosis were excluded from the study. The reaction was performed according our protocol described in previous study (31). The *H. pylori*-positive samples were then subjected to a second PCR run, to investigate the presence of virulence genotype *cagA*. To this reaction were used primers for the gene *cagA* (31) and for the 16S rRNA with specificity for *H. pylori* (32) used to confirm the efficiency of the PCR reaction. The reaction solution contained 1X Buffer, 1.2 mM of each deoxyribonucleotide, 1.0 mM MgCl₂, 0.4 mM of each primer (*Invitrogen*), 1.5U Platinum *Taq* DNA Polimerase (*Invitrogen*) and 300 ng of DNA, with a final volume of 25 µL. The reaction conditions were: 94°C for 5 minutes for denaturation, 40 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 56°C and 1 minute at 72°C and, for final extension, 7 minutes at 72°C.

The *H. pylori*-positive samples were also subjected to PCR for investigation of polymorphisms in the s/m regions of the gene *vacA*, as described by Gatti et al (2005) (33). Primers for “s” amplify s1 fragment of 176 bp or s2 fragment of 203 bp, while primers for “m” alleles amplify m1 fragment of 400 bp or m2 fragment of 475 bp. Positive and negative controls were used in all experiments.

2.3 mRNA and microRNA expression by quantitative real-time PCR (qPCR)

Reverse Transcription (RT) reaction for genes was performed with High Capacity cDNA Archive Kit (*Applied Biosystems*) according to the manufacturer's protocol. The synthesis of complementary DNA (cDNA) to the miRNAs was carried out in multiplex mode with TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*). For each reaction were used 1X RT Buffer, 2 mM dNTPs with DTTP, 150U MultiScribe Reverse Transcriptase, 3.8U Rnase Inhibitor, 6 µL pool containing primers for RT (5X) of all miRNAs available in the TaqMan® MicroRNA Assay (*Applied Biosystems*) and 300 ng of total RNA, with final volume of 15 µL. The thermocycler conditions were 16°C for 30 minutes, 42°C for 30 minutes and 85°C for 5 minutes. Before qPCR, the synthesized cDNA for cytokines and miRNAs were submitted to specific multiplex preamplification with TaqMan® PreAmp Master Mix (*Applied Biosystems*).

qPCR was performed in a *StepOnePlus Real Time PCR System 2.2.3* (*Applied Biosystems*), using specific TaqMan® probe for target genes *TNFA* (Hs01113624_g1), *IL1B* (Hs01555410_m1), *IL6* (Hs00985629_m1), *IL12A* (Hs00168405_m1), *IL2* (Hs00174114_m1) and *TGFBR2* (Hs00234253_m1) (*Applied Biosystems Inc*) and two reference genes, *ACTB* (*Catalog#: 4352935E*) and *GAPDH* (*Catalog#: 4352934E*), and for target miRNAs hsa-miR-103a-3p (Hs000439), hsa-miR-181c-5p (Hs000482), hsa-miR223-3p (Hs002295), hsa-miR-370-3p (Hs002275) and hsa-miR-375 (Hs000564) (Table 2) and for controls RNU6B (Hs001093) and RNU48 (Hs001006) (*Applied Biosystems Inc*). All reactions for cytokines and receptor genes and for miRNAs were performed in triplicate. The protocols followed the manufacturer's instructions (*Applied Biosystems* and *Promega*, respectively). Relative quantification (RQ) of mRNA and miRNA was obtained according to the model proposed by Livak & Schmittgen (2001) (34) and normalized to the references and a pool of Hp- normal mucosa samples. The RQ was expressed as median (range).

2.4 Immunohistochemistry assay

Immunohistochemical analysis was performed to four samples from normal gastric mucosa, 15 samples from the Hp- group and 24 samples from the Hp+ group before and after *H. pylori* treatment which 14 eradicated and 10 did not eradicated this bacterium. Consecutive 4 µm-thick sections were cut from each paraffin block. Deparaffinized and rehydrated tissue slides were subjected to antigen retrieval in Sodium Citrate Buffer pH 6.0, using a high-temperature antigen-unmasking technique, and subsequent inactivation of endogenous peroxidase with hydrogen peroxide 3%. The sections were incubated with specific primary antibodies at 4°C overnight: rabbit polyclonal TNF alpha antibody (NB600-587, 1:200 dilution; *Novus*

Biologicals), rabbit polyclonal IL1 beta antibody (NB600-633, 1:200 dilution; *Novus Biologicals*), rabbit polyclonal IL6 antibody (NB600-1131, 1:400 dilution; *Novus Biologicals*), rabbit monoclonal IL2 antibody (NBP1-40687, 1:250 dilution; *Novus Biologicals*), rabbit polyclonal TGF beta Receptor II antibody (NBP1-19434, 1:100 dilution; *Novus Biologicals*) and rabbit monoclonal IL-12 alpha antibody (TA310616, 1:500 dilution; *OriGene*). Then the slides were incubated with biotinylated secondary antibody and HRP polymer conjugate of the commercial kit PicTure™-MAX Polymer (*Invitrogen*) for 30 minutes, following the manufacturer's protocol. Immunostaining was done with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) containing 0.005% H₂O₂, counterstained with hematoxylin. All experiments had a negative control consisting of a section incubated only with primary antibody diluent (*Leica*) without using the primary antibody.

The immunostaining was evaluated by adept pathologist in the epithelial cytoplasm for all proteins, in addition to stroma for IL-6 and inflammatory cells for the others proteins. The expression was classified as negative when the marking was absent or weak and positive when moderate or strong.

2.5 miRNAs and proteins interaction networks

The prediction of targets regulated by miRNAs was performed using bioinformatics tool mirDIP, microRNA Data Integration Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (35). The following, miRNAs and target genes identified have been integrated into protein interaction networks. In the analysis, we use the tools: String (version 9.1) (36) and GeneMANIA (version 3.2) (37). The analysis, integration and network visualization were performed by Cytoscape (version 3.1.1) (38). The biological function of genes was identified using the tool BiNGO in the Cytoscape (version 3.0.2) (39).

2.6 Statistical Analysis

The data were analyzed using the box-plot graphic method for outliers detection (40), which were removed from the subsequent analyses. The distribution of continuous data was evaluated using the D'Agostino & Pearson normality test. Wilcoxon Signed Rank test was used to assess an increase or decrease in mRNA or miRNA expression, considering the value one as the theoretical median of the Hp- normal samples, used as calibrator in $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method (34). Mann-Whitney test was used for comparisons mRNA or miRNA expression among Hp-, Hp+ before treatment and after treatment eradicated and non-eradicated groups. To evaluate the association between *cagA* and *vacA* genotypes with eradication rate it was employed Fisher Exact test, and the comparisons of RQ median values of the Hp+ group before treatment and influence of these genotypes was performed using Mann Whitney test. The

comparisons of relative expression in the Hp+ before treatment, eradicated and non-eradicated patients with histological types of lesion were evaluated by Kruskal-Wallis test followed, if significant, by Dunn's test. The protein expression was compared among groups by the Fisher Exact Test. The correlation between mRNA and miRNA expression in all groups and between mRNA expression of the genes evaluated was analyzed using Pearson's Correlation after logarithmic transformation of the RQ values. The relation between protein and miRNA expression was taken by Mann Whitney test. Values $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1 Molecular diagnosis for *cagA* and *vacA* genotypes and bacterial eradication rate

Of the 31 individuals Hp+, 22 were genotyped for the *cagA* and *vacA* genotypes. These 45.4% (10/22) were *cagA*-positive, 40.9% (9/22) *vacA s1m1* and 59.1% (13/22) presented other genotypes of *vacA* as *s1m2*, *s2m2*, *s1_*, *s2_* and *_m1*. Of the *cagA*-positive and *cagA*-negative samples about 60% eradicated the bacterium, thus no significant difference was observed between the groups eradicated and non-eradicated ($p=1.000$) (Table 3). Similarly the bacterial eradication rate was not influenced by *vacA* polymorphisms ($p=0.380$) (Table 3), as well as the compound genotype *cagA+ / vacA s1m1* and other combinations also did not influence the rate of eradication of bacteria ($p=0.3401$).

3.2 mRNA expression of *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* and *TGFBR2* before and after eradication therapy of *H. pylori*

mRNA expression of *TNFA*, *IL6*, *IL12A* and *IL2* were significantly increased in the Hp+ group before treatment in comparison with Hp- group (Table 4), while for *IL1B* and *TGFBR2* not difference was observed ($p > 0.050$).

After treatment only *TNFA* and *IL6* presented mRNA expression significantly reduced in the patients that eradicated the bacterium (RQ=1.44, $p < 0.001$ and RQ=2.90, $p=0.029$, respectively) (Figures 1A and B). For *IL1B* and *IL12A* (Figure 1C and D) there was no significant difference in the expression levels of the mRNA after eradication of *H. pylori* in comparison with Hp+ group before treatment ($p=0.141$ and 0.992, respectively). Contrary, *IL2* and *TGFBR2* showed reduced mRNA expression in Hp+ group before treatment (RQ= 0.65 and 0.62, respectively) (Figure 1E and F) and basal expression for eradicated patients (RQ= 1.04 and 0.80, respectively).

When the groups were stratified according to histological type of lesion no significant difference was observed for comparisons of expression levels of the evaluated genes (Table S1-supplementary material). Similarly, the presence of *cagA* genotype and the *vacA*

polymorphisms no influenced the relative gene expression levels of these genes for the Hp+ group before treatment (Table S2-supplementary material).

3.3 Expression of miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370 and miR-375 is increased after bacterium eradication

In general, all miRNAs were downexpressed in both Hp- and Hp+ groups without statistical difference (Table 5). However the miR-103, miR-181c, miR-370 and miR-375 presented a significant increase in the relative expression after bacterium eradication (Figure 2A, B, C and D). Except the miR-223 that showed increased expression in the Hp+ group before treatment (RQ= 0.89) compared to Hp- group (p=0.001) (Figure 2E), however was not observed significant differences between the patients before and after eradication of *H. pylori* (p= 0.177).

Regarding the analysis comparing miRNAs expression with histological type of lesions only miR-375 showed significantly increased expression in metaplastic atrophic gastritis (MAG) subgroup in relation to chronic gastritis (CG) (RQ= 0.19 and 0.12, respectively; p=0.041) (Table S3-supplementary material). With respect to *cagA* genotype and polymorphisms of *vacA*, higher expression was observed in the *vacA s1m1* (RQ= 0.17) compared to *vacA* others (RQ= 0.07) for miR-181c (p=0.018). The others comparisons showed no significant differences (Table S4-supplementary material).

3.4 Protein expression: location and cell type

Expression of TNF- α protein in normal mucosa was strong and restricted to the cytoplasm of foveolar epithelium cells (Figure 3A). In Hp- (Figure 3B) and Hp+ before treatment groups (Figure 3C) was observed a progressive increase in its expression in the foveolar epithelium cytoplasm and also in inflammatory cells. After treatment a similar immunostaining pattern those before treatment was observed for both eradicated (Figure 3D) and non-eradicated (Figure 3E) patients. These results show that the elevated expression of *TNFA* mRNA observed in Hp+ group is due mainly to the expression of this protein by inflammatory cells.

For IL-6, immunostaining was predominantly strong in the stroma in all groups (Figure 3F-H, J) except after treatment eradicated (Figure 3I) that showed lower expression that not eradicated (p=0.036; Figure 3J). In Hp- (Figure 3G) and Hp+ before treatment groups (Figure 3H) some cases also showed immunostaining in the foveolar epithelium cytoplasm, which was not observed in the after eradication group (Figure 3I). The reduced expression of this protein in both the stroma and epithelium in the eradicated group confirms the significant reduction presented in mRNA expression.

IL-1 β protein showed positive expression in the foveolar epithelium cytoplasm in about half of the samples of normal mucosa (Figure 3K) and Hp- groups (Figure 3L). In Hp+ group before treatment (Figure 3M) similar proportion was observed for the epithelium although there was also strong expression in inflammatory cells. After treatment (Figure 3N and O) the most of cases presented weak or absent immunostaining in the epithelium and inflammatory cells despite no significant differences was observed between before treatment and eradicated groups, nor between eradicated and not eradicated. These results are consistent with the mRNA expression which did not show significant differences between groups.

IL-12-p40 protein showed frequently weak or absent immunostaining in the foveolar epithelium cytoplasm in normal mucosa (Figure 4A) and Hp- group (Figure 4B). Hp+ group before treatment (Figure 4C) had a higher frequency of cases with positive expression in the epithelium and also expression in inflammatory cells. After treatment, eradicated group (Figure 4D) showed no significant reduction of expression in the epithelium, but kept the same expression of Hp+ group in inflammatory cells. Increased mRNA expression in Hp+ group before treatment should be due to high protein expression in both the epithelium and inflammatory cells.

IL-2 protein showed strong immunoreactivity in normal mucosa (Figure 4F) with staining restricted to the foveolar epithelium cytoplasm although it is weak or absent in Hp- group (Figure 4G). Hp+ group before treatment (Figure 4H) showed strong expression in the foveolar epithelium cytoplasm and inflammatory cells. After eradication (Figure 4I) was observed significant reduction in the number of positive cases in the epithelium ($p=0.0122$) but with high expression in inflammatory cells. The increase in *IL2* mRNA expression observed in Hp+ group compared to Hp- should be the highest expression of this protein in both the epithelium and inflammatory cells.

The type II receptor of TGF- β presented weak or absent expression in foveolar epithelium cytoplasm in the majority of normal mucosa cases (Figure 4K). Hp- group (Figure 4L) showed strong expression in the foveolar epithelium and in some cases also immunostaining of inflammatory cells, while the Hp+ group before treatment (Figure 4M) presented predominance of weak or absent expression in the foveolar epithelium and strong expression was seen in inflammatory cells, of about 40% of cases. Reduction in protein expression of foveolar epithelium was observed after *H. pylori* eradication ($p=0.032$; Figure 4N), although inflammatory cells expression remained high, which must have contributed to the significant increase in mRNA expression in the eradicated group.

3.5 Interaction between mRNA and protein with miRNA

Only the Hp+ group before treatment presented inverse relationships between the expression levels of mRNA and miRNA. Expression of *TNFA* mRNA was negatively correlated with miR-103 ($r = -0.46$; $p=0.016$), miR-181c ($r = -0.39$; $p=0.042$) and miR-370 ($r = -0.67$; $p<0.001$). Whereas the expression of miRNAs and proteins, inverse relationships was observed between TGF- β -RII and miR-103 ($p=0.018$), and between IL-12-p40 and miR-370 ($p=0,017$), i.e. increased miRNA expression is associated with lower expression of the protein. Some relationships range between the groups as, for example, *TNFA* mRNA and miRNAs miR-103 and miR-370 and between TGF- β -RII protein and miR-103, which presented negative and positive relationships for the Hp+ group before treatment and Hp- group, respectively.

Protein interaction network showed one relationship between the inflammatory mediators evaluated (Figure 5), whereas the present study showed a strong correlation ($r = +0.55$ to $+0.95$; $p<0.050$) among these genes in the Hp- and Hp+ before treatment groups. In this network, inverse relationship between the expression of TGF- β -RII protein and miR-103 is demonstrated (Figure 5 – continuous line). Some interactions demonstrated in the network were not found in this study. Furthermore, our results indicated other possibilities of interaction (dotted line) as miRNAs miR-103, miR-181c and miR-370 and the *TNFA* gene and the miR-370 with IL-12-p40 protein encoded by the *IL12A* gene (Figure 5).

4. Discussion

This is the first study that evaluated the effect of treatment of *H. pylori* on the mRNA and protein expression levels of *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* and *TGFBR2* and of the miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370, miR-375 and miR-223 in patients with gastric lesions infected by *H. pylori*, besides the influence of bacterial virulence factors. Our data showed upregulated mRNA expression for *TNFA*, *IL6*, *IL1B* and *IL12A* and downregulated for *IL2* and *TGFBR2* in infected patients before treatment, while in non-infected patients *TNFA* and *IL1B* presented increased expression and *IL2* and *TGFBR2* reduced. After treatment, *TNFA* and *IL6* mRNA were significantly reduced in those patients who eradicated the bacteria, but not in non-eradicated patients, whereas *TGFBR2* had their expression levels increased. Concerning protein expression, in the group of infected patients before treatment all of them showed immunostaining in the epithelium and inflammatory cells except IL-6 that presented mainly stromal immunostaining. Unlike mRNA expression, only IL-2 and TGF- β -RII had significantly reduced protein expression after bacterium eradication in the epithelial cells, but not in inflammatory cells. miRNAs showed decreased expression either for the Hp- as Hp+

groups before treatment, excepting miR-223 that had basal expression in the infected patients before treatment. Contrary, the expression of the miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370 and miR-375 was significantly increased after *H. pylori* eradication. Correlation and networks analysis indicates that proteins evaluated interact with each other and with the miRNAs and that may be associated with the pathological process in the presence of *H. pylori*. Thus, our results evidence that the eradication of bacterium is important in the restoration of expression levels of certain cytokines and miRNAs that regulate the inflammatory process. Despite we did not observe influence of genotypes of bacterial virulence *cagA* and *vacA* on expression levels of markers evaluated.

TNF- α plays an important role in mediating chronic inflammation and development of malignant neoplasias (41). In this study, *TNFA* transcripts presented overexpressed in the Hp+ group before treatment with significant reduction after bacterial eradication, but maintaining still high levels in the non-eradicated patients. Immunohistochemical data suggest that the upregulation mRNA in the Hp+ group occur mainly by inflammatory cells. High expression of *TNFA* mRNA was also observed in *H. pylori* infected patients compared with non-infected in peptic ulcer (42) and in gastric cancer (43). Furthermore, gastric cancer cell lines secrete larger amount of TNF- α protein into the culture supernatant after infection with *H. pylori* regardless of *cagA* genotype (43) and greater expression of this cytokine was also observed in peripheral blood mononuclear cells obtained from infected patients compared to non-infected (44). Progressive increase in the mRNA and protein expression of TNF- α was observed in normal mucosa to chronic gastritis, intestinal metaplasia and dysplasia, so that this cytokine was associated with progression of lesions cascade to gastric cancer independently of *H. pylori* (45). In this way explaining the increased level of mRNA observed also in non-infected patients in our study. After eradication, reduction in expression of *TNFA* was also reported by Lee et al. (2010) (46) that moreover found significant reduction in infiltration of neutrophils and mononuclear cells. Furthermore, *H. pylori* presents a virulence factor named Tip- α (*TNF- α -inducing protein*) able to strongly induce the TNF- α expression by NF- κ B activation, so that elimination of this bacterium results in induce weak expression of this cytokine in the host (47). Therefore, high expression of TNF- α triggered by *H. pylori* contributes to the gastric cancer development and decrease in expression after eradication indicate a better prognosis.

