
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**INFLUÊNCIA DO SNP *T3801C CYP1A1* SOBRE OS NÍVEIS DE DANOS
OXIDATIVOS NO DNA DE CÉLULAS DA MUCOSA GÁSTRICA DE
PACIENTES INFECTADOS PELO *H. PYLORI***

Cíntia Helena Duarte Sagawa

Orientador: Dr. Marcelo Sady Plácido Ladeira

Botucatu - SP

2009

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

**INFLUÊNCIA DO SNP *T3801C CYP1A1* SOBRE OS NÍVEIS DE DANOS
OXIDATIVOS NO DNA DE CÉLULAS DA MUCOSA GÁSTRICA DE
PACIENTES INFECTADOS PELO *H. PYLORI***

Cíntia Helena Duarte Sagawa

Orientador: Dr. Marcelo Sady Plácido Ladeira

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas no Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Botucatu.

Botucatu - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Sagawa, Cíntia Helena Duarte.

Influência do SNP T3801C CYP1A1 sobre os níveis de danos oxidativos no DNA de células da mucosa gástrica de pacientes infectados pelo *H. Pylori* / Cíntia Helena Duarte Sagawa. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Marcelo Sady Plácido Ladeira

1. Genética 2. *Helicobacter Pylori* - Efeito fisiológico 3. DNA

Palavras-chave: Danos no DNA; Ensaio Cometa; Espécies reativas de oxigênio

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Massami e Maria do Carmo,
pelo exemplo e dedicação.*

*Ao meu amor, Victor,
pelo carinho e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Sady Plácido Ladeira, pela oportunidade de conhecer essa área de estudo e desenvolver esse trabalho.

Ao meu supervisor, Dr. Alaor Aparecido Almeida, por ser prestativo e atencioso.

Aos pacientes que foram voluntários nesse trabalho.

Aos amigos de laboratório, Bruna Fornazari dos Santos, Renato Paschoal Prado, Giovana Caramaschi Degelo e Sérgio de Freitas Scanapieco, pela parceria e amizade principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Massami Sagawa e Maria do Carmo Duarte Sagawa, pela dedicação e apoio, por acreditarem sempre nas minhas escolhas e por me estimularem a seguir em frente.

Ao meu irmão, Cássio Massashi Duarte Sagawa, e a minha família, que são e sempre serão meu porto seguro.

Ao meu amor, namorado e amigo, Victor Alberto Tagliacollo, por todo o incentivo, confiança e carinho. Por não me fazer esquecer que a verdadeira conquista só vem com muito esforço e dedicação.

Às minha amigas e companheiras de república, Luana Longon, Bianca Balbino, Júlia Ávila de Oliveira, Paula Keiko Takeda Nakayama e Cristiane de Abreu Estanislau, pelos momentos de alegria e amizade.

À minha amiga, Thays Bragança Candido dos Santos, por sempre acreditar no meu potencial e por simplesmente, não importando a distância, estar sempre do meu lado.

“Não devemos ter medo dos confrontos.

***Até os planetas se chocam,
e do caos nascem as estrelas”***

Charles Chaplin

RESUMO

O *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) é um patógeno gástrico que infecta mais de 50% da população mundial e tem sido associado com gastrite crônica, úlcera gástrica, úlcera duodenal e câncer gástrico. Embora a maioria das pessoas infectadas desenvolva gastrite, há uma variedade de respostas clínicas, e apenas uma minoria (<1%) dos indivíduos infectados desenvolve câncer gástrico. Evidências sugerem que a reação inflamatória crônica causada pela infecção bacteriana pode estar envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio ou espécies reativas de nitrogênio. Isso pode causar danos no DNA, que junto com a resposta celular poderia gerar mutações gênicas e aberrações cromossômicas, caracterizando instabilidade genômica que representaria um primeiro passo na carcinogênese gástrica. A extensão e a severidade da inflamação da mucosa gástrica, assim como a resposta clínica da infecção, dependem de vários fatores, incluindo a suscetibilidade genética como o *SNP T3801C CYP1A1*, resposta imune, idade que a infecção foi adquirida, fatores ambientais, especialmente a dieta e fatores de virulência bacteriana. Devido ao risco de desenvolvimento de câncer gástrico em humanos infectados pelo *H. pylori*, utilizamos o Ensaio Cometa para investigar a influência do *SNP T3801C CYP1A1* sobre os níveis de danos oxidativos no DNA nas células epiteliais gástricas. O estudo foi conduzido a partir de biópsias do antro e corpo gástrico de 103 pacientes infectados *H.pylori* e 24 pacientes controles (não infectados). A genotipagem do *SNP T3801C CYP1A1* foi determinada por PCR-RFLP e os níveis de danos no DNA em células da mucosa do antro e corpo gástricos pelo Ensaio Cometa. Os níveis de danos no DNA nas células epiteliais gástricas de pacientes infectados pelo *H. pylori* com gastrite leve, moderada e severa e câncer gástrico foram significativamente maiores, quando comparados aos pacientes não infectados pelo *H. pylori* com mucosa normal. Entretanto, os níveis de danos no DNA não foram influenciados pelo *SNP T3801C CYP1A1* em nenhum dos grupos. Esses resultados indicam que o polimorfismo *T3801C CYP1A1* não influenciou os níveis de danos no DNA em células epiteliais gástricas de pacientes infectados pelo *H. pylori* com gastrite leve, moderada e severa e câncer gástrico.