Similarly TNF- α , IL-6 is related to the chronic phase of gastric inflammation and atrophic changes (48). This pro-inflammatory interleukin presented higher mRNA level among the cytokines evaluated in the Hp+ group before treatment with a significant reduction

after eradication of bacteria, but still significantly higher than non-infected patients. Immunostaining protein predominated in the stroma, but after bacterial eradication the decreased mRNA expression led consequently to a reduction of protein expression both the epithelium and stroma. IL-6 mRNA and protein expression was reported increased in macrophage cell line and peripheral blood mononuclear cells in *H. pylori* infected compared to non-infected (43, 44). However, overexpression of IL-6 protein in gastric cancer was not associated with the *H. pylori* presence (49). Unlike our results that demonstrated strong immunostaining in the normal mucosa stroma, Yin et al. (2013) (50) found weak expression of IL-6 in normal mucosa adjacent to the tumor. Concerning treatment effect, Ando et al. (1998) (51) showed that IL-6 expression assumes values close to Hp- individuals six months after bacterial eradication in patients with duodenal ulcer, while Serelli-Lee et al. (2012) (52) observed that the high concentration of this cytokine in the Hp+ group did not change after treatment.

IL-1 β is essential for the host innate response against infection and so exerts tissue damage during acute and chronic diseases (53, 54). Its expression is increased in patients with severe gastritis and correlated with the gastritis activity (55), which agrees with the increased mRNA and protein expression observed in Hp- gastritis patients. This indicates that the overexpression may also be consequence to the presence of inflammation due to gastritis regardless of bacterial infection. We also observed high expression of *IL1B* mRNA in the Hp+ gastritis patients before treatment and remained elevated after bacterial eradication. No significant difference between the groups was also observed for protein expression, which showed positive immunostaining in both Hp- and Hp+ groups. Several studies have shown increased gene and protein expression of this cytokine as a consequence of *H. pylori* infection (43, 56, 57). Serelli-Lee et al. (2012) (52) found significantly higher concentrations of IL-1 β protein in gastric biopsies Hp+ and after eradication treatment compared to without *H. pylori* infection group. Study with animal experiments in null mice showed that IL-1 β protein increases inflammation and the number of gastric tumors, whereas its absence decreases the number of proliferating cells and increases apoptosis in gastric epithelial cells, so that the induction of this cytokine by *H. pylori* affects the early stages of gastric carcinogenesis (57). Taken together these results indicate that *H. pylori* can potentiate the IL-1 β production during infection in conjunction with the inflammation of gastritis.

IL-12 is critical for the development of protective immune response against *H. pylori* because it promotes the differentiation of T_h0 to T_h1 cells (58). Although there are no reports about the expression of this cytokine in patients after bacterial eradication, several studies

have shown increased IL-12 expression in the gastric mucosa of *H. pylori* infected individuals (59-61). In the present study, *IL12A* mRNA presented increased expression similarly before and after treatment in the eradicated and non-eradicated patients, but lower expression in the Hp- group. Likewise was observed positive immunostaining of protein in Hp+ patients both before and after treatment, while the Hp- patients presented frequently weak immunostaining. However, although *H.pylori* plays an important role in inducing expression of this cytokine, some studies have not shown this relationship. In AGC and MKN-28 cell lines infected with *H. pylori*, Al-Sammak et al. (2013) (62) found basal levels of *IL12A* after 24 and 48 hours of stimulation. Moreover, these authors also detected IL-12 immunostaining in gastric epithelial cells and immune cells of patients with gastritis regardless of *H. pylori* infection (62). Maintenance of the high IL-12 expression after treatment is probably due to its role in the induction of cellular adaptive response.

In addition, our results revealed decreased expression of *IL2* and of *TGFBR2* in *H. pylori* infected and non-infected patients, however after treatment *IL2* showed basal expression. Immunohistochemistry analysis revealed positive immunostaining in both epithelial and inflammatory cells in the Hp+ patients before treatment and significant decrease in their expression after eradication only in the epithelial cells, but high expression in inflammatory cells, indicating a possible role of this cytokine in the infection by *H. pylori*. IL-2 is produced by activated T cells that acts in an autocrine mode and causes the proliferation of antigen specific T cells, thus contributing to the adaptive immune response (63). There are few studies relating IL-2 with gastric lesions and *H. pylori*. Bamford et al. (1998) (64) showed that this cytokine induces gastric atrophy associated to *H. pylori* by the regulation of T_H1 immune response. Studies evaluating the association between VacA bacterial cytotoxin and IL-2 expression are discordant, so that some demonstrated that this cytotoxin blockade the *IL2* transcription (65, 66) while others showed only modest effect on the your secretion (15). To our knowledge this is the first study to show the IL-2 protein location in patients with gastritis infected and non-infected by *H. pylori* and after eradication treatment.

TGF- β -R2 is one of the main types of receptor for TGF- β , an anti-inflammatory cytokine with function of tumor suppressor (67, 68). In the present study, this receptor showed reduced expression in patients Hp+, but with an increase after the eradication treatment. Immunohistochemical analysis showed decrease in the foveolar epithelium expression after eradication, although the expression in inflammatory cells remained high, which may have contribute to the significant increase in mRNA expression. Mutations in this

receptor are related to changes in TGF- β signaling (69). Mice defective for this signaling infected by *H. pylori* develop gastric adenocarcinoma whereas the wild mice only develop chronic gastritis, indicating that the normal TGF- β signaling can suppress or delay gastric carcinogenesis (70). Gastric cardia adenocarcinoma present lower expression of this receptor compared to normal mucosa (71, 72). Alteration in the TGF- β -RII expression can lead to a deregulation of TGF- β signaling impairing homeostasis and increasing the tissue inflammation (73). Therefore, the change of mRNA and protein expression observed in this study after elimination of *H. pylori* may be important for maintenance of the TGF- β signaling and gastric mucosa protection.

Overall, our data of mRNA and protein expression show that only the bacterial clearance is not sufficient to restore expression of these inflammatory mediators in a short time period. Likewise, a follow up study of patients treated showed that acute inflammation disappeared soon after treatment, whereas chronic inflammation was still present, although significantly lower, 12 years after the *H. pylori* eradication (74). Furthermore, Romero-Gallo et al. (2008) (75) observed in experimental model that reducing the infiltration of mononuclear cells and IFN- γ levels after *H. pylori* eradication are related to the time that this pathogen remained in the host stomach before treatment. In this respect, most individuals in developing countries are infected during childhood (76, 77), thus is plausible that the individuals evaluated in the present study are carries of longtime chronic infection, which may have hindered the response to treatment for restoring cytokines expression evaluated.

Cytokines and their receptors are not the only mediators involved in chronic inflammation process triggered by *H. pylori* infection. Recent studies have shown that the pathogen presence affects the global expression of miRNA in the gastric mucosa so related to the host immune and inflammatory response (26). In fact, evaluation of miRNA expression in gastritis with or without *H. pylori* infection and the effect of eradication therapy are important for the understanding of transcriptional changes resulting from the presence of this bacterium in gastric mucosa. The miRNAs, miR-103, miR-181c, miR-370, miR-375 and miR-223 evaluated in this study were selected because of their involvement in the regulation of inflammatory process and gastric carcinogenesis.

All miRNAs analyzed had low expression levels excepting miR-223, in both *H. pylori*-infected and non-infected patients, although after treatment the expression levels were increased mainly in the eradicated patients. miR-103 is an oncogenic miRNA involved in tumor invasion and lymph node metastasis (78). Matsushima et al. (2011) (24) analyzing non-cancerous gastric mucosa observed that the miR-103 presented downexpression in *H. pylori*-

infected individuals compared to non-infected. However, unlike our study, these authors found no significant change in the expression of this miRNA after *H. pylori* eradication (24). Reduced expression of this miRNA was also observed in atrophic gastritis and intestinal metaplasia regardless of the infection by *H. pylori* (79). In gastric cancer, most studies showed that the miR-103 has increased expression (80, 81). This different expression profile between gastric cancer and gastric mucosa Hp+ indicating that this miRNA might act differently in the stages of gastric carcinogenesis.

The miR-181c is considered as a tumor suppressor because has anti-apoptotic protein as validated target (82). This is the first study to assess the influence of *H. pylori* in gastric lesion on the expression of this miRNA. In gastric cancer the results are discordant. Hashimoto et al. (2010) (83) showed reduced expression of this miRNA in gastric cancer compared to adjacent non-cancerous mucosa and observed that the transfection of cell lines with Pre-mir-181c leads to reduced growth and repression of oncogenes. Conversely, other studies have shown increased expression of miR-181c in this neoplasia (84-87) directly correlated with a greater degree of tumor differentiation, depth of invasion and lymph node metastasis (86). Furthermore, miR-181c expression is significantly higher in tumor tissue than gastric ulcer and chronic gastritis (87). Therefore, the relationship of miR-181c with *H. pylori* infection and gastric lesions need to be further investigated to achieve conclusive results.

H. pylori and its virulence genotype *cagA* gradually inhibit miR-370 expression from superficial gastritis to metaplastic atrophic gastritis and to gastric cancer, which leads to overexpression of its target *FoxM1*, and results in increased cell proliferation (88). Our study showed reduced expression of miR-370 in the Hp+ group before treatment with significant increase in expression levels after bacterium eradication. Downregulation of the miR-370 expression was associated with gastric cancer and poor prognosis (89, 90). However, Fan et al. (2013) (91) observed increased expression of miR-370 in gastric cancer compared to the adjacent mucosa and this increase has been associated with cell proliferation having an important role in the promotion and progression of gastric cancer. Overexpression has also been associated with increased migration of gastric cancer cells to break TGF β signaling since the TGF β receptor type II is a target of miR-370 (92). Thus, more studies are needed to conclude on the miR-370 effect in inflammation triggered by *H. pylori* and the early stages of gastric carcinogenesis.

The miR-375 is considered to be a tumor suppressor factor because it inhibits proliferation and induces apoptosis (93, 94). In the present study, the *H. pylori* eradication resulted in the significant increase in its expression. Shiotani et al. (2012) (95) also reported

increased expression of miR-375 after eradication of *H. pylori* in patients with atrophic gastritis and gastric ulcer. Unlike, Matsushima et al. (2011) (24) reported no significant change in the expression of this miRNA after bacterium elimination, although Hp+ group had a significantly reduced expression compared to Hp- group. In agreement with this data, studies *in vitro* and *in vivo* show that *H. pylori* infection may contribute to the reduction in the miR-375 expression (96, 97). In gastric cancer, miR-375 is one of the most often downregulated (84, 93, 97-100) resulting in increased tumor metastasis, invasion (100), proliferation (93, 99) and reduction of apoptosis (94). Therefore, miR-375 plays an important role in gastric carcinogenesis induced by *H. pylori* may be a possible therapeutic target.

Similarly miR-103, the miR-223 is considered an oncogene associated with formation of gastric tumors (101). Our study showed higher expression levels of this miRNA in relation to the other evaluated in the Hp+ patients before treatment, while the Hp- patients presented lower expression. Matsushima et al. (2011) (24) found 5-fold increase in miR-223 expression in the antral mucosa infected by *H. pylori* compared to without infection, and similarly our study, no significant change in its expression after pathogen elimination was observed. However, Shiotani et al. (2012) (95) observed decreasing of expression of this miRNA one year after *H. pylori* eradication in gastric cancer, chronic gastritis and ulcer. In addition, regardless of *H. pylori* infection, miR-223 was overexpressed in chronic gastritis and intestinal metaplasia showing a positive correlation with activity and chronic inflammation (79). In gastric cancer, overexpression was associated with *H. pylori* infection, poor prognosis (102), promoting metastasis (103), increase in cell proliferation and inhibition of apoptosis (104). The relationship of miR-223 with gastric carcinogenesis is still inconclusive and further studies are warranted given the potential of this miRNA as a therapeutic target in this type of cancer.

Deregulation in the miRNAs expression by *H. pylori* may contribute to its subvert the host immune response (26) and one possible way is through the action of these miRNAs on mRNAs of pro and anti-inflammatory cytokines (105). When we assess expression of mRNA and proteins of inflammatory mediators in relation to miRNAs expression we observed only some negative correlations in the Hp+ group before treatment. *TNFA* expression was negatively correlated with miR-103 and miR-181c, which have this gene as a predicted target (106-108), and miR-370, which is not predicted. Concerning proteins, expression of TGF- β -RII and of IL-12-p40 were inversely related to miR-103 and miR-370, respectively, and the first relationship is predicted in public database (106). Interestingly, the correlation between *TNFA* mRNA and both miR-103 and miR-370 and between TGF- β -RII protein and miR-103

were observed as negative in the infected patients and positive in the non-infected patients. This indicates that these miRNAs and inflammatory mediators may be associated with the pathological process in the presence of *H. pylori*, but not influence in the infection absence. Network analysis reinforces the findings of the correlation analysis that proteins interact with each other and with the miRNAs in the inflammatory cascade triggered by *H. pylori*.

To determine whether the virulence factors *cagA* and *vacA* influence mRNA and miRNA expression we evaluated the associations between these factors. In general, no significant difference was found in the mRNAs and miRNAs expression between individuals carrying the *cagA*⁺ strains or *vacA s1m1* in relation to *cagA*⁻ and *vacA* others, with the exception of miR-181c, which presented 2.4-fold higher expression in carriers of *vacA s1m1*. Studies associating virulence genotypes of *H. pylori* with gene e protein expression are controversial. Some studies indicate that the secretion of IL-8, TNF- α and IL-1 β and the mRNA expression of IL-12 are higher in individuals infected with *cagA*⁺ strains (61, 109-111). On the other hand, other studies showed that the presence of this genotype and of different polymorphism of *vacA* did not influence the expression of gene *TNFA* (112) and *IL12A* (60) nor of proteins IL-6, IL-12, TNF- α and IL-1 β (113, 114). With respect to miRNAs, the presence of *cagA* genotype was associated with a reduction in miR-370 expression (88), thus this is the first study that reports the *vacA* genotype influences on the miR-181c expression.

In addition, we also investigated whether there is an association between *cagA* and *vacA* and bacterial eradication rate and did not observe any influence of the presence of *cagA* nor *vacA* polymorphisms on this parameter. Several studies indicate that the therapeutic success depends on many factors such as bacterial susceptibility to antibiotics (115), the host genotype (116), compliance of patients and virulence genotypes of *H. pylori* (117). In most cases, eradication is more efficient in strains *cagA*⁺/*vacAs1* (117, 118), although lack of association has also been found (119, 120). The relationship between *cagA* and eradication should be due the association of this genotype with accelerated growth since antibiotics act during cell division (10, 121). In this context, we must consider some limitations of our study, due to the reduction of the number of patients in the subgroup stratification after treatment, which may have contributed during the statistical analysis of *cagA* and *vacA* genotypes.

In conclusion, our results show deregulation in the expression of the important inflammatory mediators and miRNA as a consequence to *H. pylori* infection and changes of these patterns after bacterium eradication in the majority miRNAs and cytokines evaluated. Our data indicate that eradication therapy interferes on the genes, proteins and miRNAs

expression in the gastric mucosa, which participate in interaction networks and are potentially addressed by control of miRNAs.

5. References

1. SALAMA, N.R.; HARTUNG, M.L.; MÜLLER, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, p. 385-399, 2013.
2. WILSON, K.Y.; CRABTREE, J.E. Immunology of *Helicobacter pylori*: Insights Into the Failure of the Immune Response and Perspectives on Vaccine Studies. **Gastroenterol**, v.133, p.288-308, 2007.
3. CADAMURO, A.C.T. et al. *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs. **World J Gastroenterol**, v.20, p.1424-1437, 2014.
4. KANDULSKI, A.; SELGRAD, M.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* infection: A clinical overview. **Digest Liver Dis**, v.40, p.619–626, 2008.
5. BAUER, B.; MEYER, T.F. The human gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with gastric cancer and ulcer disease. **Ulcer**, v.2011, p.1-23, 2011.
6. BORNSCHEIN, J.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer. **Dig Dis**, v.32, p.249-264, 2014.
7. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Schistosomes, Liver Flukes, and *Helicobacter pylori*. Lyon: IACR, 1994.
8. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Biological agents, IARC monographs, vol. 100B. Lyon: IARC; 2012
9. WANG, F. et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Cancer Lett**, v.345, p.196-202, 2014.
10. CENSINI, S. et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, p.14648-14653, 1996
11. BACKERT, S. et al. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol**, v. 2, p.155-164, 2000
12. LI, N. et al. Proliferative and apoptotic effects of gastric epithelial cells induced by coccoid *Helicobacter pylori*. **J Basic Microbiol**, v. 53, p. 147-55, 2013.
13. BRANDT, S. et al. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. **Proc Natl acad Sci USA**, v.102, p.9300-9305, 2005.

14. ZHENG, P.Y.; JONES, N.L. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. **Cell Microbiol**, v.5, p.25-40, 2003.
15. SUNDRUD, M. S. et al. L. Inhibition of primary human T cell pro-liferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 7727–7732, 2004.
16. RASSOW, J.; MEINECKE, M. *Helicobacter pylori* VacA: a new perspective on invasive chloride channel. **Microbes Infect**, v. 14, p. 1026–1033, 2012.
17. BASSO, D. et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. **Gastroenterol**, v. 135, p. 91-99, 2008.
18. HOFMAN, V.J. et al. Gene expression profiling in human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. **Modern Pathology**, v.20, p. 974–989, 2007
19. YANG, Z-M.; CHEN, W-W.; WANG, Y-F. Gene expression profiling in gastric mucosa from *Helicobacter pylori*-infected and uninfected patients undergoing chronic superficial gastritis. **PLoS One**, v.7, e33030, 2012
20. KANG, C. et al. Epigenetics: An emerging players in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v.20, p.6433-6447, 2014.
21. BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v.116, p.281-297, 2004.
22. VIRTUE, A.; WANG, H.; YANG, X-F. MicroRNAs and Toll-like Receptor/Interleukin-1 Receptor Signaling. **J Hematol Oncol**, v.5, p.1-17, 2012.
23. RANJHA, R.; PAUL, J. Micro-RNA is inflammatory diseases and as a link between inflammation and cancer. **Inflamm. Res**, v.62, p.343-355, 2013.
24. MATSUSHIMA, K. et al. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Int J Cancer**, v. 128, p.361-370, 2011.
25. XU, Z. et al. miR-365, a Novel Negative Regulator of Interleukin-6 Gene Expression, Is Cooperatively Regulated by Sp1 and NF-kB. **J Biol Chem**, v. 286, p.21401-21412, 2011.
26. NOTO, J.M.; PEEK, R.M. The role of microRNAs in *Helicobacter pylori* pathogenesis and gastric carcinogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.1, p.1-19, 2012.
27. WANG, J. et al. Gastric atrophy and Intestinal Metaplasia before and after *Helicobacter pylori* Eradication: A Meta-Analysis. **Digestion**, v. 83, p. 253-260, 2011.
28. LEE, Y-C. et al. The benefit of eradication of *Helicobacter pylori* infection: a community-based study of gastric cancer prevention. **Gut**, v.62, p.676-682, 2013.

-
29. MASSARRAT, S. et al. Precancerous conditions after *H. pylori* eradication: a randomized double blind study in first degree relatives of gastric cancer patients. **Arch Iran Med**, v. 15, p. 664-9, 2012
30. DIXON, M.F. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. Internacional Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol**, v.20, p.1161-1181, 1996.
31. ROSSI, A.F.T. et al. Deregulation of Annexin-A1 and Galectin-1 Expression in Precancerous Gastric Lesions: Intestinal Metaplasia and Gastric Ulcer. **Mediators Inflamm**, v.2014, p.1-11, 2014.
32. SCHOLTE, G.H. et al. Polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. **Diagn Mol Pathol**, v.6, p.238-243, 1997.
33. GATTI L.L. et al. *cagA vacA* alleles and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. **Diagn Micr Infec Dis**, v. 51; p. 231-235, 2005.
34. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. **Methods**, v. 25, p.402-408, 2011.
35. SHIRDEL, E.A. et al. NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. **PLoS One**, v.6:e17429, 2011.
36. FRANCESCHINI, A. et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Res**, v.41 (Database issue), p.D808-815, 2013.
37. MONTOJO, J. et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. **Bioinformatics**, v.26, p. 2927-2928, 2010.
38. CHEN, R. et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. **Cell**, v.148, p.1293-1307, 2012.
39. MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. **Bioinformatics**, v.21, p.3448-3449, 2005.
40. MOROCO, J. (2003), Análise Estatística de dados – com utilização do SPSS, Edições Sílabo, Lisboa, pág. 36.
41. SZLOSAREK, P.W.; BALKWILL, F.R. Tumor necrosis factor α : a potential target for the therapy of solid tumours. **Lancet Oncol**, v.4, p.565-563, 2003.
42. GOLL, R. et al. *Helicobacter pylori* stimulates a mixed adaptative immune response with a strong T-regulatory component in human gastric mucosa. **Helicobacter**, v.12, p.185-92, 2007.

-
43. ZHAO, C. et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori*. **BMC Cancer**, v.10: 419, 2010.
44. ZHANG, S. et al. Human Immune Responses to *H. pylori* HLA Class II Epitopes Identified by Immunoinformatic Methods. **PLoSOne**, v.9, e94974, 2014.
45. SENTHILHUMAR, C. et al. Molecular and histological evaluation of tumor necrosis factor-alpha expression in *Helicobacter pylori*-mediates gastric carcinogenesis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.137, p.577-583, 2011.
46. LEE, E.S. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* Increases Ghrelin mRNA Expression in the Gastric Mucosa. **J Korean Med Sci**, v.25, p.265-271, 2010.
47. SUGANUMA, M. et al. Human gastric cancer development with TNF- α -inducing protein secreted from *Helicobacter pylori*. **Cancer Lett**, v.322, p.133-138, 2012.
48. SUGIMOTO, M. et al. Helicobacter pylori outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, p. 1677-1684, 2011.
49. NECULA, L.G. et al. IL-6 and IL-11 as Markers for Tumor Aggressiveness and Prognosis in Gastric Adenocarcinoma Patients without Mutations in Gp130 subunits. **J Gastrointestin Liver Dis**, v.21, p.23-29, 2012.
50. YIN, Y. et al. The nuclear factor- κ B correlates with increased expression of interleukin-6 and promotes progression of gastric carcinoma. **Oncol Rep**, v.29, p.34-38, 2013.
51. ANDO, T. et al. Differential Normalization of Mucosal Interleukin-8 and Interleukin-6 Activity after *Helicobacter pylori* Eradication. **Infect Immun**, v.66, p.4742-4747, 1998.
52. SERELLI-LEE, V. et al. Persistent *Helicobacter pylori* Specific Th17 responses in Patients with Past *H. pylori* infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1 β . **PLoSOne**, v.7: e39199, 2012.
53. TSANG, Y.T. et al. Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. **J Immunol**, v. 159, p. 4566-4577, 1997.
54. LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth F R**, v.22, p.189-195, 2011.
55. WANG, M. et al. Relation between interleukin-1 beta messenger RNA in gastric fundic mucosa and gastric juice pH in patients infected with *Helicobacter pylori*. **J Gastroenterol**, v. 34, p. 10-17, 1999.
56. GUIRALDES, E. et al. Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.33, p.1270132, 2001.

-
57. SHIGEMATSU, Y. et al. Interleukin-1 β induced by *Helicobacter pylori* infection enhances mouse gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, v.340, p.141-147, 2013.
58. AKHIANI, A.A. et al. Protection Against *Helicobacter pylori* Infection Following Immunization Is IL-12-Dependent and Mediated by Th1 Cells. **J Immunol**, v.169, p.6977-6984, 2002.
59. KARTTUNEN, R.A. et al. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10 and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with *Helicobacter pylori*. **Scand J Gastroenterol**, v.32, p.22-27, 1997.
60. BAUDITZ, J. et al. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. **Clin Exp Immunol**, v. 117, p. 316-323, 1999.
61. HIDA, N. et al. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. **J Clin Pathol**, v.52, p.658-664, 1999.
62. AL-SAMMAK, F. et al. Gastric Epithelial Expression of IL-12 Cytokine Family in *Helicobacter pylori* infection in human: Is it Head or Tail of the Coin? **PLoSOne**, v.8:e75192, 2013.
63. MONACK, D.M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. Persistent Bacterial Infections: the interface of the pathogen and the host immune system. **Nature**, v.2, p.747-765, 2004.
64. BAMFORD, K.B. et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterol**, v. 114, p. 482-492, 1998.
65. BONCRISTIANO, M. et al. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. **J Exp Med**, v. 198, p. 1887-1897, 2003.
66. GEBERT, B. et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science**, v. 301, p.1099-1102, 2003.
67. MIVAZONO, K.; SUZUKI, H.; IMAMURA, T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. **Cancer Sci**, v. 94, p. 230-34, 2003.
68. BESWICK, E.J. et al. Role of Gastric Epithelial Cell-Derived Transforming Growth Factor β in Reduced CD4⁺ T Cell Proliferation and Development of Regulatory T Cells during *Helicobacter pylori* Infection. **Infect Immun**, v. 79, p. 2737-2745, 2011.
69. PARSONS, R. et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. **Cancer Res**, v.55, p.5548-5550, 1995.
70. HAHM, K.B. et al. Conditional loss of TGF-beta signaling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in Mice. **Aliment Pharmacol Ther**, v.16, p.115-127, 2002.

71. GUO, W. et al. Concordant repression and aberrant methylation of transforming growth factor-beta signaling pathway genes occurs early in gastric cardia adenocarcinoma. **Mol Biol Rep**, v.39, p.9453-9462, 2012a.
72. GUO, W. et al. Association of polymorphisms in transforming growth factor- β receptors with susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma. **Mol Biol Rep**, v.39, p.4301-4309, 2012b.
73. HONG, S. et al. Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: Focus on TGF- β signaling. **World J Gastroenterol**, v.16, p.2080-2093, 2010.
74. MERA, R. et al. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v.54, p.1536-1540, 2005.
75. ROMERO-GALLO, J. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric carcinogenesis. **Lab Invest**, v.88, p.328-336, 2008.
76. KODAIRA, M.S.; ESCOBAR, A.M.U.; GRISIS, S. Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection in childhood and adolescence. **Rev Saúde Pública**; v.36, p.356-369, 2002.
77. MIRANDA, A.C.P. et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children of low socioeconomic level in São Paulo. **Sao Paulo Med J**, v. 128, p. 187-191, 2010.
78. KIM, B.H. et al. Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. **J Surg Oncol**, v.107, p.505-510, 2013.
79. ISOMOTO, H. et al. Interwaving MicroRNAs and Proinflammatory Cytokines in Gastric Mucosa with Reference to *H. pylori* Infection. **J Clin Immunol**, v. 32, p. 290-299, 2012.
80. TCHERNITSA, O. et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. **J Pathol**, v.222, p.310-319, 2010.
81. WU, W-Y. et al. Potentially predictive microRNAs of gastric cancer with metastasis to lymph node. **World J Gastroenterol**, v. 17, p.3645-3651, 2011.
82. ZHU, W. et al. miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. **Int J Cancer**, v.127, p.2520-2529, 2010.
83. HASHIMOTO, Y. et al. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.31, p.777-784, 2010.
84. UEDA, T. et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. **Lancet Oncol**, v.11, p.136-146, 2010.
85. AN, J. et al. Mir-23a in amplified 19p13.13 loci targets metallothionein 2A and promotes growth in gastric cancer cells. **J Cell Biochem**, v.114, p.2160-2169, 2013.

86. CUI, M. et al. Association of microRNA-181c expression with the progression and prognosis of human gastric carcinoma. **Hepatogastroenterology**, v.60, p.961-964, 2013a.
87. CUI, M-H. et al. Upregulation of MicroRNA 181c Expression in Gastric Cancer Tissues and Plasma. **Asian Pacific J Cancer Prev**, v.14, p.3063-3066, 2013b.
88. FENG, Y. et al. *FoxM1* is Overexpressed in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Carcinogenesis and Is Negatively Regulated by miR-370. **Mol Cancer Res**, v.11, p. 834-844, 2013
89. YANG, O.; HUANG, J.; LIN, S. Regulatory effects of miRNA on gastric cancer cells. **Oncol Lett**, v.8, p.651-656, 2014.
90. LI, Y. et al. Epigenetic silencing of miRNA-9 is correlated with promoter-proximal CpG island hypermethylation in gastric cancer in vitro and in vivo. **Int J Oncol**, v.45, p.2576-2486, 2014.
91. FAN, C. et al. Upregulation of miR-370 contributes to the progression of gastric carcinoma via suppression of FOXO1. **Biomed Pharmacother**, v.67, p.521-526, 2013.
92. LO, S-S. et al. Overexpression of miR-370 and downregulation of its novel target TGF β -RII contribute to the progression of gastric carcinoma. **Oncogene**, v. 31, p.226-237, 2012.
93. DING, L. et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. **Cell Research**, v.20, p.784-793, 2010.
94. TSUKAMOTO, Y. et al. MicroRNA-375 Is Downregulated in Gastric Carcinomas and Regulates Cell Survival by Targeting PDK1 and 14-3-3 ζ . **Cancer Res**, v.70, p.2339-2349, 2010.
95. SHIOTANI, A. et al. *H. pylori* eradication did not improve dysregulation of specific oncogenic miRNAs in intestinal metaplastic glands. **J Gastroenterol**, v. 47, p.988-998, 2012.
96. CHANG, H. et al. Different MicroRNA Expression Levels in Gastric Cancer Depending on *Helicobacter pylori* Infection. **Gut Liver**, 2014. DOI 10.5009/gnl13371.
97. MIAO, L. et al. miR-375 inhibits *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis by blocking JAK2-STAT3 signaling. **Cancer Immunol Immunother**, v.63, p.699-711, 2014.
98. CHEN, Z. et al. Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma. **Cancer**, v.119, p.1985-1993, 2013.
99. SHEN, Z-Y. et al. miR-375 inhibits the proliferation of gastric cancer cells by repressing ERBB2 expression. **Exp Ther Med**, v.7, p.1757-1761, 2014.
100. XU, Y. et al. Snail-Regulated MiR-375 Inhibits Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by targeting JAK2. **PLoS ONE**, v.9, e99516, 2014.
101. LI, B-S. et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as Novel Potential Biomarkers for Gastric Cancer Detection. **Plos One**, v. 7, p. 1-8, 2012a.

102. MA, L. et al. Increased microRNA-223 in *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer contributed to cancer cell proliferation and migration. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.78, p.602-608, 2014.
103. LI, X. et al. miRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. **Mol Cancer Res**, v.9, p.824-833, 2011.
104. LI, J. et al. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.138, p.763-774, 2012b.
105. XU, Z. et al. miR-365, a Novel Negative Regulator of Interleukin-6 Gene Expression, Is Cooperatively Regulated by Sp1 and NF- κ B. **J Biol Chem**, v. 286, p.21401-21412, 2011.
106. TargetScan Human. Release 6.0. November 2011. <http://www.targetscan.org>.
107. microRNA.org – Targets and Expression. August 2010. <http://www.microrna.org>.
108. DIANA – microT. V3.0. <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>
109. YAMAOKA, Y. et al. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. **Gut**, v.41, p.442-451, 1997.
110. PACHATHUNDIKANDI, S.K. et al. Induction of TLR-2 and TLR-5 Expression by *Helicobacter pylori* Switches *cagPAI*-Dependent Signalling Leading to the Secretion of IL-8 and TNF- α . **PLoS ONE**, v.6, e19614, 2011.
111. MUSTAPHA, P. et al. Chemokines and Antimicrobial Peptides Have a *cag*-Dependent Early Response to *Helicobacter pylori* Infection in Primary Human Gastric Epithelial Cells. **Infect Immun**, v.82, p.2881-2889, 2014.
112. ZALEWSKA-ZIOB, M. et al. TNF- α expression in gastric mucosa of individuals infected with different virulent *Helicobacter pylori* Strains. **Med Sci Monit**, v.15, p.BR166-171, 2009.
113. KRANZER, K. et al. Impact of *Helicobacter pylori* Virulence Factors and Compounds on Activation and Maturation of Human Dendritic Cells. **Infect Immun**, v.73, p.4180-4189, 2005.
114. GARCÍA-GONZÁLEZ, M.A. et al. Relevance of IL-1 and TNF gene polymorphisms on interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α gastric mucosal production. **Hum Immunol**, v.70, p.935-945, 2009.
115. GRAHAM, D.Y.; LU, H.; YAMAOKA, Y. Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved: sequential therapy and beyond. **Drugs**, v. 68, p. 725-36, 2008.
116. FURUTA, T. et al. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. **Gastroenterol**, v. 123, p. 92-105, 2002

117. SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 57, p. 45-56, 2009.
118. FIGURA, N. et al. Factors modulating the outcome of treatment for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. **New Microbiol**, v. 35, p. 335-40, 2012.
119. ZAMBON, C-F. et al. Clarithromycin Resistance, Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphism and Mucosal Inflammation Affect *H. pylori* Eradication Success. **J Gastrointest Surg**, v.11, p.1506-1514, 2007.
120. ZHAO, J.J. et al. Influence of *Helicobacter pylori* genotype on triple eradication therapy. **J Gastroenterol Hepatol**, v.22, p.2251-2255, 2007.
121. VAN DOOR, L.J. et al. Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. **Gut**, v.46, p.321-326, 2000.

Legend of figures

Figure 1: Relative expression of *TNFA* (A), *IL6* (B), *IL1B* (C), *IL12A* (D), *IL2* (E) and *TGFBR2* (F) mRNA in patients with chronic gastritis *H. pylori*-negative (Hp-) and *H. pylori*-positive before (Hp+), and after treatment in the eradicated (Hp-) and non-eradicated (Hp+) groups. Data are presented as Log2 of RQ values and each point represent one individual. Line symbolizes Log2 of median RQ for each group. * Significant difference using the Mann Whitney test.

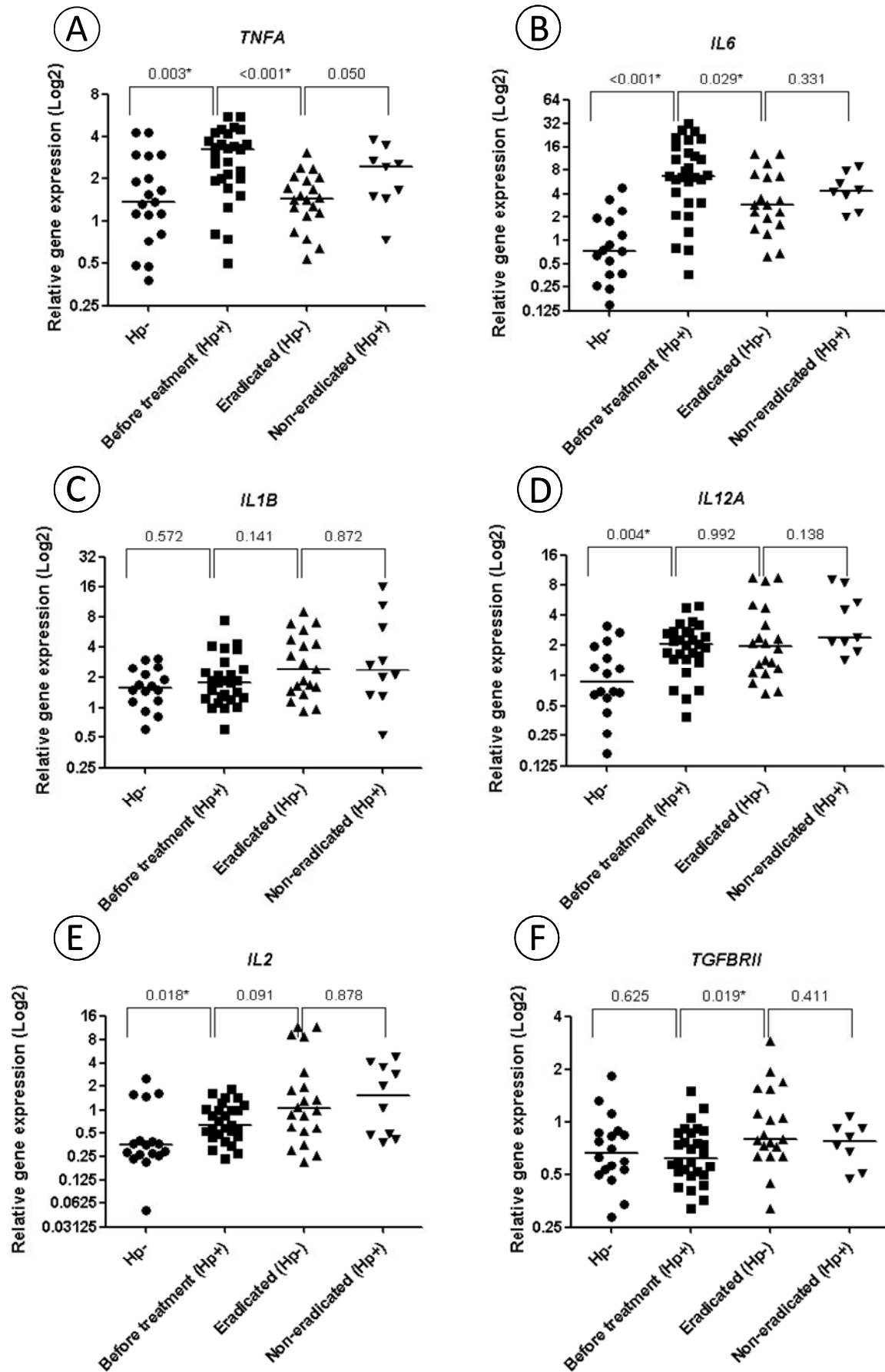
Figure 2: Relative expression of miR-103 (A), miR-181c (B), miR-370 (C), miR-375 (D) and miR-223 (E) in patients with chronic gastritis *H. pylori*-negative (Hp-) and *H. pylori*-positive before (Hp+), and after treatment in the eradicated (Hp-) and non-eradicated (Hp+) groups. Data are presented as Log2 of RQ values and each point represent one individual. Line symbolizes Log2 of median RQ for each group. * Significant difference using the Mann Whitney test.