PALAVRAS CHAVES: Espécies reativas de oxigênio, Danos no DNA, Ensaio Cometa.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a common gastric pathogen that has infected more than 50% of the population of the world and it has been associated with chronic gastritis, gastric ulcers, duodenal ulcer, and gastric cancer. Although, almost all infected people develop gastritis, there is a variety of clinical outcomes, and only a minority (<1%) of infected individuals develop gastric cancer. There are evidences which suggest that the chronic inflammatory reaction caused by the bacterial infection may be involved in the production of reactive oxygen species or reactive nitrogen species. It may lead to DNA damage, which together with the cellular response could lead to gene mutations, chromosomal aberrations characterizing genomic instability that may represent the early step in gastric carcinogenesis. The extent and severity of gastric mucosal inflammation, as well as the clinical outcome of the infection, depend on a number of factors, including the host genetic susceptibility such SNP *T3801 CYP1A1*, immune response, age at which the infection was acquired, environmental factors, especially dietary and bacterial virulence factors. Due to the risk of developing gastric cancer in humans infected by *H. pylori*, we used the Comet Assay to investigate the influence of the SNP *T3801C CYP1A1* on levels of oxidative DNA damage in gastric epithelial cells. The study was conducted with biopsies from the gastric antrum and corpus of 103 *H. pylori*-infected patients and 24 uninfected control patients. Genotype of SNP *T3801C CYP1A1* was determined by PCR-RFLP and DNA damage levels were measured in gastric mucosal cells from antrum and corpus by the Comet assay. Levels of DNA damage in gastric mucosa cells from antrum and corpus of *H. pylori*-infected patients with mild, moderate, severe gastritis, and gastric cancer were significantly higher compared to uninfected normal mucosa cells. However, levels of DNA damage were not influenced by SNP *T3801C CYP1A1* in any groups. Our results indicate that SNP *T3801C CYP1A1* polymorphisms did not influence the level of DNA damage in gastric epithelial cells of *H. pylori*-infected patients with mild, moderate, severe gastritis, and gastric cancer.

KEY WORDS: Reactive oxygen species, DNA damage, Comet assay.

INTRODUÇÃO

O câncer gástrico, segundo estudos epidemiológicos, é a segunda maior causa de morte por câncer no mundo, apesar da queda de incidência na maioria dos países industrializados (Kamangar *et al.*, 2006). Estimativas brasileiras apontam que o número de novos casos corresponde a 15 a cada 100 mil homens e 8 a cada 100 mil mulheres. Esses dados tendem a crescer devido ao aumento da expectativa de vida da população Brasileira, já que cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico têm mais de 50 anos (INCA, 2009). O câncer gástrico é classificado em carcinoma gástrico difuso e em carcinoma gástrico intestinal (Lauren, 1965). O carcinoma gástrico difuso forma-se a partir de mucosa gástrica normal ou de lesões hiperplásticas e há falta de coesão entre as células gástricas prejudicando suas funções (Lauren, 1991). Já a formação do carcinoma gástrico intestinal envolve um processo de etapas sequenciais que se iniciam com o desenvolvimento da gastrite crônica a partir da mucosa normal (Correa, 1992). Nas etapas iniciais ocorrem também a gastrite e a atrofia que são relacionadas ao consumo excessivo de sal (Kim *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 2008) e a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Parsonnet *et al.*, 1991; Weck *et al.*, 2009).