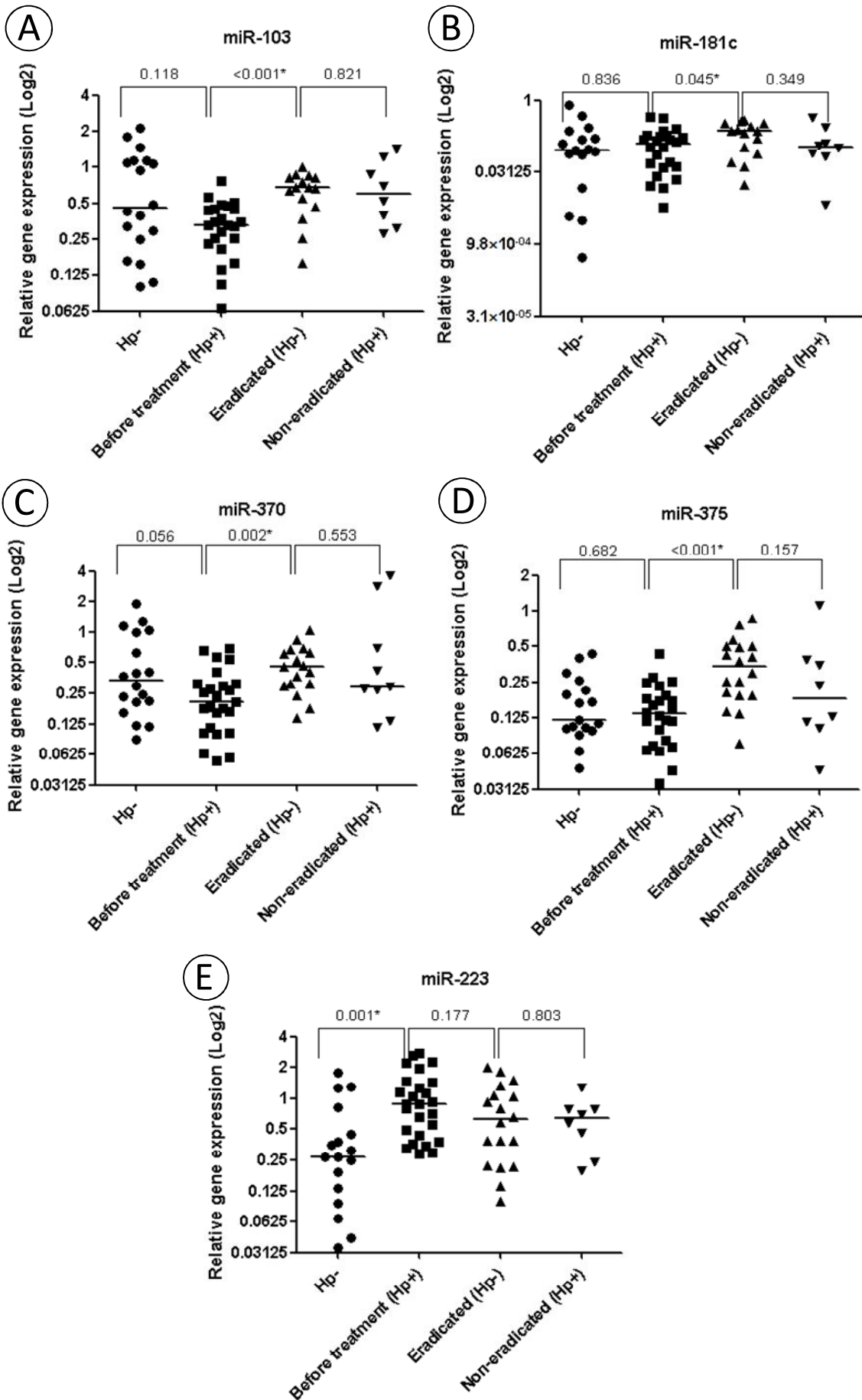
Figure 3: Immunoeexpression of the proteins TNF- α , IL-6 and IL-1 β in normal gastric mucosa (A, B, C respectively), chronic gastritis not associated with *H. pylori* infection (D, E, F, respectively) and chronic gastritis Hp+ before treatment (G, H, I, respectively) compared to eradicated patients (J, K, L, respectively) and not eradicated (M, N, O, respectively). In normal mucosa, TNF- α (A) and IL-1 β (C) presented strong immunostaining in the cytoplasm of foveolar epithelium (arrow), while IL-6 (B) showed strong immunostaining in the stroma (asterisk). In the Hp- group, IL-1 β (F) presented only immunostaining in the cytoplasm of foveolar epithelium (arrow), while TNF- α (D) also showed weak immunostaining in inflammatory cells (arrowhead). For IL-6, Hp- group (E) presented immunostaining in the foveolar epithelium cytoplasm and in the stroma (asterisk), as well as Hp+ before treatment (H) and after treatment not eradicated (N) (arrow). Before treatment, strong immunostaining was observed in both the foveolar epithelium (arrow) and in inflammatory cells (arrowhead) to TNF- α (G) and IL-1 β (I). After treatment a similar immunostaining pattern those before treatment was found to TNF- α protein for both eradicated (J) and not eradicated (M) patients. Whereas IL-1 β , after treatment groups (L and O) showed weak immunostaining in foveolar epithelium (arrow), although in the non-eradicated patients (O) also presented expression in inflammatory cells (arrowhead). There was not stromal immunostaining of IL-6 in most cases of eradicated group (K), even though goblet cells (+) showed weak staining. Counterstain: Hematoxylin. Bars: 50 μ m.

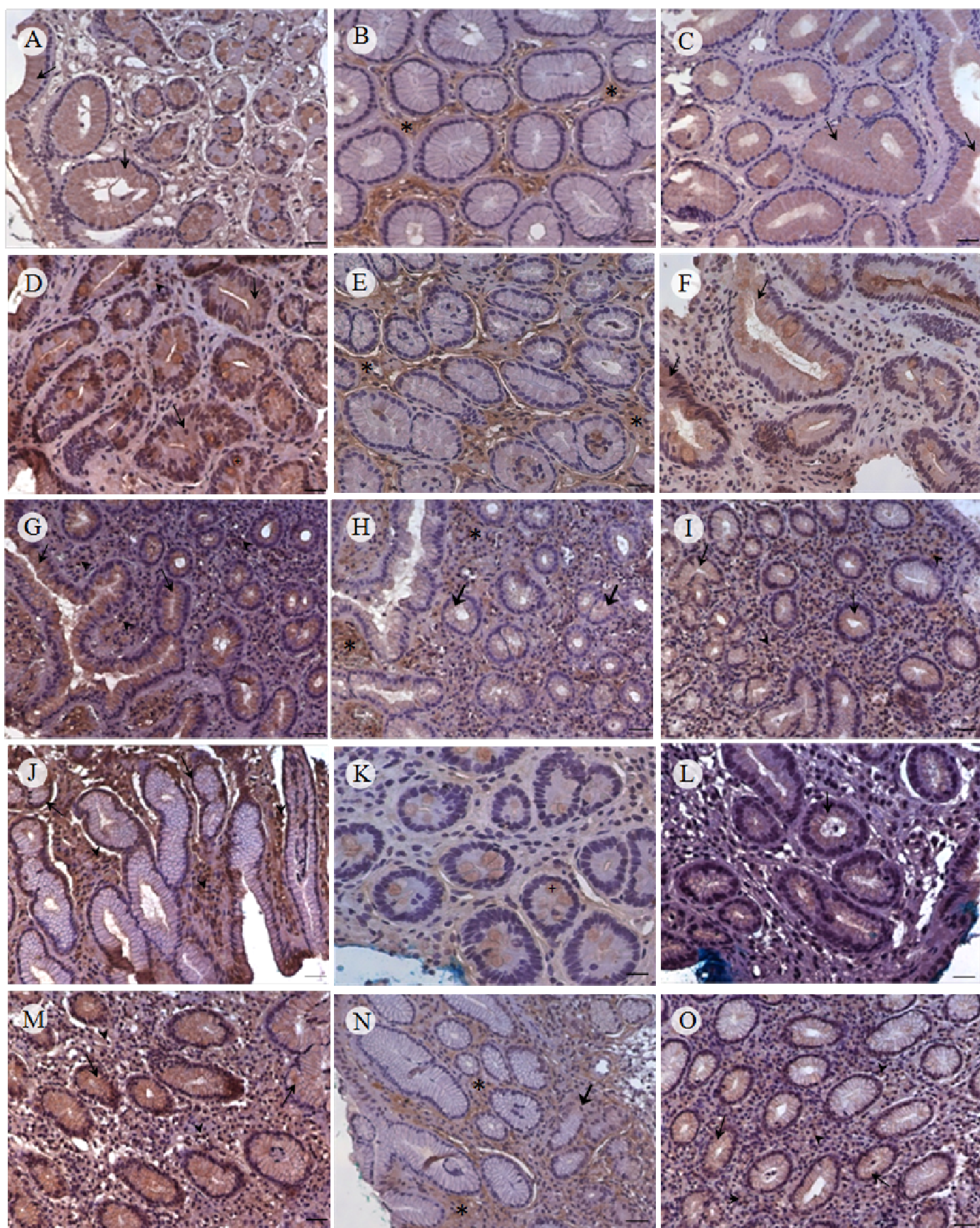
Figure 4: Immunoeexpression of the proteins IL-12p40, IL-2 and TGF- β -R2 in normal gastric mucosa (A, B, C, respectively), chronic gastritis not associated with *H. pylori* infection (D, E, F, respectively) and chronic gastritis Hp+ before treatment (G, H, I, respectively) compared to eradicated patients (J, K, L, respectively) and not eradicated (M, N, O, respectively). In normal mucosa, IL-12p40 (A) and TGF- β -R2 (C) presented weak immunostaining in the cytoplasm of foveolar epithelium (arrow), while IL-2 (B) showed strong expression (arrow). The Hp- group presented predominance of weak or absent immunostaining in the epithelium (arrow) to IL-12p40 (D) and IL-2 (E) and strong to TGF- β -R2 (F). For IL-12p40 and IL-2, Hp+ group (G and H, respectively) showed strong immunostaining in the cytoplasm of foveolar epithelium (arrow) and inflammatory cells (arrowhead) with a significant reduction in IL-2 expression in the epithelium after eradication (K) and maintenance in the inflammatory cells expression for IL-12p40 (J). Hp+ group (I) presented weak immunostaining in the cytoplasm of foveolar epithelium (arrow) and strong in inflammatory

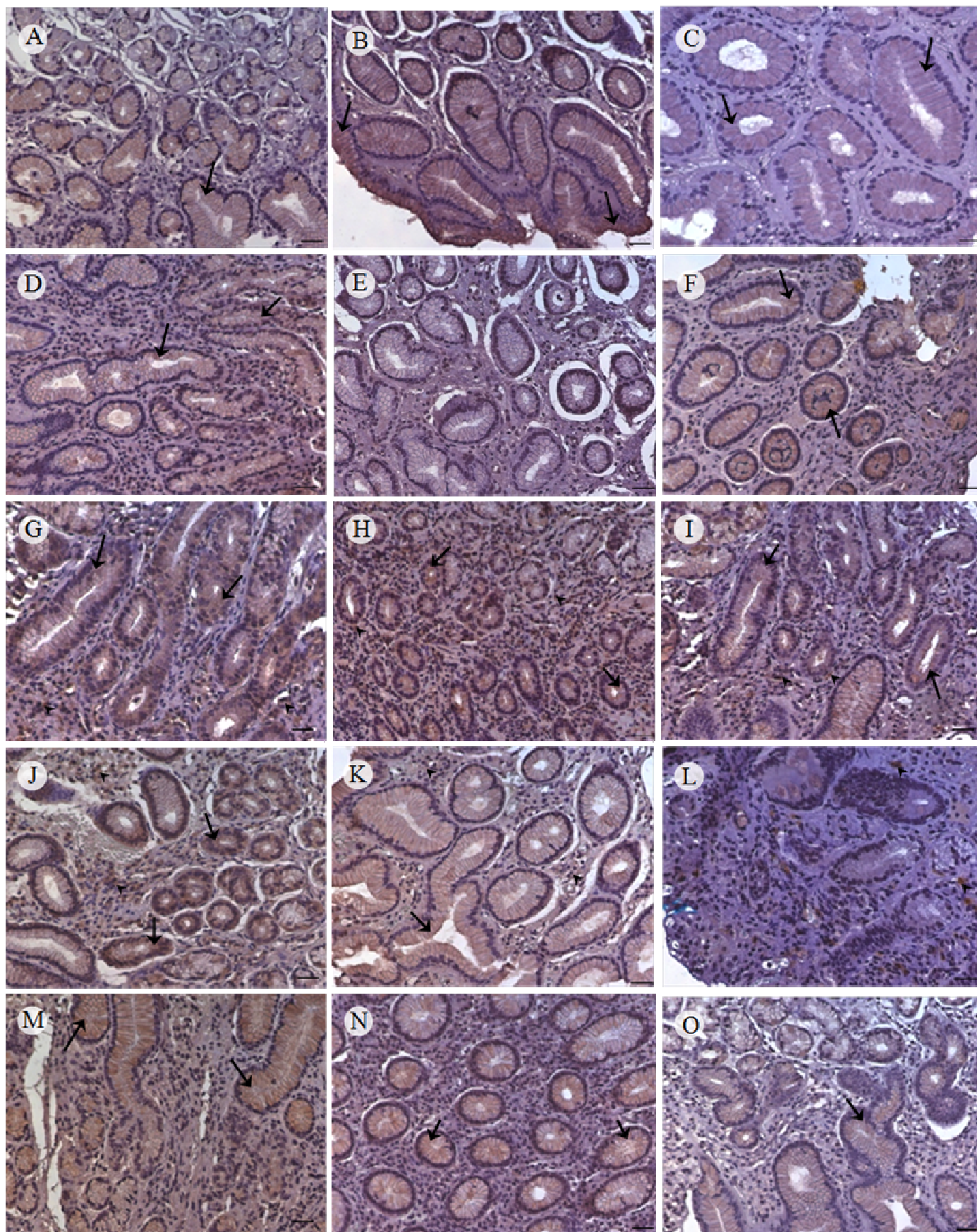
cells (arrowhead) to TGF- β -RII with significant reduction after eradication only in the epithelium (L), although inflammatory cells immunostaining has remained high (arrowhead). In the non-eradicated patients weak expression was predominant in the epithelium (arrow) for all proteins (M, N and O). Counterstain: Hematoxylin. Bars: 50 μ m.

Figure 5: Protein interaction network showing miRNAs and their targets predicted. The protein interaction network (PPI *network*) shows the interaction between the proteins encoded by target genes regulated by miRNAs. The inverse relationship between the protein expression of TGF- β -RII and miRNA miR-103 was detected in Hp+ group before treatment. Furthermore, identify some interaction possibilities (dotted line) by means of experimental validation studies between, for example, miRNAs miR-103, miR-181c and miR-370 and the gene *TNFA* and the miR-370 with IL-12-p40 protein encoded by the gene *IL12A*.









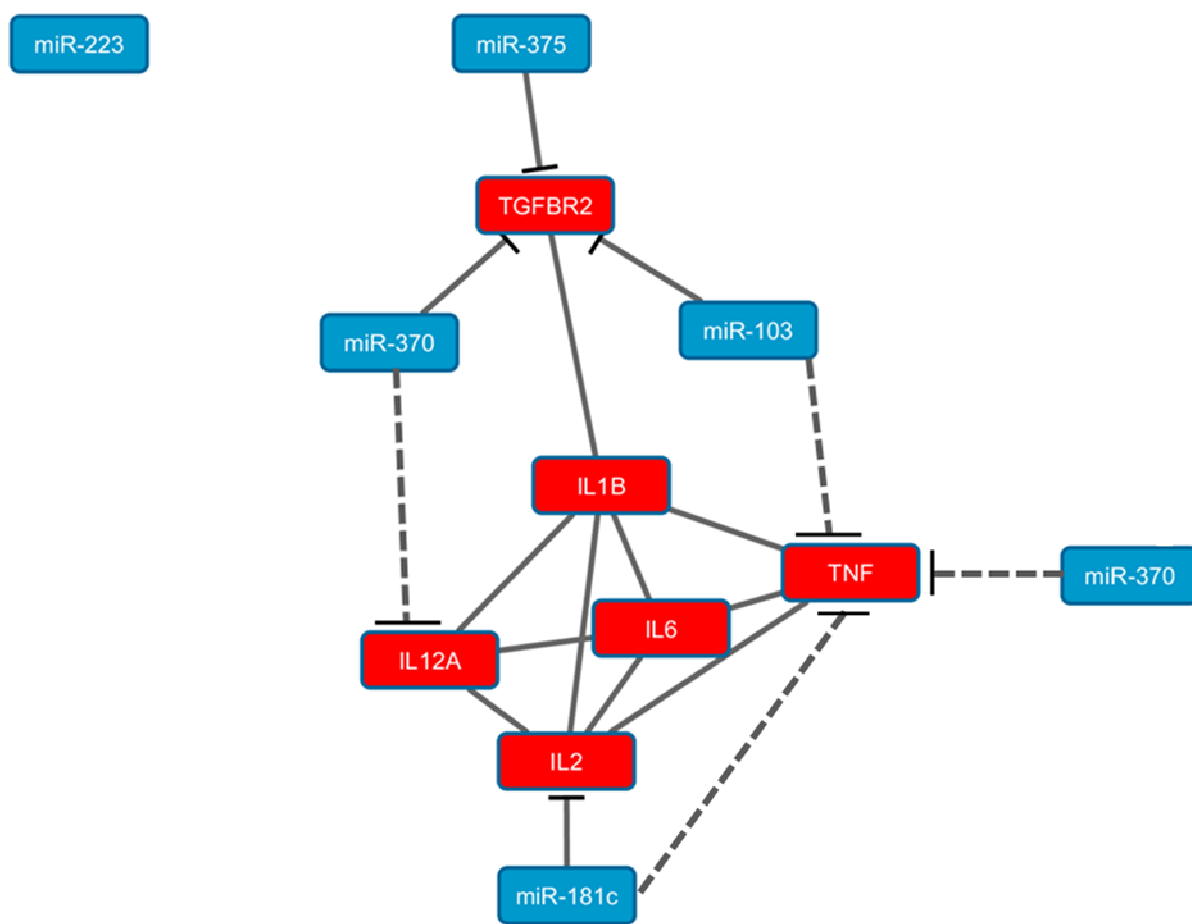


Table 1: Epidemiological data of individuals with normal gastric mucosa without *H. pylori* infection (Hp-), *H. pylori*-negative (Hp-) chronic gastritis patients and *H. pylori*-positive (Hp+) chronic gastritis patients before treatment.

Variable	Normal mucosa (Hp-) N (%)	Hp- N (%)	Hp+ N (%)
Gender			
Female	3 (75)	14 (70)	19 (61.3)
Male	1 (25)	6 (30)	12 (38.7)
Total	4	20	31
Age (years)			
Mean±standard deviation	30±12.50	52±19.24	44±12.00
	< 30 3 (75)	< 52 6 (33,3)	< 44 12 (46,2)
	≥ 30 1 (25)	≥ 52 12 (66,7)	≥44 14 (53,8)
Total	4	18*	26*
Smoking			
Yes	0 (0)	4 (23.5)	10 (33.3)
No	4 (100)	13 (76.5)	20 (66.7)
Total	4	17*	30*
Drinking			
Yes	0 (0)	6 (35.3)	9 (30)
No	4 (100)	11 (64.7)	21 (70)
Total	4	17*	30*
Histology			
Chronic Gastritis		18 (90)	19 (61.3)
Atrophic gastritis		0 (0)	7 (22.6)
Metaplastic atrophic/chronic gastritis		2 (10)	5 (16.1)
Total		20	31

*Parameter not available for some individuals; N = Sample number

Table 2: Sequence and identification code in miRBase of addressed microRNAs.

miRNA	ID – miRBase*	Sequence of the mature miRNA (5' > 3')
hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU
hsa-miR-375	MIMAT0000728	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA

* miRBase: <http://www.mirbase.org>

Table 3: Frequency of *cagA* and *vacA* genotypes for the *H. pylori*-positive (Hp+) chronic gastritis patients classified according outcome of treatment in eradicated and non-eradicated.

Genotype	Eradicated N (%)	Non-eradicated N (%)	Total
<i>cagA</i>			
<i>cagA</i> +	6 (60.0%)	4 (40.0%)	10
<i>cagA</i> –	7 (58.3%)	5 (41.7%)	12
p - value		1.000	
<i>vacA</i>			
<i>vacA s1m1</i>	7 (77.8%)	2 (22.2%)	9
<i>vacA</i> others	7 (53.8%)	6 (46.2%)	13
p - value		0.380	

vacA others: *s1m2*, *s2m2*, *s1_*, *s2_* and *_m1* ; p – value: Fisher Exact Test;

N = Sample number

Table 4: Relative expression of *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* and *TGFBR2* mRNA in *H. pylori*-negative (Hp-) chronic gastritis patients and *H. pylori*-positive (Hp+) chronic gastritis patients before and after eradication therapy.

Genes	Hp-	Before treatment (Hp+)	After treatment	
			Eradicated (Hp-)	Non-eradicated (Hp+)
<i>TNFA</i>				
Samples (N)	19	31	21	10
RQ median	1.35	3.23	1.44	2.37
Range	0.38-4.26	0.49-5.56	0.54-3.07	1.45-3.74
p - value	0.003*		<0.001*	0.050
<i>IL6</i>				
Samples (N)	20	31	21	10
RQ median	0.74	6.66	2.90	4.34
Range	0.15-4.81	0.37-32.02	0.63-12.90	1.96-8.78
p - value	<0.001*		0.029*	0.331
<i>IL1B</i>				
Samples (N)	20	31	21	10
RQ median	1.58	1.79	2.40	2.38
Range	0.61-3.07	0.60-7.44	0.93-8.98	0.52-7.27
p - value	0.572		0.141	0.872
<i>IL12A</i>				
Samples (N)	19	31	21	10
RQ median	0.87	2.05	1.98	2.37
Range	0.17-3.12	0.39-5.01	0.67-9.53	1.45-9.14
p - value	0.004*		0.992	0.138
<i>IL2</i>				
Samples (N)	20	31	21	10
RQ median	0.35	0.65	1.04	1.54
Range	0.05-2.49	0.23-1.84	0.21-11.56	0.38-4.87
p - value	0.018*		0.09	0.878
<i>TGFBR2</i>				
Samples (N)	20	31	21	10
RQ median	0.67	0.62	0.80	0.77
Range	0.28-1.82	0.32-1.50	0.32-2.90	0.47-1.07
p - value	0.625		0.019*	0.411

RQ= Relative Quantification; p – value: Mann-Whitney Test; * significant difference

Table 5: Relative expression of miR-103, miR-181c, miR-370, miR-375 and miR-223 in *H. pylori*-negative (Hp-) chronic gastritis patients and *H. pylori*-positive (Hp+) chronic gastritis patients before and after eradication therapy.

miRNAs	Hp-	Before treatment (Hp+)	After treatment	
			Eradicated (Hp-)	Non-eradicated (Hp+)
miR-103				
Samples (N)	19	27	18	9
RQ median	0.46	0.33	0.68	0.60
Range	0.10-2.13	0.07-0.77	0.16-1.01	0.28-1.40
p - value	0.118		<0.001*	0.821
miR-181c				
Samples (N)	19	27	18	9
RQ median	0.09	0.12	0.23	0.11
Range	0.00-0.80	0.00-0.45	0.02-0.39	0.01-0.42
p - value	0.836		0.045*	0.349
miR-370				
Samples (N)	19	27	18	9
RQ median	0.33	0.21	0.45	0.29
Range	0.20-1.90	0.05-0.69	0.14-1.05	0.12-3.57
p - value	0.056		0.002*	0.553
miR-375				
Samples (N)	19	27	18	9
RQ median	0.12	0.13	0.34	0.18
Range	0.05-0.43	0.04-0.43	0.08-0.86	0.04-1.12
p - value	0.682		<0.001*	0.157
miR-223				
Samples (N)	19	27	18	9
RQ median	0.27	0.89	0.62	0.64
Range	0.03-0.63	0.29-2.78	0.10-2.03	0.20-1.26
p - value	0.001*		0.177	0.803

RQ= Relative Quantification; p – value: Mann-Whitney Test; * significant difference

Supplementary Material

Table S1: Comparisons of relative expression of *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* and *TGFBR2* mRNA stratified by histological type of lesions, as normal mucosa (NM), chronic gastritis (CG), atrophic gastritis (AG) and metaplastic atrophic gastritis (MAG).

	Before treatment (Hp+)			After treatment					
	CG	AG	MAG	Eradicated (Hp-)			Non-eradicated (Hp+)		
				NM	CG	AG	CG	AG	MAG
<i>TNFA</i>									
Samples (%)	19/31	7/31	5/31	2/21	16/21	3/21	6/10	3/10	1/10
Median RQ	2.92	3.10	3.69	2.11	1.46	1.26	2.52	1.53	2.53
Range	0.49-4.65	1.24-5.49	1.98-5.56	1.15-3.07	0.54-2.36	0.74-1.92	0.73-3.74	1.42-1.64	-
p - value		0.472			0.724			0.497	
<i>IL6</i>									
Samples (%)	19/31	7/31	5/31	2/21	16/21	3/21	6/10	3/10	1/10
Median RQ	6.47	6.66	8.60	2.43	3.29	1.20	4.49	5.37	2.32
Range	0.37-32.02	1.28-20.55	3.05-25.47	1.42-3.44	0.70-12.90	0.63-2.33	3.77-7.90	1.96-8.78	-
p - value		0.725			0.113			0.535	
<i>IL1B</i>									
Samples (%)	19/31	7/31	5/31	2/21	16/21	3/21	6/10	3/10	1/10
Median RQ	1.85	1.29	2.24	4.53	2.05	1.86	4.59	2.10	0.52
Range	0.60-7.44	0.98-1.77	0.99-4.17	4.31-4.75	0.93-8.98	1.62-4.10	1.29-16.18	2.02-2.66	-
p - value		0.155			0.488			0.229	
<i>IL12A</i>									
Samples (%)	19/31	7/31	5/31	2/21	16/21	3/21	6/10	3/10	1/10
Median RQ	1.97	2.09	3.18	2.21	1.85	1.05	2.37	4.54	2.16
Range	0.39-5.01	0.72-2.76	1.48-4.75	2.10-2.32	0.69-9.53	0.67-4.69	1.45-8.52	2.16-9.14	-
p - value		0.319			0.526			0.726	
<i>IL2</i>									
Samples (%)	19/31	7/31	5/31	2/21	16/21	3/21	6/10	3/10	1/10
Median RQ	0.65	0.58	0.71	1.58	1.00	0.35	2.32	2.05	0.42
Range	0.23-1.84	0.44-1.28	0.28-1.65	1.35-1.81	0.26-11.56	0.21-9.21	0.38-4.87	0.49-2.88	-
p - value		0.897			0.545			0.470	
<i>TGFBR2</i>									
Samples (%)	19/31	7/31	5/31	2/21	16/21	3/21	6/10	3/10	1/10
Median RQ	0.58	0.75	0.50	1.13	0.78	0.84	0.62	0.82	0.92
Range	0.35-1.50	0.70-0.89	0.32-0.87	0.72-1.53	0.32-2.90	0.79-1.56	0.47-0.91	0.68-1.07	-
p - value		0.237			0.777			0.297	

RQ= Relative Quantification; p – value: Kruskal-Wallis Test

Table S2: Comparisons between the relative expression of evaluated genes and according of *cagA* and *vacA* polymorphisms in *H. pylori*-positive (Hp+) chronic gastritis patients before treatment.

Genes	Before treatment (Hp+)			
	<i>cagA</i> +	<i>cagA</i> -	<i>vacA s1m1</i>	<i>vacA</i> others
<i>TNFA</i>				
Samples (%)	10/22 (45.4)	12/22 (54.6)	9/22 (40.9)	13/22 (59.1)
RQ Median	3.41	3.37	3.09	3.32
Range	1.91-5.56	2.00-5.49	1.91-5.56	2.00-5.49
p -value	0.787		0.847	
<i>IL6</i>				
Samples (%)	10/22 (45.4)	12/22 (54.6)	9/22 (40.9)	13/22 (59.1)
RQ Median	11.97	6.66	13.92	6.52
Range	3.05-26.37	3.05-32.02	3.05-25.47	3.05-32.02
p -value	0.543		0.132	
<i>IL1B</i>				
Samples (%)	10/22 (45.4)	12/22 (54.6)	9/22 (40.9)	13/22 (59.1)
RQ Median	1.77	1.96	1.97	1.42
Range	0.98-4.39	1.20-4.17	0.98-7.44	1.01-4.17
p -value	0.356		0.837	
<i>IL12A</i>				
Samples (%)	10/22 (45.4)	12/22 (54.6)	9/22 (40.9)	13/22 (59.1)
RQ Median	1.94	2.66	1.98	2.37
Range	1.07-2.76	1.64-5.01	1.36-4.75	1.07-5.01
p -value	0.068		0.464	
<i>IL2</i>				
Samples (%)	10/22 (45.4)	12/22 (54.6)	9/22 (40.9)	13/22 (59.1)
RQ Median	0.65	1.04	0.68	0.53
Range	0.28-1.02	0.30-1.84	0.28-1.65	0.30-1.84
p -value	0.243		0.710	
<i>TGFBR2</i>				
Samples (%)	10/22 (45.4)	12/22 (54.6)	9/22 (40.9)	13/22 (59.1)
RQ Median	0.52	0.76	0.52	0.75
Range	0.32-1.50	0.42-1.19	0.32-1.50	0.40-1.19
p -value	0.111		0.177	

RQ= Relative Quantification; p – value: Mann-Whitney Test

Table S3: Comparisons of relative expression of miR-103, miR-181c, miR-370, miR-375 and miR-233 stratified by histological type of lesions, as normal mucosa (NM), chronic gastritis (CG), atrophic gastritis (AG) and metaplastic atrophic gastritis (MAG).

	Before treatment (Hp+)			After treatment					
	CG	AG	MAG	Eradicated (Hp-)			Non-eradicated (Hp+)		
				NM	CG	AG	CG	AG	MAG
miR103									
Samples (%)	16/27	6/27	5/27	2/18	13/18	3/18	6/9	2/9	1/9
Median RQ	0.34	0.29	0.40	-	0.71	0.64	0.87	0.29	0.52
Range	0.07-0.50	0.16-0.56	0.21-0.77	-	0.16-1.01	0.25-0.68	0.39-1.40	0.28-0.31	-
p - value		0.754			0.248			0.108	
miR181c									
Samples (%)	16/27	6/27	5/27	2/18	13/18	3/18	6/9	2/9	1/9
Median RQ	0.08	0.10	0.15	0.33	0.23	0.16	0.12	0.09	0.07
Range	0.01-0.43	0.05-0.26	0.04-0.26	-	0.02-0.39	0.08-0.29	0.01-0.42	0.08-0.10	-
p - value		0.387			0.492			0.359	
miR370									
Samples (%)	16/27	6/27	5/27	2/18	13/18	3/18	6/9	2/9	1/9
Median RQ	0.19	0.27	0.18	0.77	0.46	0.31	0.55	0.13	0.27
Range	0.05-0.54	0.06-0.66	0.17-0.69	0.69-0.85	0.18-1.05	0.14-0.40	0.28-3.57	0.12-0.13	-
p - value		0.647			0.063			0.061	
miR375									
Samples (%)	16/27	6/27	5/27	2/18	13/18	3/18	6/9	2/9	1/9
Median RQ	0.12	0.14	0.19	0.68	0.30	0.25	0.35	0.11	0.24
Range	0.04-0.43	0.07-0.25	0.17-0.27	0.50-0.86	0.08-0.77	0.19-0.49	0.04-1.12	0.10-0.13	-
p - value		0.041*			0.144			0.607	
miR223									
Samples (%)	16/27	6/27	5/27	2/18	13/18	3/18	6/9	2/9	1/9
Median RQ	0.68	0.89	1.46	1.28	0.59	0.39	0.70	0.49	0.24
Range	0.29-2.78	0.29-2.61	0.81-2.27	1.04-1.52	0.10-2.03	0.22-0.81	0.46-1.26	0.20-0.78	-
p - value		0.177			0.297			0.465	

RQ= Relative Quantification; p – value: Kruskal-Wallis Test; * significant difference

Table S4: Comparisons between the relative expression of evaluated miRNAs according *cagA* and *vacA* polymorphisms in the *H. pylori*-positive (Hp+) chronic gastritis patients before treatment.

miRNAs	Before treatment (Hp+)			
	<i>cagA</i> +	<i>cagA</i> -	<i>vacA s1m1</i>	<i>vacA others</i>
miR-103				
Samples (%)	8/18 (44.4)	10/18 (55.6)	8/19 (42.1)	11/19 (57.9)
RQ Median	0.36	0.33	0.29	0.33
Range	0.16-0.77	0.10-0.48	0.16-0.77	0.10-0.45
p - value	0.574		0.669	
miR-181c				
Samples (%)	8/18 (44.4)	10/18 (55.6)	8/19 (42.1)	11/19 (57.9)
RQ Median	0.16	0.07	0.17	0.07
Range	0.03-0.45	0.01-0.19	0.05-0.45	0.01-0.19
p - value	0.093		0.0185*	
miR-370				
Samples (%)	8/18 (44.4)	10/18 (55.6)	8/19 (42.1)	11/19 (57.9)
RQ Median	0.17	0.22	0.21	0.16
Range	0.06-0.31	0.05-0.69	0.06-0.66	0.05-0.69
p - value	0.633		0.592	
miR-375				
Samples (%)	8/18 (44.4)	10/18 (55.6)	8/19 (42.1)	11/19 (57.9)
RQ Median	0.11	0.15	0.18	0.12
Range	0.04-0.43	0.07-0.27	0.07-0.43	0.04-0.27
p - value	0.541		0.365	
miR-223				
Samples (%)	8/18 (44.4)	10/18 (55.6)	8/19 (42.1)	11/19 (57.9)
RQ Median	0.85	1.46	0.92	1.05
Range	0.38-2.22	0.29-2.78	0.38-2.27	0.29-2.78
p - value	0.236		0.928	

RQ= Relative Quantification; p – value: Mann-Whitney Test; * significant difference

4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avalia a influência do tratamento de erradicação da *H. pylori* e dos fatores de virulência na expressão do RNAm e das proteínas dos genes *TNFA*, *IL6*, *IL1B*, *IL12A*, *IL2* e *TGFBR2* e dos miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370, miR-375 e miR-223 em pacientes com lesões gástricas infectados pela *H. pylori*. Nós encontramos expressão aumentada do RNAm dos genes *TNFA*, *IL6*, *IL1B* e *IL12A* e reduzida do *IL2* e *TGFBR2* em pacientes infectados antes do tratamento, enquanto que em pacientes não infectados, *TNFA* e *IL1B* apresentaram expressão aumentada e *IL2* e *TGFBR2* reduzida. Após o tratamento, somente a expressão do RNAm de *TNFA* e *IL6* foi significativamente reduzida e de *TGFBR2* aumentada nos pacientes que erradicaram a bactéria, mas não em pacientes não erradicados. A expressão das proteínas ocorreu predominantemente no epitélio e células inflamatórias no grupo de pacientes infectados antes do tratamento, com exceção de IL-6 que mostrou predominância de expressão estromal. Diferentemente da expressão do RNAm, apenas as proteínas IL-2 e TGF- β -R2 tiveram expressão significativamente reduzida nas células epiteliais após a erradicação da bactéria, mas sem alteração na expressão de células inflamatórias. Os miRNA apresentaram expressão reduzida tanto no grupo Hp- quanto Hp+ antes do tratamento, com exceção do miR-223 que teve expressão basal nos pacientes infectados antes do tratamento. Após a erradicação da *H. pylori*, a expressão dos miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370 e miR-375 foi significativamente aumentada. As análises de correlação e redes mostram que as proteínas avaliadas interagem entre si e com os miRNAs e ambos podem estar associados com o processo patológico na presença da *H. pylori*. Portanto, nossos resultados evidenciam que a erradicação da bactéria, independente dos genótipos de virulência bacterianos *cagA* e *vacA*, é importante para o restabelecimento da expressão de citocinas e miRNAs que regulam o processo inflamatório.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α possui importante papel na mediação da inflamação crônica e desenvolvimento de neoplasias malignas (SZLOSAREK, 2003). Neste estudo, o transcrito de *TNFA* apresentou expressão aumentada no grupo Hp+ antes do tratamento com redução significativa após a erradicação da bactéria, embora os níveis continuaram elevados em pacientes não erradicados. A análise imuno-histoquímica mostrou imunomarcagem acentuada da proteína TNF- α nas células inflamatórias, assim esclarecendo a expressão elevada do RNAm observada no grupo Hp+. Expressão aumentada do RNAm de *TNFA* foi também observada em pacientes infectados pela *H. pylori* em relação aos não infectados em úlcera péptica (GOLL et al., 2007) e em câncer gástrico (ZHAO et al., 2010). Além disto, linhagens celulares de câncer gástrico secretam maior quantidade da proteína

TNF- α no sobrenadante da cultura após infecção com *H. pylori* independentemente do genótipo *cagA* (ZHAO et al., 2010) e maior expressão desta citocina foi também observada em células mononucleares do sangue periférico obtidas de pacientes infectados comparadas aos não infectados (ZHANG et al., 2014). Aumento progressivo na expressão protéica e do RNAm de TNF- α foi observado da mucosa normal para gastrite crônica, metaplasia intestinal e displasia, de modo que esta citocina foi associada com a progressão da cascata de lesões que levam ao câncer gástrico independentemente da *H. pylori* (SENTHIKUMAR et al., 2011). Assim corroborando nossos achados em pacientes não infectados que também apresentaram nível aumentado de RNAm.