Atualmente é aceita a associação entre a infecção pela *H. pylori* e câncer gástrico (IARC, 1994; Ito *et al.*, 2009). A importância do seu papel na carcinogênese se deve ao fato da gastrite crônica ser uma resposta imune local à infecção pela bactéria (Sipponen *et al.*, 1998), que gera infiltrações de células mononucleares na mucosa gástrica do corpo e principalmente do antro (Stolte *et al.*, 1990; Wyatt, 1991; Fiocca *et al.*, 1994). A reação inflamatória crônica causada pela infecção bacteriana leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou espécies reativas de nitrogênio (RNS). O estresse oxidativo causado pelas ROS (Halliwell *et al.*, 1991) e RNS (Teh *et al.*, 1999)

gera danos no DNA, que podem levar à suscetibilidade a mutações de ponto e aberrações cromossômicas, sendo por isso um marcador para o risco de desenvolvimento de câncer (Smith *et al.*, 2003). Danos no DNA variam conforme a extensão e a severidade da inflamação da mucosa gástrica, assim como a resposta clínica da infecção (Ladeira *et al.*, 2004). Entretanto, Menaker *et al.* (2004) demonstraram que para o desenvolvimento do câncer gástrico são necessários outros fatores além da infecção gástrica, já que apenas uma minoria (<1%) dos indivíduos infectados pela bactéria inicia o processo de carcinogênese (Matysiak-Budnick, 2006). A gravidade das lesões gástricas e o eventual resultado clínico da infecção parecem ser determinados pela combinação de fatores ambientais, estilo de vida, patogenicidade da bactéria e a suscetibilidade genética do hospedeiro (McClain *et al.*, 2009).

Existem genes que por codificarem enzimas metabólicas são considerados fatores de risco, pois alteram potencialmente a suscetibilidade genética individual ao dano genotóxico (Wu *et al.*, 2002). Os genes pertencentes à família dos Citocromo P450 (CYPs) codificam enzimas de metabolismo oxidativo mediado (Fase I) (Nebert, 1991) que metabolizam substâncias endógenas e exógenas. Estes genes são altamente polimórficos e atuam na ativação metabólica de pré-carcinógenos, o que leva a procura de variantes genéticas que predispõe a certos tipos de câncer. Entre os CYPs estudados em relação ao câncer, o *CYP1A1* está entre os mais comumente investigados (Zhang *et al.*, 2004; Zhuo *et al.*, 2009). A variação genética do *CYP1A1* pode estar associada com um aumento no risco de desenvolvimento de cânceres, como o câncer de pulmão (Shi *et al.*, 2008), câncer de esôfago (Yang *et al.*, 2005) e câncer de laringe (Zhuo *et al.*, 2009). Normalmente, o gene *CYP1A1* não é expresso ou é pouco expresso em células epiteliais gástricas (Murray *et al.*, 1998), mas torna-se ativado no câncer gástrico e em lesões pré-malignas (Zhang *et al.*, 2004), sugerindo que o *CYP1A1* se expressa na fase precoce da

carcinogênese gástrica e exerce os seus efeitos em todas as etapas do processo oncogênico.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem causar alterações na expressão gênica (Erichsen & Chanock, 2004). Foram encontrados 151 SNPs no gene *CYP1A1* (NCBI, 2009), sendo um deles representado pela substituição de timina por citosina T → C (*T3801C*). Essa substituição cria um sítio de clivagem da enzima de restrição *MspI* localizado no alelo *CYP1A1**2A. Esse SNP possui associação a elevados níveis de atividade gênica (Pavanello, 2003), consequentemente podendo levar a maiores níveis de biotransformação de agentes pré-carcinogênicos, presentes na dieta, em agentes eletrofílicos (potencialmente carcinogênicos), que podem lesar o DNA (Belitsky *et al.*, 2008)

Assim, essas evidências demonstram que o *CYP1A1* pode desempenhar papel positivo na carcinogênese gástrica presumivelmente através dos danos oxidativos no DNA de células da mucosa gástrica.

OBJETIVO

Investigar a influência do *SNP T3801C CYP1A1* nos níveis de danos oxidativos no DNA de células da mucosa gástrica em indivíduos infectados pelo *H. pylori*.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu- SP, Brasil. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento esclarecido pós-informação.

Foram coletadas biópsias de 127 pacientes com idades entre 19 e 88 anos. Todos eram não fumantes, não etilistas, não usuários de drogas e sem qualquer medicação há, no mínimo, 30 dias antes do estudo. Todos os pacientes submeteram-se à endoscopia digestiva por apresentarem sintomas de patologias gastrointestinais. Assim, as biópsias foram coletadas da curvatura menor até 2 cm do anel pilórico e do corpo, entre 50 e 55 cm ao longo da curvatura maior. Duas biópsias do antro, duas do corpo e várias da lesão (câncer gástrico) foram enviadas para estudo histopatológico. Uma biópsia de cada região foi testada com o teste rápido da urease (Coelho *et al.*, 1996). Outra foi usada para a avaliação de danos no DNA pelo Ensaio Cometa e outra biópsia foi utilizada para a detecção da *ureA* pela PCR.

A infecção pela *H. pylori* foi confirmada quando resultados foram positivos em pelo menos dois dos seguintes testes: teste rápido da urease, análise histopatológica, sorologia e amplificação por PCR do gene *ureA*.

As amostras de sangue (5 ml) foram coletadas de todos os pacientes para a sorologia.

Histopatologia

As biópsias do antro e corpo gástricos foram fixadas em formol a 10% por 24 horas, desidratadas em álcool e xilol e embebidas em parafina. Seções de 5µm de espessura foram obtidas para preparação das lâminas, as quais foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas em teste cego, sob microscópio óptico de luz, por dois patologistas. As gastrites foram classificadas de acordo com o sistema de Sydney como gastrite leve, moderada ou grave (Dixon *et al.*, 1996). A presença do *H. pylori* foi determinada por coloração com carbolfucsina.

Sorologia

A presença de anticorpos anti-*H. pylori* no soro dos pacientes foi determinada por imunocromatografia utilizando o kit *H. pylori – One Step Test* (INLAB-Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada como descrito por Fox *et al.* (1994). O DNA foi quantificado pela medida da densidade óptica a 260 nm (Genesys 5 – Spectronic Instruments).

Detecção do gene ureA

O DNA genômico foi amplificado conforme descrito por Clayton *et al.* (1992) utilizando o seguinte par de *primers* (Life Technologies): HPU1 (5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3') e HPU2 (5'-CTCCTTAATTGTTTTAC-3'). O DNA extraído das biópsias com resultados negativos nas outras três análises (teste rápido da uréase, histologia e sorologia) foi utilizado como controle negativo. Como controle positivo da reação de PCR, utilizou-se o DNA extraído das biópsias com resultados positivos nas outras três análises. As amostras foram testadas duas vezes.

Determinação das variantes alélicas do gene CYP1A1

O polimorfismo do gene *CYP1A1* estudado refere-se a uma substituição do nucleotídeo T para C na posição 3801 do gene (3801 T>C). Esta substituição cria um sítio restrição do tipo RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), detectado pela endonuclease de restrição *MspI*. Este polimorfismo do gene *CYP1A1* apresenta duas

variantes alélicas: ***1A** para a ausência do sítio polimórfico e ***2A** para a presença. Os três genótipos possíveis são denominados **CYP1A1*1A/CYP1A1*1A** para o homozigoto predominante (***1A/*1A**); **CYP1A1*2A/CYP1A1*2A** para um indivíduo homozigoto para o alelo raro (***2A/*2A**) que apresenta uma substituição de timina por citosina para formar o sítio de reconhecimento para a endonuclease *MspI* e o indivíduo de genótipo heterozigoto **CYP1A1*1A/CYP1A1*2A** (***1A/*2A**) (Brooks *et al.*, 1989).

Por meio da PCR amplificou-se um fragmento de 340 pb. Os iniciadores da reação foram os descritos por Gustafson *et al.* (1987): **CYP1A1 forward primer**: 5'- CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT - 3'; **CYP1A1 reverse primer**: 5'- TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT - 3'. Foram amplificados 2µl de DNA genômico numa reação de 25µl contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 25mM de MgCl₂, 10mM de dNTP's, 10 µM de cada *primer* (**CYP1A1 forward primer** e **CYP1A1 reverse primer**), 5U/µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen – Life Technologies). As reações foram processadas num termociclador GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems, de acordo com o seguinte programa: 95°C por 10 minutos; 95°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; 39 ciclos a 95°C; 72°C por 7 minutos seguidos de 4°C ∞.

Em seguida, avaliou-se a origem e especificidade do produto amplificado pela eletroforese em gel de agarose a 1% corada com brometo de etídeo, os fragmentos amplificados foram clivados com a enzima *MspI* a 37°C, por no mínimo 3 horas. Após a clivagem e eletroforese em gel de agarose a 2%, os genótipos foram caracterizados: selvagens o genótipo ***1A/*1A** para a ausência do sítio de restrição e uma banda de 340 pb; homozigotos recessivos o genótipo ***2A/*2A** para a presença do sítio de restrição e dois fragmentos, um de 200 pb e um de 140 pb e os indivíduos com o genótipo ***1A/*2A** também tinham o sítio de restrição e apresentaram 3 fragmentos, um de 340 pb, um de 200 pb e um de 140 pb; caracterizando-se como heterozigotos.

Ensaio Cometa

- Isolamento de Células Gástricas

O Ensaio Cometa requer a utilização de células isoladas. Devido a isso, as células gástricas foram isoladas conforme metodologia descrita por Pool-Zobel *et al.* (1994). Resumidamente, uma biópsia das regiões do antro e corpo gástrico foi fragmentada em uma solução contendo 5,5 mg de proteinase K, 3 mg de collagenase tipo I diluídas em 3 ml HBSS e incubada por 45 minutos a 37° C para liberar as células, que foram, então, ressuspensas em 10 ml de HBSS. A suspensão resultante foi centrifugada a 800 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Foram obtidas suspensões de $0,6 - 4 \times 10^6$ células por biópsia, dependendo da pinça de biópsia utilizada.