Redução na expressão do RNAm de *TNFA* após a erradicação da *H. pylori* foi também relatada por Lee et al. (2010) e associado a redução significativa do infiltrado de neutrófilos e células mononucleares. Esta redução pode ser explicada pela própria erradicação da bactéria, visto que ela possui um fator de virulência denominado Tip- α (*TNF- α -inducing protein*) capaz de induzir fortemente a expressão de TNF- α por meio da ativação de NF- κ B (SUGANUMA et al., 2012). Cepas com deleção deste gene induzem fraca expressão desta citocina no hospedeiro, menor atividade de colonização gástrica e de transformação celular (GODLEWSKA et al., 2008), sugerindo seu papel na carcinogênese induzida pela *H. pylori* (SUGANUMA et al., 2012).

Similarmente a TNF- α , IL-6 é relacionada à fase crônica da inflamação gástrica e mudanças atróficas (SUGIMOTO et al., 2011). Esta interleucina pró-inflamatória apresentou o maior nível de RNAm dentre todas as citocinas avaliadas no grupo Hp+ com redução significativa após a erradicação da bactéria, mas ainda significativamente maior que pacientes não infectados. A imunomarcagem desta proteína predomina no estroma, mas a redução da expressão do RNAm após a erradicação da bactéria resulta também em redução da expressão protéica tanto no epitélio quanto no estroma. A expressão do RNAm e da proteína de IL-6 foi relatada aumentada em linhagem celular de macrófagos e de células mononucleares do sangue periférico obtidas de pacientes infectados pela *H. pylori* em relação a não infetados (ZHAO et al., 2010; ZHANG et al., 2014). Entretanto, expressão aumentada da citocina IL-6 em câncer gástrico não foi associada com presença desta bactéria (NECULA et al., 2012). Diferentemente dos nossos resultados que demonstraram imunomarcagem forte no estroma da mucosa normal, Yin et al. (2013) encontraram expressão fraca de IL-6 na mucosa normal adjacente ao tumor. Com relação ao efeito do tratamento na expressão de IL-6, os estudos são contraditórios. Ando et al. (1998) mostraram que a expressão reduz para valores próximos aos de indivíduos Hp- seis meses após a erradicação da bactéria em pacientes com úlcera

duodenal, enquanto Serelli-Lee et al. (2012) observaram que a alta concentração desta citocina no grupo Hp+ não altera após o tratamento.

IL-1 β é essencial para a resposta inata do hospedeiro contra a infecção por promover a adesão de células polimornucleares antes da migração para o tecido, além de exercer danos ao tecido em doenças agudas e crônicas (TSANG et al., 1997; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). Sua expressão é aumentada em pacientes com gastrite avançada e correlacionada com a atividade da gastrite (WANG et al., 1999). Dessa forma, corroborando nossos achados em pacientes com gastrite Hp-negativos, que apresentaram expressão aumentada do RNAm e da proteína desta interleucina, indicando que a expressão elevada pode ser consequência da inflamação decorrente da gastrite independentemente da infecção bacteriana. Os pacientes com gastrite Hp+ antes do tratamento também apresentaram expressão elevada do RNAm de *IL1B*, a qual permaneceu elevada após erradicação da bactéria. A expressão protéica foi concordante com os dados de expressão do RNAm, pois tanto o grupo Hp- quanto Hp+ apresentaram imunomarcção positiva. Vários estudos mostraram aumento na expressão gênica e protéica desta citocina como uma consequência da infecção pela *H. pylori* (GUIRALDES et al, 2001; ZHAO et al., 2010; SHIGEMATSU et al., 2013). Serelli-Lee et al. (2012) encontraram concentrações maiores da proteína IL-1 β em biópsias gástricas Hp+ e após o tratamento de erradicação comparado ao grupo sem infecção pela *H. pylori*. Estudo com experimentação animal em ratos nulos mostrou que IL-1 β aumenta a inflamação e o número de tumores gástricos, enquanto que sua ausência diminui a proliferação e aumenta a apoptose em células gástricas epiteliais, de modo que a indução desta citocina pela *H. pylori* afeta os estágios iniciais da carcinogênese gástrica (SHIGEMATSU et al., 2013). Em conjunto, estes dados indicam que a *H. pylori* pode potencializar a produção de IL-1 β durante a infecção em associação com a inflamação da gastrite.

IL-12 é crucial para o desenvolvimento da resposta imune protetiva contra a *H. pylori*, pois promove a diferenciação de células T_h0 em T_h1 (AKHIANI et al., 2002). Embora não existam relatos sobre a expressão desta citocina em pacientes após a erradicação da bactéria, vários estudos mostraram expressão aumentada de IL-12 na mucosa gástrica de indivíduos infectados pela *H. pylori* (KARTTUNEN et al., 1997; BAUDIZ et al., 1999; HIDA et al., 1999). No presente estudo, RNAm de *IL12A* mostrou expressão elevada tanto antes quanto após o tratamento em pacientes erradicados e não erradicados, mas expressão baixa no grupo Hp-. Do mesmo modo, imunomarcção positiva desta proteína foi observada em pacientes Hp+ antes e após o tratamento e frequentemente fraca em pacientes Hp-. Apesar da *H. pylori* possuir um papel importante na indução da expressão desta citocina, alguns estudos não

observaram esta relação. Em linhagens celulares AGC e MKN-28 infectadas com quatro cepas diferentes de *H. pylori*, Al-Sammak et al., (2013) encontraram níveis basais de *IL12A* após 24 e 48 horas de estimulação. Além disto, estes autores também detectaram imunomarcção de IL-12 em células epiteliais gástricas e células imunes de pacientes com gastrite independentemente da infecção pela *H. pylori* (AL-SAMMAK et al., 2013). A manutenção da expressão de IL-12 elevada após o tratamento é provavelmente devido a seu papel na indução da resposta adaptativa celular.

De modo contrário, nossos resultados revelam expressão reduzida de *IL2* e de *TGFBR2* em pacientes infectados e não infectados pela *H. pylori*, embora *IL2* mostrou expressão basal após o tratamento. A análise imuno-histoquímica revelou imunomarcção positiva tanto nas células epiteliais quanto inflamatórias nos pacientes Hp+ antes do tratamento e redução significativa na sua expressão após a erradicação apenas nas células epiteliais, indicando o possível papel desta citocina na infecção pela *H. pylori*. IL-2 é produzida por células T ativadas, age de modo autócrino e causa a proliferação de células T antígeno específicas, contribuindo, assim, para a resposta imune adaptativa (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004). Existem poucos estudos relacionando IL-2 com lesões gástricas e *H. pylori*. Bamford et al. (1998) mostraram que esta citocina induz atrofia gástrica associada a *H. pylori* pela regulação da resposta imune T_h1. Outros estudos tem avaliado a associação da citotoxina bacteriana VacA com inibição da proliferação de células T, mas não concordam com a ação deste fator bacteriano na expressão de IL-2. Embora tenha sido relatado bloqueio da transcrição de *IL2* em pacientes infectados com cepas expressando a proteína VacA (BONCRISTIANO et al., 2003; GEBERT et al., 2003), outro estudo mostrou apenas um efeito modesto desta citotoxina na secreção de IL-2 (SUNDRUD et al., 2004). Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que mostra a expressão da proteína IL-2 nas células epiteliais e inflamatórias em pacientes com gastrite infectados e não infectados pela *H. pylori* e após tratamento de erradicação.

TGF- β -R2 é um dos principais tipos de receptor de TGF- β , uma citocina anti-inflamatória com função supressora tumoral (MIVAZONO et al., 2003; BESWICK et al., 2011). No presente estudo, os transcritos deste receptor mostraram expressão reduzida em pacientes infectados pela *H. pylori*, mas com aumento após o tratamento de erradicação. A análise imuno-histoquímica evidenciou redução na expressão do epitélio foveolar após a erradicação, embora a expressão em células inflamatórias permaneceu elevada, assim corroborando o aumento significativo na expressão do RNAm. Mutações neste receptor são frequentemente encontradas em câncer gástrico e de cólon (PARSONS et al., 1995) e são

relacionadas a mudanças na sinalização de TGF- β . Ratos defectivos para esta sinalização infectados pela *H. pylori* desenvolvem adenocarcinoma gástrico enquanto que ratos selvagens desenvolvem apenas gastrite crônica, indicando que a sinalização normal de TGF- β pode suprimir ou atrasar a carcinogênese gástrica (HAHM et al., 2002). Similramente, adenocarcinoma gástrico de cárdia apresenta menor expressão deste receptor comparado à mucosa normal (GUO et al., 2012a, b). Alteração na expressão de TGF- β -RII pode levar a desregulação da sinalização de TGF- β prejudicando a homeostase e aumentando a inflamação do tecido (HONG et al., 2010). Portanto, as alterações na expressão do RNAm e da proteína observadas neste estudo após a eliminação da *H. pylori* podem ser importantes para manutenção da sinalização de TGF- β e proteção da mucosa gástrica.

De modo geral, nossos dados de expressão do RNAm e da proteína mostram que apenas a eliminação da bactéria não é suficiente para restabelecer completamente a expressão destes mediadores inflamatórios em um curto período de tempo. Deve também ser destacado que pacientes não erradicados mantiveram níveis de expressão altos para os genes avaliados. Do mesmo modo, um estudo de seguimento de pacientes tratados mostrou que a inflamação aguda desaparece logo após o tratamento, enquanto que a inflamação crônica ainda estava presente, embora significativamente menor, 12 anos após a erradicação da *H. pylori* (MERA et al., 2005). Além disto, Romero-Gallo et al. (2008) observaram, em modelo experimental, que redução na infiltração de células mononucleares e nos níveis de IFN- γ após a erradicação da *H. pylori* estão relacionados ao tempo que este patógeno permaneceu no estômago do hospedeiro antes do tratamento. Em países em desenvolvimento, a maioria dos indivíduos é infectada durante a infância (KODAIRA; ESCOBAR; GRISIS, 2002; MIRANDA et al., 2010) assim, é plausível que os indivíduos avaliados no presente estudo sem infectados de longa data, o que pode ter prejudicado a resposta ao tratamento para restabelecimento da expressão das citocinas avaliadas.

Estudos recentes mostraram que a infecção pela *H. pylori* afeta também a expressão global de miRNAs relacionados a resposta imune e inflamatória do hospedeiro na mucosa gástrica (NOTO; PEEK, 2012). De fato, avaliação da expressão de miRNAs em gastrite com ou sem infecção pela *H. pylori* e o efeito da terapia de erradicação são importantes para o entendimento de mudanças transcricionais resultantes da presença desta bactéria na mucosa gástrica. Os miRNAs miR-103, miR-181c, miR-370, miR-375 e miR-223 avaliados neste estudo foram selecionados devido seu envolvimento na regulação de processos inflamatórios e carcinogênese gástrica.

Todos os miRNAs analisados tiveram expressão reduzida tanto em pacientes infectados quanto não infectados, com exceção do miR-223. No entanto, os níveis de expressão aumentaram significativamente após o tratamento, principalmente em pacientes erradicados. O miR-103 é um miRNA oncogênico envolvido na invasão tumoral e metástase de linfonodo (KIM et al., 2013) e poucos estudos avaliaram a expressão deste miRNA em lesões gástricas não neoplásicas. Matsushima et al. (2011) avaliaram a mucosa gástrica não cancerosa por *microarray* e encontraram 31 miRNAs diferencialmente expressos em indivíduos infectados pela *H. pylori* comparado aos não infectados e, dentre eles, miR-103 apresentou expressão reduzida no grupo Hp+. Entretanto, ao contrário do nosso estudo, estes autores não encontraram nenhuma diferença na expressão deste miRNA após a erradicação da *H. pylori* (MATSUSHIMA et al., 2011). Expressão reduzida deste miRNA também foi observada em gastrite atrófica e metaplasia intestinal independentemente da infecção pela *H. pylori* (ISOMOTO et al., 2012). Em câncer gástrico, os estudos são inconsistentes (SHRESTHA et al., 2014), embora a maioria deles demonstrou aumento na expressão deste miRNA (TCHERNITSA et al., 2010; WU et al., 2011), podendo ser utilizado como um biomarcador de alta sensibilidade e especificidade para o tipo difuso (ROTKRUA et al., 2013). Portanto, existe um perfil de expressão diferente entre câncer gástrico e mucosa gástrica Hp+ indicando que este miRNA pode agir de modo diferente nos estágios da carcinogênese gástrica.

Diferentemente do miR-103, miR-181c é considerado um supressor tumoral porque possui o gene *BCL2*, com função anti-apoptótica, como um alvo validado (ZHU et al., 2010). Este é o primeiro estudo que avaliou a influência da *H. pylori* na expressão deste miRNA em lesões gástricas. Em câncer gástrico, os resultados são discordantes. Hashimoto et al. (2010) mostraram expressão reduzida deste miRNA em câncer gástrico comparado a mucosa adjacente não cancerosa e observaram que a transfecção de linhagem celular com Pre-mir-181c resulta em redução do crescimento e repressão de oncogenes como *NOTCH4* e *KRAS*. De modo contrário, outros estudos mostraram aumento na expressão de miR-181c nesta neoplasia (UEDA et al., 2010; AN et al., 2013; CUI et al., 2013a, b), sendo diretamente correlacionado com maior grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão e metástase de linfonodo, sendo que baixa expressão de miR-181c foi correlacionada com maior taxa de sobrevivência dos pacientes (CUI et al., 2013a). Além disto, níveis de expressão deste miRNA no tecido foram positivamente correlacionados com o plasma e a expressão foi significativamente maior em tecido tumoral que em úlcera gástrica e gastrite

crônica (CUI et al, 2013b). Portanto, a relação do miR-181c com infecção pela *H. pylori* e lesões gástricas precisa ser melhor investigado para alcançar resultados conclusivos.

O miR-370 pode ser considerado oncogênico ou supressor tumoral, pois seu papel na carcinogênese não é completamente entendido. Nosso estudo mostra expressão reduzida de miR-370 no grupo Hp+ antes do tratamento com aumento significativo na expressão após a erradicação da bactéria. A *H. pylori* e seu fator de virulência *cagA* inibem gradualmente a expressão deste miRNA a partir de gastrite superficial para gastrite atrófica metaplásica e desta para câncer gástrico, o que leva ao aumento na expressão de seu alvo *FoxM1* e consequente aumento na proliferação celular (FENG et al., 2013). Expressão reduzida de miR-370 também está associada com câncer gástrico e pior prognóstico (YANG, HUANG, LIN, 2014; LI et al., 2014). Contudo, outros estudos sugerem papel oncogênico deste miRNA. Fan et al. (2013) observaram expressão aumentada de miR-370 em câncer gástrico comparado a mucosa adjacente e este aumento foi associado com proliferação celular, possuindo importante papel na promoção e progressão do câncer gástrico. Expressão elevada foi associada com aumento na migração de células de câncer gástrico por alterar a sinalização de TGF- β , visto que este miRNA possui como alvo o receptor tipo II de TGF- β (LO et al., 2012). Assim, mais estudos são necessários para concluir sobre o efeito do miR-370 na inflamação desencadeada pela *H. pylori* e nos estágios iniciais da carcinogênese gástrica.

O miR-375 é considerado um fator supressor tumoral, pois inibe a proliferação e induz a apoptose (DING et al., 2010; TSUKAMOTO et al., 2010). No presente estudo, a erradicação da *H. pylori* resultou em um aumento significativo na sua expressão. Shiotani et al. (2012) também relataram aumento na expressão do miR-375 após a erradicação da *H. pylori* em pacientes com gastrite atrófica e úlcera gástrica. De modo contrário, Matsushima et al. (2011) não observaram alteração significativa na expressão deste miRNA após a eliminação da bactéria, embora o grupo Hp+ apresentou expressão significativamente reduzida comparada ao Hp-. Corroborando nossos resultados, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a infecção pela *H. pylori* pode contribuir para a redução na expressão do miR-375 (CHANG et al., 2014; MIAO et al., 2014). Em câncer gástrico, miR-375 é um dos miRNA que mais frequentemente possui expressão reduzida (DING et al., 2010; UEDA et al., 2010; CHEN et al., 2013; MIAO et al., 2014; SHEN et al., 2014; XU et al., 2014) resultando em aumento na metástase tumoral, invasão (XU et al., 2014) e proliferação devido elevação na expressão do seu alvo *JAK2* (DING et al., 2010) e *ERBB2* (SHEN et al., 2014) e redução da apoptose em consequência do aumento na expressão dos genes anti-apoptóticos *14-3-3-zeta* e *PDK1*

(TSUKAMOTO et al., 2010). Portanto, miR-375 possui um importante papel na carcinogênese gástrica induzida pela *H. pylori* podendo ser um possível alvo terapêutico.

Similarmente ao miR-103, o miR-223 é considerado um oncogene associado com a formação de tumores gástricos (LI et al., 2012a). O presente estudo mostrou os maiores valores de expressão deste miRNA dentre todos avaliados em pacientes Hp+ antes do tratamento, enquanto que pacientes Hp- apresentaram expressão baixa. Matsushima et al. (2011) encontraram aumento de 5 vezes na expressão do miR-223 na mucosa antral infectada pela *H. pylori* comparada a sem infecção e, similarmente ao nosso estudo, nenhuma diferença significativa foi observada em sua expressão após a eliminação do patógeno. Entretanto, Shiotani et al. (2012) observaram diminuição na expressão deste miRNA um ano após a erradicação da *H. pylori* em câncer gástrico, gastrite crônica e úlcera. Além do mais, independente da infecção pela *H. pylori*, o miR-223 apresentou expressão elevada em gastrite crônica e metaplasia intestinal, sendo positivamente correlacionado com atividade da inflamação crônica (ISOMOTO et al., 2012). Em câncer gástrico, aumento de expressão foi associado com infecção pela *H. pylori*, pior prognóstico (MA et al., 2014), promoção de metástase (LI et al., 2011), aumento na proliferação celular e inibição da apoptose (LI et al., 2012b). A associação do miR-223 com carcinogênese gástrica não está totalmente estabelecida, sendo necessários mais estudos, dado o potencial deste miRNA como alvo terapêutico neste tipo de câncer.

Desregulação na expressão de miRNAs pela *H. pylori* pode contribuir para subverter a resposta imune do hospedeiro (NOTO; PEEK, 2012) e uma das vias possíveis é por meio da ação destes miRNAs no RNAm de citocinas pró e anti-inflamatórias (XU et al., 2011). Quando nós avaliamos a expressão do RNAm e das proteínas de mediadores inflamatórios em relação a expressão dos miRNAs foi observada apenas algumas correlações negativas no grupo Hp+ antes do tratamento. Expressão do RNAm de *TNFA* foi negativamente correlacionada com miR-103 e miR-181c, que apresentam este gene como alvo predito (TargetScan, miRNA.org e Diana Lab), e miR-370, que não é predito. Quanto às proteínas, expressão de TGF- β -R2 e de IL-12-p40 foram inversamente relacionadas ao miR-103 e miR-370, respectivamente, sendo que a primeira relação é predita em bancos de dados públicos (TargetScan). A correlação entre o RNAm de *TNFA* e dos miRNAs miR-103 e miR-370 e entre a proteína TGF- β -R2 e miR-103 foi negativa nos pacientes infectados e positiva nos não infectados. Isto indica que estes miRNAs e mediadores inflamatórios podem estar associados ao processo patológico na presença da *H. pylori*, mas não influenciar na ausência de infecção.