- Viabilidade Celular

O Ensaio Cometa requer a utilização de, no mínimo, 70% de células viáveis (Tice *et al.*, 2000). Diante disto, a viabilidade celular foi determinada usando-se uma solução de diacetato de fluoresceína (FDA)/brometo de etídio (EtBr), conforme descrito por Strauss (1991). Em suma, foi preparada uma solução contendo: 30 µl de FDA diluída em acetona (5 mg/ml) e 200 µl de EtBr diluído em 4,8 ml de PBS (200 µg/ml). A suspensão das células epiteliais gástricas (25 µl) foi misturada a 25 µl da solução corante, gotejada sobre uma lâmina, coberta com lamínula e analisada em microscópio de fluorescência. As células viáveis foram coradas em verde, enquanto células mortas foram coradas em vermelho. Foram analisadas 200 células por amostra.

- Quantificação de Leucócitos na Suspensão de Células Epiteliais

Para quantificação de leucócitos nas suspensões de células epiteliais obtidas das biópsias, foram gotejadas sobre uma lâmina alíquotas de 100 µl da suspensão, fixadas

com acetona e coradas com hematoxilina-eosina. Os leucócitos foram quantificados em teste cego.

- *Determinação de danos oxidativos no DNA pelo Ensaio Cometa*

O processo inflamatório com liberação de ROS e RNS induz danos no DNA, inclusive danos oxidativos, a maioria dos quais não são detectados pela versão alcalina padrão do Ensaio Cometa, a qual detecta somente quebras de fita simples, quebras de fita dupla e sítios lábeis alcalinos (quebras de fitas - QF). Em virtude disto, utilizamos a enzima formandipirimidina - DNA glicosilase (FPG) que reconhece purinas oxidadas e a enzima endonuclease III (Timina glicol-DNA glicosilase - EIII), que reconhece pirimidinas oxidadas (Collins *et al.*, 1998). O Ensaio Cometa, com a utilização dessas enzimas quantifica o nível de QF + sítios sensíveis a FPG (QF FPG) ou o nível de QF + sítios sensíveis a EIII (QF Endo III).

Assim, para determinação de danos no DNA foi utilizada a versão alcalina do Ensaio Cometa conforme descrita por Singh *et al.* (1988), com modificações introduzidas por Collins *et al.*, (1998) para detecção de danos oxidativos no DNA. Resumidamente, 10 µl da suspensão de linfócitos ou 15 µl da suspensão de células epiteliais da mucosa gástrica foram embebidos em agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (LMPA - Sigma) e difundidos sobre uma lâmina de microscópio recoberta com agarose normal a 1,5%. As lâminas foram imersas, por uma noite, em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% sal de sódio, N-lauril sarcosinato, pH 10, com 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO) a 4 °C. Após esse período, as lâminas foram lavadas três vezes, em intervalos de 15 minutos, com tampão de reação para as enzimas FPG e Endonuclease III (40 mM HEPES; 0,1 M KCL; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA e o pH 8 foi acertado com KOH). Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma câmara úmida e cobertas com 100 µl de Endonuclease III (1/1000) ou 100 µl de FPG

(1/1000) ou apenas com tampão de reação. As lâminas foram cobertas com lamínula e levadas à estufa a 37° C, por 45 minutos. Posteriormente, as células foram expostas a tampão alcalino (1mM EDTA e 300 mM NaOH, pH $\cong$ 13,4) a 4°C, por 40 minutos, para permitir a expressão das quebras de fita simples e dos sítios lábeis alcalinos (*alkali unwinding*). A eletroforese foi conduzida, na mesma solução a 4° C, por 30 minutos, a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) a intervalos de 5 minutos por 3 vezes, fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 50 μ l de EtBr (20 μ g/ml) e analisadas em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (Comet Assay II – Perceptive Instruments). Foram analisadas, em aumento de 400x, 100 células (50 células por lâmina) por tratamento de cada uma das regiões do estômago. O parâmetro utilizado para avaliação de danos no DNA foi a média do *tail intensity*. Este, segundo o fabricante (Perceptive Instruments), utiliza a média do momento da cauda (migração do DNA x intensidade da cauda) para a avaliação.

RESULTADOS

Os resultados demonstraram que dos 127 pacientes analisados, 103 estavam infectados pelo *H. pylori*. Destes, 14 apresentaram gastrite leve, 14 gastrite moderada, 12 gastrite grave e 63 câncer gástrico. Além destes, 24 pacientes apresentaram a mucosa normal não infectada pelo *H. pylori*. A análise de 10 amostras de pacientes com gastrite demonstrou que o conteúdo de leucócitos foi menor que 12% (média de 8,3%), o que não compromete a análise de danos no DNA das células epiteliais. Com relação à viabilidade das células obtidas das biópsias gástricas, observamos níveis que variaram de 79% a 96% com média de 89%.

Os níveis de danos no DNA nas células epiteliais gástricas de pacientes infectados pelo *H. pylori* com gastrite, de maneira geral, foram significativamente maiores, tanto no antro como no corpo gástricos, quando comparados aos pacientes não infectados pelo *H. pylori* com mucosa normal. Pacientes com gastrite moderada e severa apresentaram níveis maiores de danos no DNA que pacientes com mucosa normal e gastrite leve, tanto no antro quanto no corpo gástrico (Figura 1).

Nestes pacientes, o polimorfismo SNP *T3801C CYP1A1* estava distribuído em um total de 83 pacientes com o genótipo *CYP1A1*1A/1A*, 37 com o genótipo *CYP1A1*1A/2A* e apenas 7 com o genótipo *CYP1A1*2A/2A*. Somente os pacientes com gastrite severa não apresentaram o genótipo *CYP1A1*2A/2A*. As análises destes genótipos de acordo com o grau da gastrite e o câncer gástrico no antro e corpo demonstraram que este polimorfismo não influenciou nos níveis de danos no DNA das células gástricas (Figura 2).

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram a possível relação entre os níveis de danos no DNA e o grau de gastrite e câncer gástrico na região do antro e corpo gástricos de pacientes infectados pelo *H. pylori*. Observamos que os pacientes com gastrite leve, moderada, severa e câncer gástrico apresentaram maiores níveis de danos no DNA quando comparados com os pacientes com mucosa normal. Isto ocorre, em parte, como consequência da infecção pelo *H. pylori*, que provoca uma reação inflamatória no hospedeiro e consequente liberação de ROS como resposta à infecção (Ladeira *et al.*, 2004). As ROS podem induzir danos no DNA e aumentar a suscetibilidade do indivíduo ao câncer gástrico (Siomek *et al.*, 2006).

Neste estudo, analisamos também a influência do polimorfismo *T3801C CYP1A1* nos níveis de danos no DNA das células da mucosa gástrica desses pacientes, tanto na região do antro quanto na do corpo gástrico. Relatos na literatura reportaram que a expressão do *CYP1A1* encontra-se aumentada no câncer gástrico quando comparado às células epiteliais gástricas saudáveis, nas quais este não se expressa ou tem expressão reduzida (Murray *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). Os indivíduos com o SNP *T3801C CYP1A1* podem ser suscetíveis a diversos tipos de câncer, visto que este polimorfismo tem sido associado a maiores níveis de danos genotóxicos (Shen *et al.*, 2005). Estudos de meta-análise avaliaram a relação entre os polimorfismos genéticos e câncer de pulmão, e concluíram que variantes alélicas do *CYP1A1* poderiam alterar a suscetibilidade genética aumentando o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em parte da população chinesa (Shi *et al.*, 2008). Assim como Cha *et al.* (2007) estudando os polimorfismos do *CYP1A1* na população coreana observaram que indivíduos com o SNP *T3801C* têm maior risco de desenvolver o câncer de boca. Entretanto, Roth *et al.* (2004) analisaram a associação entre o SNP *T3801C* do gene *CYP1A1* e o risco de câncer gástrico na região da cárdia em indivíduos com elevado risco de desenvolver a doença na população asiática e verificaram que este alelo estaria associado a menor risco de desenvolvimento de câncer gástrico. Além disso, com relação ao câncer gástrico, vários estudos apresentaram resultados contraditórios, pois há trabalhos que mostram não haver evidências da correlação entre o polimorfismo *T3801C CYP1A1* e câncer gástrico (Suzuki, *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2004). Ma *et al.* (2006) constataram não haver essa relação na população chinesa por meio de análises do receptor de aril hidrocarboneto (AhR). Este receptor está frequentemente expresso em células de câncer gástrico e é associado ao *CYP1A1*. Essa correlação também foi verificada por Kobayashi *et al.* (2009) em um estudo caso-controle em

japoneses que também não encontraram nenhuma possível relação entre o *CYP1A1* e o risco de câncer colo-retal.

Esses trabalhos confirmam nossos resultados, pois verificamos que o SNP *T3801C CYP1A1* não influenciou os níveis de danos no DNA de células da mucosa gástrica de pacientes infectados pelo *H. pylori*.

A partir das análises realizadas, concluímos que *H. pylori* pode influenciar nos níveis de danos no DNA em células da mucosa gástrica, tanto do antro como no corpo gástrico de pacientes com qualquer nível de gastrite e câncer gástrico. Entretanto, nesses pacientes o SNP *T3801C CYP1A1* não influenciou os níveis de danos no DNA das células da mucosa gástrica.