Para determinar se os fatores de virulência *cagA* e *vacA* influenciam na expressão de RNAm e miRNA foi avaliada a associação entre estes fatores que, de modo geral, não evidenciou diferença significativa com exceção do miR-181c, que apresentou expressão 2,4 vezes maior em indivíduos com cepas *vacA s1ml*. Os estudos de associação entre os genótipos de virulência da *H. pylori* com expressão gênica e protéica são controversos. Alguns indicam que a secreção de IL-8, TNF- α e IL-1 β e a expressão do RNAm de *IL12* são maiores em indivíduos infectados com cepas *cagA*⁺ (YAMAOKA et al., 1997; HIDA et al., 1999; PACHATHUNDIKANDI et al., 2011; MUSTAPHA et al., 2014). Por outro lado, outros estudos mostraram que a presença deste genótipo e de diferentes polimorfismos do *vacA* não influenciam a expressão do gene *TNFA* (ZALEWSKA-ZIOB et al., 2009) e *IL12A* (AL-SAMMAK et al., 2013) nem das proteínas IL-6, IL-12, TNF- α e IL-1 β (KRANZER et al., 2005; GÁRCIA-GONZÁLEZ et al., 2009). Em relação aos miRNAs, a presença do genótipo *cagA* foi associado com redução na expressão de miR-370 (FENG et al., 2013), portanto este é o primeiro estudo que relata a influência do genótipo *vacA* na expressão de miR-181c.

Em adição, nós também investigamos a associação entre *cagA* e *vacA* e a taxa de erradicação bacteriana e não observamos nenhuma influência destes fatores. Vários estudos indicam que o sucesso terapêutico depende de muitos fatores como suscetibilidade bacteriana a antibióticos (GRAHAM et al., 2008), genótipo do hospedeiro (FURUTA et al., 2002), adesão dos pacientes e genótipos de virulência da *H. pylori* (SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009). Na maioria dos casos, a erradicação é mais eficiente em cepas *cagA*⁺/*vacA**s1* (SUGIMOTO; YAMAOKA, 2009; FIGURA et al., 2012), embora falta de associação também foi encontrada (ZAMBON et al., 2007; ZHAO et al., 2007). A associação entre *cagA* e erradicação é devido a relação deste genótipo com crescimento acelerado visto que antibióticos agem durante a divisão celular (CENSINI et al., 1996; VAN DOORN et al., 2000). Neste aspecto, devemos considerar algumas limitações do nosso estudo, como a redução no número de pacientes devido a estratificação por subgrupos após a erradicação, o que pode ter afetado a análise estatística dos genótipos bacterianos.

O presente estudo enfatiza o papel da bactéria *H. pylori* na desregulação da expressão de mediadores inflamatórios e miRNAs, assim como a importância da terapia de erradicação interferindo na expressão gênica e restabelecendo a homeostase da mucosa gástrica, provavelmente por meio da ação de miRNAs.

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, considerando-se o tempo após o tratamento de erradicação da *H. pylori*, é possível obter as seguintes conclusões:

- a) A infecção pela *H. pylori* como também a inflamação da mucosa gástrica independente da presença da bactéria afetam a expressão de mediadores inflamatórios e sua erradicação altera estes padrões de expressão.
- b) A *H. pylori*, assim como sua erradicação, também desregula a expressão de microRNAs associados ao processo inflamatório, os quais encontram-se relacionados com a expressão das citocinas e participam de redes de interação.
- c) Os genótipos de virulência *cagA* e *vacA* da *H. pylori* não parecem influenciar na taxa de erradicação da bactéria, nem alterar a expressão dos miRNAs e RNAm avaliados, apesar do miR-181c ter maior expressão em indivíduos portadores de cepas *vacA s1m1*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e molecular*. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 544p.
- ACHYUT, B.R.; YANG, L. Transforming Growth Factor- β in the Gastrointestinal and Hepatic Tumor Microenvironment. **Gastroenterol**, v.141, p.1167-1178, 2011.
- ACUNZO, M. et al. MicroRNA and cancer – A brief overview. **Adv Biol Regul**, 2015. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.09.013.
- AKÇAM, M. *Helicobacter pylori* and Micronutrients. **Indian J Pediatr**, v.47, p.119-126, 2010.
- AKHIANI, A.A. et al. Protection Against *Helicobacter pylori* Infection Following Immunization Is IL-12-Dependent and Mediated by Th1 Cells. **J Immunol**, v.169, p.6977-6984, 2002.
- AL-SAMMAK, F. et al. Gastric Epithelial Expression of IL-12 Cytokine Family in *Helicobacter pylori* infection in human: Is it Head or Tail of the Coin? **PLoSOne**, v.8:e75192, 2013.
- AMIEVA, M.R.; EL-OMAR, E.M. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. **Gastroenterol**, v.134, p.306-323, 2008.
- AN, J. et al. Mir-23a in amplified 19p13.13 loci targets metallothionein 2A and promotes growth in gastric cancer cells. **J Cell Biochem**, v.114, p.2160-2169, 2013.
- ANDO, T. et al. Differential Normalization of Mucosal Interleukin-8 and Interleukin-6 Activity after *Helicobacter pylori* Eradication. **Infect Immun**, v.66, p.4742-4747, 1998.
- BACKERT, S. et al. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol**, v. 2, p.155-164, 2000.
- BALKWILL, F.R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol**, v.22, p.33-40, 2012.
- BAMFORD, K.B. et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterol**, v. 114, p. 482-492, 1998.
- BANERJEE, M.; SAXENA, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p. 1163-1170, 2012.
- BARBER, M. et al. Mechanisms and sequelae of E-cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer. **J Pathol**, v. 216, p.295–306, 2008.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, p.281-297, 2004.
- BASSO, D. et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms. **Gastroenterol**, v. 135, p. 91-99, 2008.

- BAUDITZ, J. et al. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. **Clin Exp Immunol**, v. 117, p. 316-323, 1999.
- BAUER, B.; MEYER, T.F. The human gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with gastric cancer and ulcer disease. **Ulcer**, v.2011, p.1-23, 2011.
- BAUER, B. et al. Differential expression of human beta defensin 2 and 3 in gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected individuals. **Helicobacter**, v.18, p.6-12, 2013.
- BEILHARZ, T.H. et al. microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. **PLoS One**, v.4: e6783, 2009.
- BERG, K. et al. Cytokine expression due to *Helicobacter pylori* in a tissue culture model. **Mol Cell Biochem**, v.300, p.171-175, 2007.
- BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, p.363-366, 2001.
- BESWICK, E.J. et al. Role of Gastric Epithelial Cell-Derived Transforming Growth Factor β in Reduced CD4+ T Cell Proliferation and Development of Regulatory T Cells during *Helicobacter pylori* Infection. **Infect Immun**, v. 79, p. 2737-2745, 2011.
- BHOWMICK, N.A. et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. **Science**, v.303, p.848 – 851, 2004.
- BLACK, R.A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v.385, p.729-733, 1997.
- BONCRISTIANO, M. et al. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. **J Exp Med**, v. 198, p. 1887-1897, 2003
- BOQUET, P.; RICCI, V. Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. **Trends Microbiol**, v. 20, p. 165-174, 2012.
- CADAMURO, A.C.T. et al. *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs. **World J Gastroenterol**, v.20, p.1424-1437, 2014.
- CENSINI, S. et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, p.14648-14653, 1996
- CHAN, A.O. et al. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. **Gut**, v.52, p.502-506, 2003.
- CHAN, S-H.; WANG, L-H. Regulation of cancer metastasis by microRNAs. **J Biomed Sci**, 2015. DOI: 10.1186/s12929-015-0113-7.

CHANG, H. et al. Different MicroRNA Expression Levels in Gastric Cancer Depending on *Helicobacter pylori* Infection. **Gut Liver**, 2014. DOI 10.5009/gnl13371.

CHELI, R.; GIACOSA, A. Chronic atrophic gastritis and gastric mucosal atrophy-one and the same. **Gastrointest Endosc**, v.29, p.23-25, 1983.

CHEN, Q. et al. Inducible MicroRNA-223 Down-Regulation Promotes TLR-Triggered IL-6 and IL-1 β Production in Macrophages by Targeting STAT3. **PLoSOne**, v.7, p.1-12, 2012.

CHEN, H-N. et al. *Helicobacter pylori* eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia nad dysplasia: evidence from a meta-analysis. **Gastric Cancer**, 2015. DOI 10.1007/s10120-015-0462-7.

CHEN, Z. et al. Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma. **Cancer**, v.119, p.1985-1993, 2013.

CHIBA, T.; MARUSAWA, H.; USHIJIMA, T. Inflammation-Associated Cancer Development in Digestive Organs: Mechanisms and Roles for Genetic and Epigenetic Modulation. **Gastroenterol**, v. 143, p. 550-563, 2012.

CHUAH, S-K. et al. A new look at anti- *Helicobacter pylori* therapy. **World J Gastroenterol**, v. 17, p. 3971-3975, 2011.

CORREA, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Am J Surg Pathol**, v.19, p.S37-S43, 1995.

CUI, M. et al. Association of microRNA-181c expression with the progression and prognosis of human gastric carcinoma. **Hepatogastroenterology**, v.60, p.961-964, 2013a.

CUI, M-H. et al. Upregulation of MicroRNA 181c Expression in Gastric Cancer Tissues and Plasma. **Asian Pacific J Cancer Prev**, v.14, p.3063-3066, 2013b.

DALAL, R.S.; MOSS, S.F. At the Bedside: *H. pylori*, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer. **J Leukoc Biol**, v.96, p.213-224, 2014.

DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **Lancet Oncol**, v.13, p.607-615, 2012.

DEL VECHIO, M. et al. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 4677-4685, 2007.

DIANA – microT. V3.0. Disponível em: <<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>>

DIANA – Tarbase. V7.0. Disponível em: < <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>>.

DIEHL, S. et al. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. **Immunity**, v. 13, p. 805–815, 2000.

DIEHL, S. et al. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. **J Exp Med**, v.196, p.39–49, 2002.

- DIENZ, O. et al. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4⁺ T cells. **J Exp Med**, v. 206, p.69-78, 2009.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 3720-3732, 2011.
- DING, L. et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. **Cell Research**, v.20, p.784-793, 2010.
- ELBASHIR, S.M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. **Genes Dev**, v.15, p.188-200, 2001a.
- ELBASHIR, S.M. et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **EMBO J**, v.20, p.6877-6888, 2001b.
- FAN, C. et al. Upregulation of miR-370 contributes to the progression of gastric carcinoma via suppression of FOXO1. **Biomed Pharmacother**, v.67, p.521-526, 2013.
- FENG, Y. et al. *FoxM1* is Overexpressed in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Carcinogenesis and Is Negatively Regulated by miR-370. **Mol Cancer Res**, v.11, p. 834-844, 2013
- FERROLAB: Data Mining and Bioinformatics Group. Disponível em: <<http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/>>
- FIGURA, N. et al. Factors modulating the outcome of treatment for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. **New Microbiol**, v. 35, p. 335-40, 2012.
- FUJIKI, H. et al. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- alpha, and cancer preventive agents (-)-epigallocatechin gallate and green tea—a review. **Cancer Detect Prev**, v.24, p.91-99, 2000.
- FURUTA, T. et al. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. **Gastroenterol**, v. 123, p. 92-105, 2002.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, M.A. et al. Relevance of IL-1 and TNF gene polymorphisms on interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α gastric mucosal production. **Hum Immunol**, v.70, p.935-945, 2009.
- GEBERT, B. et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science**, v. 301, p.1099-1102, 2003.
- GILBERT, L.A.; HERMANN, M.T. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. **Cell**, v.15, p.103-113, 2010.
- GODLEWSKA, R. et al. Tip-a (hp0596 gene product) is highly immunogenic *Helicobacter pylori* protein involved in colonization of mouse gastric mucosa. **Curr Microbiol**, v.56, p.279-286, 2008.

- GOLL, R. et al. *Helicobacter pylori* stimulates a mixed adaptative immune response with a strong T-regulatory component in human gastric mucosa. **Helicobacter**, v.12, p.185-92, 2007.
- GRAHAM, D.Y.; LU, H.; YAMAOKA, Y. Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved: sequential therapy and beyond. **Drugs**, v.68, p.725-36, 2008.
- GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori* Update: Gastric Cancer, Reliable Therapy, and Possible Benefits. **Gastroenterology**, 2015. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.01.040
- GRIVENNIKOV, S. et al. IL-6 and Stat3 are required for Survival of Intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. **Cancer Cell**, v.15, p.103-113, 2009.
- GU, S. et al. The biological basis for microRNA target restriction to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v.16, p.144-150, 2009.
- GUIRALDES, E. et al. Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.33, p.1270132, 2001.
- GUO, W. et al. Concordant repression and aberrant methylation of transforming growth factor-beta signaling pathway genes occurs early in gastric cardia adenocarcinoma. **Mol Biol Rep**, v.39, p.9453-9462, 2012a.
- GUO, W. et al. Association of polymorphisms in transforming growth factor- β receptors with susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma. **Mol Biol Rep**, v.39, p.4301-4309, 2012b.
- GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, L.; WRIGHT, N.A. Biology of metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration. **Digest Liver Dis**, v.40, p.510-522, 2008.
- HAHM, K.B. et al. Conditional loss of TGF-beta signaling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in Mice. **Aliment Pharmacol Ther**, v.16, p.115-127, 2002.
- HAMMOND, S.M. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v.404, p.293-295, 2000.
- HASHIMOTO, Y. et al. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.31, p.777-784, 2010.
- HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **J Gastroenterol**, v.44, p.239-248, 2009.
- HAWKINS, P.G.; MORRIS, K.V. RNA and transcriptional modulation of gene expression. **Cell Cycle**, v. 7, p. 602-607, 2008.
- HERRERA, V.; PARSONNET, J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. **Clin Microbiol Infect**, v.15, p.971-976, 2009.

- HIDA, N. et al. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. **J Clin Pathol**, v.52, p.658-664, 1999.
- HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **Intern Rev Immunol**, v.16, p. 249–284, 1998.
- HOFMAN, V.J. et al. Gene expression profiling in human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. **Modern Pathology**, v.20, p. 974–989, 2007
- HONG, S. et al. Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: Focus on TGF- β signaling. **World J Gastroenterol**, v.16, p.2080-2093, 2010.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Biological agents, IARC monographs, vol. 100B. Lyon: IARC; 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2015.
- ISOMOTO, H. et al. Interwaving MicroRNAs and Proinflammatory Cytokines in Gastric Mucosa with Reference to *H. pylori* Infection. **J Clin Immunol**, v. 32, p. 290-299, 2012.
- JANG, B-G; KIM, W.H. Molecular Pathology of Gastric Carcinoma. **Pathobiology**, v.78, p.302-310, 2011.
- JONES, E.Y.; STUART, D.I.; WALKER, N.P. Structure of tumour necrosis factor. **Nature**, v.338, p.225-228, 1989.
- KALALI, B. et al. *H. pylori* Virulence Factors: Influence on Immune System and Pathology, v.2014, p.1-9, 2014.
- KANG, C. et al. Epigenetics: An emerging players in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v.20, p.6433-6447, 2014.
- KARTTUNEN, R.A. et al. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10 and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with *Helicobacter pylori*. **Scand J Gastroenterol**, v.32, p.22-27, 1997.
- KEATES, S. et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- *Helicobacter pylori*. **J Immunol**, v.163, p.5552-5559, 1999.
- KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S.D.; Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v.115, p.209-216, 2003.
- KIM, B.H. et al. Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. **J Surg Oncol**, v.107, p.505-510., 2013.

- KIM, K.K.; KIM, H. B. Protein interaction network related to *Helicobacter pylori* infection response. **World J Gastroenterol**, v.15, p.4518-4528, 2009.
- KINDLUND, B. et al. FOXP3-expressing CD4(+) T-cell numbers increase in areas of duodenal gastric metaplasia and are associated to CD4(+) T-cell aggregates in the duodenum of *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients. **Helicobacter**, v.14, p.192-201, 2009.
- KODAIRA, M.S.; ESCOBAR, A.M.U.; GRISIS, S. Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection in childhood and adolescence. **Rev Saúde Pública**; v.36, p.356-369, 2002.
- KRANZER, K. et al. Impact of *Helicobacter pylori* Virulence Factors and Compounds on Activation and Maturation of Human Dendritic Cells. **Infect Immun**, v.73, p.4180-4189, 2005.
- KUNDU, J.K.; SURH, Y-J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. **Free Radical Bio Med**, v.52, p.2013-2037, 2012.
- LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 64, p. 31-49, 1964.
- LAURENCE, A. et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. **Immunity**, v.26, p.371-381, 2007.
- LEE, E.S. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* Increases Ghrelin mRNA Expression in the Gastric Mucosa. **J Korean Med Sci**, v.25, p.265-271, 2010.
- LEE, Y. et al. The nuclear Rnase II Droscha initiates microRNA processing. **Nature**, v.425, p.45-419, 2003.
- LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J**, v.23, p.4051-4060, 2004.
- LEE, Y-C. et al. The benefit of eradication of *Helicobacter pylori* infection: a community-based study of gastric cancer prevention. **Gut**, v.62, p.676-682, 2013.
- LEE, K.; HWANG, H.; NAM, K.T. Immune response and the tumor microenvironment: how they communicate to regulate gastric cancer. **Gut Liver**, 2014. DOI 10.5009/gnl.2014.8.2.131.
- LEE, H.N.; NA, H.K.; SURTH, Y.J. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. **Semin Immunopathol**, v.35, p.151-161, 2013.
- LEWIS, B.P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v.115: 787-798, 2003.
- LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v.120, p.15-20, 2005.

- LI, B-S. et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as Novel Potential Biomarkers for Gastric Cancer Detection. **Plos One**, v. 7, p. 1-8, 2012a.
- LI, J. et al. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.138, p.763-774, 2012b.
- LI, S-C.; PAN, C-Y.; LIN, W-C. Bioinformatic discovery of microRNA precursors from human ESTs and introns. **BMC Genomics**, v.7: 164, 2006.
- LI, X. et al. miRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. **Mol Cancer Res**, v.9, p.824-833, 2011.
- LI, Y. et al. Epigenetic silencing of miRNA-9 is correlated with promoter-proximal CpG island hypermethylation in gastric cancer in vitro and in vivo. **Int J Oncol**, v.45, p.2576-2486, 2014.
- LIAO, W.; LIN, J.K.; LEONARD, W.J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. **Curr Opin Immunol**, v.23, p.598-604, 2011.
- LO, S-S. et al. Overexpression of miR-370 and downregulation of its novel target TGF β -RII contribute to the progression of gastric carcinoma. **Oncogene**, v. 31, p.226-237, 2012.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth F R**, v.22, p.189-195, 2011.
- LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**,v.435, p.834-838, 2005.
- MA, L. et al. Increased microRNA-223 in *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer contributed to cancer cell proliferation and migration. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.78, p.602-608, 2014.
- MABE, K. et al. Does *Helicobacter pylori* eradication therapy for peptic ulcer prevent gastric cancer?. **World J Gastroenterol**, v. 15, p. 4290-97, 2009.
- MALEK, T.R. The biology of interleukin-2. **Annu Rev Immunol**, v.26, p. 453–479, 2008.
- MALFERTHEINER, P.; VENERITO, M.; SELGRAD, M. *Helicobacter pylori* infection: selected aspects in clinical management. **Curr Opin Gastroenterol**, v.29, p.669-675, 2013.
- MARCO, A. et al. MicroRNAs from the same precursors have different targeting properties. **Silence**, v.3:8, 2012.
- MARCUS, E.A. et al. The effects of varying acidity on *Helicobacter pylori* growth and the bactericidal efficacy of ampicillin. **Aliment Pharmacol Ther**, v.36, p.972-979, 2012.
- MASSARRAT, S. et al. Precancerous conditions after *H. pylori* eradication: a randomized double blind study in first degree relatives of gastric cancer patients. **Arch Iran Med**, v. 15, p. 664-9, 2012.

- MATSUSHIMA, K. et al. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. **Int J Cancer**, v. 128, p.361-370, 2011.
- MAUER, J.; DENSON, J.L.; BRÜNING, J.C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. **Trends Immunol**, 2015. DOI 10.1016/j.it.2014.12.008.
- McLEAN, M.H.; EL-OMAR, E. M. Genetics of gastric cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 2014. DOI 10.1038/nrgastro.2014.143.
- MERA, R. et al. Long term follow up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v.54, p.1536-1540, 2005.
- MIAO, L. et al. miR-375 inhibits *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis by blocking JAK2–STAT3 signaling. **Cancer Immunol Immunother**, v.63, p.699-711, 2014.
- microRNA.org – Targets and Expression. August 2010. Disponível em: <<http://www.microrna.org>>.
- MIRANDA, A.C.P. et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children of low socioeconomic level in São Paulo. **Sao Paulo Med J**, v. 128, p. 187-191, 2010.
- miRBase: the microRNA database. Release 21. June 2014. Disponível em: <www.mirbase.org>
- MiRTarBase: the experimentally validated microRNA-target interactions database. Release 4.5. November 2013. Disponível em: <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>>
- MIVAZONO, K.; SUZUKI, H.; IMAMURA, T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. **Cancer Sci**, v. 94, p. 230-34, 2003.
- MONACK, D.M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. Persistent Bacterial Infections: the interface of the pathogen and the host immune system. **Nature**, v.2, p.747-765, 2004.
- MOURELATOS, Z. et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. **Genes Dev**, v.16, p.720-728, 2002.
- MUSTAPHA, P. et al. Chemokines and Antimicrobial Peptides Have a *cag*-Dependent Early Response to *Helicobacter pylori* Infection in Primary Human Gastric Epithelial Cells. **Infect Immun**, v.82, p.2881-2889, 2014.
- NECULA, L.G. et al. IL-6 and IL-11 as Markers for Tumor Aggressiveness and Prognosis in Gastric Adenocarcinoma Patients without Mutations in Gp130 subunits. **J Gastrointestin Liver Dis**, v.21, p.23-29, 2012.
- NOTO, J.M.; PEEK, R.M. The role of microRNAs in *Helicobacter pylori* pathogenesis and gastric carcinogenesis. **Front Cell Infect Microbiol**, v.1, p.1-19, 2012.

- OERTLI, M. et al. MicroRN155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. **J Immunol**, V.187, P.3578-3586, 2011.
- OLIVEIRA, J.G. et al. Profiles of Gene Polymorphisms in Cytokines and Toll-Like Receptors with Higher Risk for Gastric Cancer. **Dig Dis Sci**, v.58, p.978-988, 2013.
- OSHIMA, H. et al. TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of *Noxo1* and *Gna14* in tumor cells. **Oncogene**, v.33, p.3820-3829, 2014.
- PACHATHUNDIKANDI, S.K. et al. Induction of TLR-2 and TLR-5 Expression by *Helicobacter pylori* Switches *cagPAI*-Dependent Signalling Leading to the Secretion of IL-8 and TNF- α . **PLoS ONE**, v.6, e19614, 2011.
- PARK, E.J. et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. **Cell**, v.140, p.197-208, 2010.
- PARK, J.Y. et al. *Helicobacter pylori* Eradication in the Prevention of Gastric Cancer: Are More Trials Needed? **Curr Oncol Rep**, v.15, p.517-525, 2013.
- PARREIRA, P. et al. *Helicobacter pylori* infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. **Crit Rev Microbiol**, 2014. DOI: 10.3109/1040841X.2014.892055.
- PARSONS, R. et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. **Cancer Res**, v.55, p.5548-5550, 1995.
- POLK, D.B.; PEEK, R.M. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. **Nature Reviews**, v.10, p.403-414, 2010.
- POSSELT, G.; BACKERT, S.; WESSLER, S. The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. **Cell Commun Signal**, v. 11: 77, 2013.
- RANJHA, R.; PAUL, J. Micro-RNA in inflammatory diseases and as a link between inflammation and cancer. **Inflamm. Res**, v.62, p.343-355, 2013.
- RATH, T. et al. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. **Arch Toxicol**, 2015. DOI 10.1007/s00204-015-1461-5.
- RESENDE, C. et al. Gastric Cancer: Basic Aspects. **Helicobacter**, v.16, p.38-44, 2011.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. et al. Ultra-Deep Sequencing Reveals the microRNA Expression Pattern of the Human Stomach. **Plos ONE**, v. 5, p. 1-8, 2010.
- RIMBARA, E.; FISCHBACH, L.A.; GRAHAM, D.Y. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 79-88, 2011.

- RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Trends Immunol**, v. 33, p. 571-577, 2012.
- ROESLER, B.M.; COSTA, S.C.B.; ZEITUNE, M.R. Eradication Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: Its Importance and possible Relationship in Preventing the Development of Gastric Cancer. **ISRN Gastroenterol**, v. 2012, p.1-9, 2012.
- ROMERO-GALLO, J. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric carcinogenesis. **Lab Invest**, v.88, p.328-336, 2008.
- ROSENFELD, N. et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. **Nat Biotechnol**, v.26, p. 462-469, 2008.
- ROTKRUA, P. et al. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model. **Brit J Cancer**, v.108, p.932-940, 2013.
- SALAMA, N.R.; HARTUNG, M.L.; MÜLLER, A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, p. 385-399, 2013.
- SAYI, A. et al. The CD4+ T cell-mediated IFN-gamma response to *Helicobacter* infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. **J immunol**, v.182, p.7085-7101, 2009.
- SCHOLTE, G.H.A. et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy. **Am J Gastroenterol**, v. 97, p.1687-1695, 2002.
- SCHWARZ, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v.115, p.199-208, 2003.
- SEDER, R.A.; PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+T cells. **Annu. Rev. Immunol**, v. 12, p. 635-673, 1994.
- SELBACH, M. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**, v.455, p.58-63, 2008.
- SENTHILHUMAR, C. et al. Molecular and histological evaluation of tumor necrosis factor-alpha expression in *Helicobacter pylori*-mediates gastric carcinogenesis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.137, p.577-583, 2011.
- SERELLI-LEE, V. et al. Persistent *Helicobacter pylori* Specific Th17 responses in Patients with Past *H. pylori* infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1 β . **PLoSOne**, v.7: e39199, 2012.
- SHEN, Z-Y. et al. miR-375 inhibits the proliferation of gastric cancer cells by repressing ERBB2 expression. **Exp Ther Med**, v.7, p.1757-1761, 2014.
- SHIGEMATSU, Y. et al. Interleukin-1 β induced by *Helicobacter pylori* infection enhances mouse gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, v.340, p.141-147, 2013.

SHIMIZU, T. et al. Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis. **Cancer Sci**, v.103, p.1201-1206, 2012.

SHIOTANI, A. et al. *H. pylori* eradication did not improve dysregulation of specific oncogenic miRNAs in intestinal metaplastic glands. **J Gastroenterol**, v. 47, p.988-998, 2012.

SHRESTHA, S. et al. A systematic review of microRNA expression profiling studies in human gastric cancer. **Cancer Med**, v.3, p.878-888, 2014.

SIEBUTH, D. et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. **Genomics**, v. 14, p. 59-62, 1992.

SMITH, M.G. et al. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v.12, p.2979-2990, 2006.

SUGANUMA, M. et al. Discrete roles of cytokines, TNF- α , IL-1, IL-6 in tumor promotion and cell transformation. **Int J Oncol**, v. 20, p. 131-136, 2002.

SUGANUMA, M. et al. Human gastric cancer development with TNF- α -inducing protein secreted from *Helicobacter pylori*. **Cancer Lett**, v.322, p.133-138, 2012.

SUGIMOTO, M. et al. Treatment strategy to eradicate *Helicobacter pylori* infection: impact of pharmacogenomics-based acid inhibition regimen and alternative antibiotics. **Expert Opin Pharmacother**. v. 8, p. 2701-2717, 2007.

SUGIMOTO, M. et al. Helicobacter pylori outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, p. 1677-1684, 2011.

SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 57, p. 45-56, 2009.

SUNDRUD, M. S. et al. L.Inhibition of primary human T cell pro-liferation by Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 7727-7732, 2004.

SZLOSAREK, P.W.; BALKWILL, F.R. Tumor necrosis factor α : a potential target for the therapy of solid tumours. **Lancet Oncol**, v.4, p.565-563, 2003.

TANAKA, H. et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 498, p.35-42, 2010.

TargetScan Human. Release 6.0. November 2011. Disponível em: <<http://www.targetscan.org>>.

TCHERNITSA, O. et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. **J Pathol**, v.222, p.310-319, 2010.

TRUONG, B.X. et al. Diverse Characteristics of the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori* Strains Collected from Patients from Southern Vietnam with Gastric Cancer and Peptic Ulcer. **J Clin Microbiol**, v.47, p.4021-4028, 2009.

TSAI, M.Y. et al. A mitotic lamin B matrix induced by ranGTP required for spindle assembly. **Science**, v. 311, p. 1887-93, 2006.

TSANG, Y.T. et al. Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. **J Immunol**, v. 159, p. 4566-4577, 1997.

TSUKAMOTO, Y. et al. MicroRNA-375 Is Downregulated in Gastric Carcinomas and Regulates Cell Survival by Targeting PDK1 and 14-3-3 ζ . **Cancer Res**, v.70, p.2339-2349, 2010.

UEDA, T. et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. **Lancet Oncol**, v.11, p.136-146, 2010

van de VEERDONK, F.L. et al. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. **Trends Immunol**, v. 32, p. 110- 116, 2011.

VAN DOOR, L.J. et al. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. **Gut**, v.46, p.321-326, 2000

VARIS, K. et al. Implications of serum pepsinogen I in early endoscopic diagnosis of gastric cancer and dysplasia. Helsinki Gastritis Study Group. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, p. 950–956, 2000.

VIRTUE, A.; WANG, H.; YANG, X-F. MicroRNAs and Toll-like Receptor/Interleukin-1 Receptor Signaling. **J Hematol Oncol**, v.5, p.1-17, 2012.

WANG, F. et al. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Cancer Lett**, v.345, p.196-202, 2014.

WANG, J. et al. Gastric atrophy and Intestinal Metaplasia before and after *Helicobacter pylori* Eradication: A Meta-Analysis. **Digestion**, v. 83, p. 253-260, 2011.

WANG, M. et al. Relation between interleukin-1 beta messenger RNA in gastric fundic mucosa and gastric juice pH in patients infected with *Helicobacter pylori*. **J Gastroenterol**, v. 34, p. 10-17, 1999.

WEN, S.; MOSS, S.F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, v.282, p.1-8, 2009.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**, v.11, p.228-234, 2009.

WU, W-Y. et al. Potentially predictive microRNAs of gastric cancer with metastasis to lymph node. **World J Gastroenterol**, v. 17, p.3645-3651, 2011.

- WU, M.S. et al. Proteomic identification of biomarkers related to *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease: Challenges and opportunities. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, p. 1657-61, 2008.
- XU, Y. et al. Snail-Regulated MiR-375 Inhibits Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by targeting JAK2. **PLoS ONE**, v.9, e99516, 2014.
- XU, Z. et al. miR-365, a Novel Negative Regulator of Interleukin-6 Gene Expression, Is Cooperatively Regulated by Sp1 and NF- κ B. **J Biol Chem**, v. 286, p.21401-21412, 2011.
- YAMAOKA, Y. et al. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. **Gut**, v.41, p.442-451, 1997.
- YANG, O.; HUANG, J.; LIN, S. Regulatory effects of miRNA on gastric cancer cells. **Oncol Lett**, v.8, p.651-656, 2014.
- YANG, Y. et al. IL-6 plays a unique role in initiating c-Maf expression during early stage of CD4 T cell activation. **J Immunol**, v. 174, p. 2720–2729, 2005.
- YANG, Z-M.; CHEN, W-W.; WANG, Y-F. Gene expression profiling in gastric mucosa from *Helicobacter pylori*-infected and uninfected patients undergoing chronic superficial gastritis. **PLoS One**, v.7, e33030, 2012.
- YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev**, v.17, p.3011-3016, 2003.
- YIN, Y. et al. The nuclear factor- κ B correlates with increased expression of interleukin-6 and promotes progression of gastric carcinoma. **Oncol Rep**, v.29, p.34-38, 2013.
- YING, S.Y.; LIN, S.L. Intronic microRNAs. **Biochem Biophys Res Commun**, v.326, p.515-520, 2005.
- ZABATELA, J. MicroRNA: a bridge from *H. pylori* infection to gastritis and gastric cancer development. **Frontiers in genetics**, v. 3, p.1-6, 2012.
- ZALEWSKA-ZIOB, M. et al. TNF- α expression in gastric mucosa of individuals infected with different virulent *Helicobacter pylori* Strains. **Med Sci Monit**, v.15, p.BR166-171, 2009.
- ZAMBON, C-F. et al. Clarithromycin Resistance, Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphism and Mucosal Inflammation Affect *H. pylori* Eradication Success. **J Gastrointest Surg**, v.11, p.1506-1514, 2007.
- ZHANG, S. et al. Human Immune Responses to *H. pylori* HLA Class II Epitopes Identified by Immunoinformatic Methods. **PloSOne**, v.9, e94974, 2014.
- ZHAO, C. et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori*. **BMC Cancer**, v.10: 419, 2010.
- ZHAO, J-D. et al. Associations between interleukin-1 polymorphisms and gastric cancers among three ethnicities. **World J Gastroenterol**, v. 18, p.7093-7099, 2012.

ZHAO, J.J. et al. Influence of *Helicobacter pylori* genotype on triple eradication therapy. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, p. 2251-55, 2007.

ZHOU, P. et al. Large-scale screens of miRNA-mRNA interactions unveiled that the 3'UTR of a gene is targeted by multiple miRNAs. **PloS One**, v.8: e68204, 2013.

ZHOU, L. et al. Relationship of *Helicobacter pylori* eradication with gastric cancer and gastric mucosal histological changes: a 10-year follow-up study. **Chin Med J**, v.127, p.1454-1458, 2014.

ZHU, W. et al. miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. **Int J Cancer**, v.127, p.2520-2529, 2010.

ANEXO

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional.

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da expressão de microRNAs e citocinas associados ao processo inflamatório pela *Helicobacter pylori*.

Pesquisador: Ana Flávia Teixeira Rossi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14970913.0.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 307.691

Data da Relatoria: 11/06/2013

Apresentação do Projeto:

A infecção persistente por *Helicobacter pylori* promove inflamação crônica, sendo o principal fator etiológico para progressão do câncer de estômago a partir da gastrite atrófica, metaplasia e displasia. A bactéria também possui fatores de virulência como *cagA* e *vacA* que modulam a resposta imune do hospedeiro, inflamação crônica e mudanças patológicas da mucosa gástrica. Por outro lado, a erradicação da *H. pylori* pode ser capaz de reverter lesões pré-cancerosas, prevenindo a transformação maligna, sendo a eficiência desta prevenção dependente do tempo de infecção.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a expressão dos miRNAs miR-103, miR-200c, miR-223, miR-365, miR-370 e miR-375 pela técnica de PCR em tempo real, em tecido gástrico de pacientes com dispepsia *H. pylori*- positivos antes e após o tratamento de erradicação da bactéria, em comparação com um grupo sem infecção pela bactéria;
- Avaliar a expressão quantitativa do mRNA dos genes das citocinas IL-1 β , IL2, IL-6, IL12, TGFB-RII e TNF- γ nos mesmos grupos por PCR em tempo real e investigar a associação entre a expressão dos miRNAs e do mRNA das citocinas;
- Avaliar a expressão protéica das citocinas com expressão gênica alterada nas mesmas amostras

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2545

Fax: (17)3221-2500

E-mail: soraiafr@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 307.691

e condições por imuno-histoquímica;

d) Investigar a ocorrência de associação dos genótipos de virulência cagA e vacA da *H. pylori* com os níveis de expressão dos miRNAs e dos genes de citocinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Considerando que o projeto será realizado com amostras armazenadas no Laboratório, os participantes de pesquisa não estão expostos à riscos. os benefícios do projeto são indiretos, gerando novas informações à comunidade científica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo inédito e relevante, pois não há relatos na literatura que tenha investigado expressão de miRNA e citocinas em indivíduos infectados pela *H. pylori* antes e após o tratamento de erradicação da bactéria, assim poderá contribuir no esclarecimento de mecanismos que regulam a resposta imune do hospedeiro e que possam favorecer a inflamação persistente e consequentemente a progressão no processo de carcinogênese do estômago.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE e a aprovação deste CEP do projeto anterior (Parecer CEP IBILCE/UNESP nº 030/10), em que foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de todos os participantes, após os devidos esclarecimentos sobre o projeto pela própria pesquisadora, em que já estava previsto o armazenamento das amostras e o uso em pesquisas futuras. Desta forma, solicita a dispensa da obtenção de outro TCLE devido às dificuldades para contato com os pacientes.

Também apresenta o questionário aplicado aos participantes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2545 Fax: (17)3221-2500 E-mail: soraiifr@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 307.691

SAO JOSE DO RIO PRETO, 18 de Junho de 2013

Assinador por:
Raul Aragão Martins
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2545 Fax: (17)3221-2500 E-mail: soraiafr@ibilce.unesp.br

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____ / ____ / ____

Assinatura