REFERÊNCIAS

- Belitsky, G.A., Yakubovskaya, M.G. (2008) Genetic polymorphism and variability of chemical carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 543-554.
- Brooks, B., Johnson, B., Heinzmann, C., Mohandas, T., Sparkes, R., Jones, S., Bennett, P., Balacs, T., Moore, G., Conley, L., Hankinson, O. (1989) Localization of a gene required for the nuclear translocation of the dioxin receptor to human chromosome 1 and mouse chromosome 3 and human RFLP with *MspI*. *Am. J. Hum. Genet.*, **45**, 132.
- Cha, I.H., Park, J.Y., Chung W.Y., Choi, M.A., Kim, H.J., Park, K.K. (2007) Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* genes and susceptibility to oral cancer. *Yonsei Medical Journal*, **48**, 233-239.
- Clayton, C.L., Kleanthous, H., Coates, P.J., Morgan, D.D., Tabaqchali, S. (1992) Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.*, **30**, 192–200.
- Coelho, L.G.V., Barros, C.A.S., Lima, D.C.A., Barbosa, A.J.A., Magalhães, A.F.N., Queiroz, D.M.M., Cordeiro, F., Rezende, J.M., Castro, L.P., Tolentino, M.M., Haddad, M.T., Zaterka, S. (1996) National consensus on “*H pylori*”. *GED*, **15**, 53–58.
- Collins, A.R., Olmedilla, B., Southon, S., Granado, F., Duthie, S.J. (1998) Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **19(12)**, 2159-2162.
- Correa, P. (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multi-factorial process: first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res*, **52**, 6735- 6740.
- Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P. (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system. International workshop on the histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am. J. Surg. Pathol.*, **20**, 1161–1181.

Erichsen, H.C., Chanock, S.J. (2004) SNPs in cancer research and treatment. *Br. J. Cancer*, **90**, 747–751.

Fiocca, R., Luinetti, O., Villani, L., Chiaravalli, A.M., Capella, C., Solcia, E. (1994) Epithelial cytotoxicity, immune responses, and inflammatory components of *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand. J. Gastroenterol.*, **29**, 11–21.

Fox, J.G., Dewhirst, F.R., Fraser, G.J., Paster, B.J., Shames, B., Murphy, J.C. (1994) Intracellular Campylobacter-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel diseases is a *Desulfovibrio* sp. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1129–1237.

Gonzalez, A., Ramirez, V., Cuenca, P., Sierra, R. (2004) Polymorphisms in detoxification genes CYP1A1, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 in gastric cancer susceptibility. *Revista de Biologia Tropical*, **52**, 591-600.

Gustafson, S., Proper, J.A., Bowie, E.J., Sommer, S.S. (1987) Parameters affecting the yield of DNA from human blood. *Anal Biochem.*, **165**, 294-299.

Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letts*, **281**, 9-19.

IARC - International Agency for Research on Cancer (1994) Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol 61: *Schistosomotes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC, Lyon, France.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (2009). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso no dia 04/04/2009.

Ito, M., Takata, S., Tatsugami, M., Wada, Y., Imagawa, S., Matsumoto, Y., Takamura, A., Kitamura, S., Matsuo, T., Tanaka, S., Haruma, K., Chayama, K. (2009) Clinical prevention of gastric cancer by *Helicobacter pylori* eradication therapy: a systematic review. *J. Gastroenterol.*, **44**, 365-371.

Kamangar, F., Dores, G.M., Anderson, W.F. (2006) Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J. Clin. Oncol.*, **24**, 2137–2150.

Kim, H.Y., Kyong, T.Y., Kim, J.H., Kim, Y.B., Park, C.K., Yoo, J.Y., Kim, H.Y. (1998) Salt consumption as a risk factor of gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, **114**, A623.

Kobayashi, M., Otani, T., Iwasaki, M., Natsukawa, S., Shaura, K., Koizumi, Y., Kasuga, Y., Sakamoto, H., Yoshida, T., Tsugane, S. (2009) Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of *NAT2*, *CYP1A1*, and *CYP1A2* and risk of colorectal cancer: A hospital-based case-control study in Japan. *Scand. J. Gastroenterol.*, **44**, 952-959.

Ladeira, M.S.P., Rodrigues, M.A.M., Salvadori, D.M.F., Queiroz, D.M.M., Freire-Maia, D.V. (2004) DNA Damage in Patients Infected by *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **13** (4), 631-637.

Lauren, P. (1965) 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.*, **64**, 31–49.

Lauren, P. (1991) Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol*, **26** (180), 160-164.

Leung, W.K., Wu, K.C., Wong, C.Y.P., Cheng, A.S.L., Ching, A.K.K., Chan, A.W.H., Chong, W.S., Go, M.Y.Y., Yu, J., To, K.F., Wang, X., Chui, Y.L., Fan, D.M., Sung, J.J.Y. (2008) Transgenic cyclooxygenase-2 expression and high salt enhanced susceptibility to chemical-induced gastric cancer development in mice. *Carcinogenesis*, **29**, 1648–1654.

Ma, J.X., Zhang, K.L., Liu, X., Ma, Y.L., Pei, L.N., Zhu, Y.F., Zhou, L., Chen, X.Y., Kong, Q.Y., Li, H., Liu, J. (2006) Concurrent expression of aryl hydrocarbon receptor and *CYP1A1* but not *CYP1A1* *MspI* polymorphism is correlated with gastric cancers raised in Dalian, China. *Cancer Letters*, **240**, 253–260.

Matysiak-Budnick, T., Mégraud, F. (2006) *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Eur J Cancer*, **42**, 708-716.

McClain, M.S., Shaffer, C.L., Israel, D.A., Peek, R.M., Jr., Cover, T.L. (2009) Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics*, **10**, 3.

Menaker, R.J., Sharaf, A.A., Jones, N.L. (2004) *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: host, bug, environment, or all three? *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **6**, 429 - 435.

Murray, G.I., Taylor, M.C., Burke, M.D., Melvin, W.T. (1998) Enhanced expression of cytochrome *P450* in stomach cancer. *Br. J. Cancer*, **77**, 1040-1044.

NCBI – National Center for Biotechnology Information (2009). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> Acesso no dia: 8/10/2009.

Nebert, D.W. (1991) Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat. Res.*, **247**, 267–281.

Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **325**, 1127-1131.

Pavanello, S. (2003) Metabolic and DNA repair variations in susceptibility to genotoxins. *Polycyclic Aromatic Compounds*, **23**, 49–107.

Pool-Zobel, B.L., Lotzmann, N., Knoll, M., Kuchenmeister, F., Lambertz, R., Leucht, U., Schröder, H.G., Schmezer, P. (1994) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ. Mol. Mutagen.*, **24**, 23 – 45.

Roth, M.J., Abnet, C.C., Johnson, L.L., Mark, S.D., Dong, Z.W., Taylor, P.R., Dawsey, S.M., Qiao, Y.L. (2004) Polymorphic variation of CYP1A1 is associated with the risk of gastric cardia cancer: a prospective case-cohort study of cytochrome *P-450 1A1* and GST enzymes. *Cancer Causes and Control*, **15**, 1077–1083.

Shen, J., Gammon, M.D., Terry, M.B., Wang, L., Wang, Q., Zhang, F., Teitelbaum, S.L., Eng, M., Sagiv, S.K., Gaudet, M.M., Neugut, A.I., Santella, R.M. (2005) Polymorphisms in *XRCC1* modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon – DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **14**, 336–342.

Shi, X., Zhou, S., Wang, Z., Zhou, Z., Wang, Z. (2008) *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphisms and lung cancer risk in Chinese populations: a meta-analysis. *Lung Cancer*, **59(2)**, 155–163.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184 – 191.

Siomek, A., Rytarowska, A., Szaflarska-Popplawska, A., Gackowski, D., Rozalski, R., Dziaman, T., Czerwionka-Szaflarska, M., Olinski, R. (2006) *Helicobacter pylori* infection is associated with oxidatively DNA in human leukocytes and decreased level of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine. *Carcinogenesis*, **27**, 405–408.

Sipponen, P., Hyvärinen, H., Seppälä, K., Blaser, M.J. (1998) Review article: pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **12**, 61–71.

Smith, T.R., Miller, M.S., Lohman, K.K., Case, L.D., Hu, J.J. (2003) DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, **24**, 883–889.

Stolte, M., Eidt, S., Ohnsmann, A. (1990) Differences in *Helicobacter pylori* associated gastritis in antrum and body of the stomach. *Z. Gastroenterol.*, **28**, 229–233.

Strauss, G.H.S. (1991) Non-random cell killing in cryopreservation: implications for the performance of the battery of leukocyte tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.*, **252**, 1-15.

Suzuki, S., Muroishi, Y., Nakanishi, I., Oda, Y. (2004) Relationship between genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes (*CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, and *NAT2*), drinking habits, histological subtypes, and *p53* gene point mutations in Japanese patients with gastric cancer. *J. Gastroenterol*, **39**, 220–230.

The, B.T., Larsson, C., Nordenskjöld, M. (1999) Tumor suppressor genes (TSG). *Anticancer Res.*, **19**, 4715 – 4728.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 206 – 221.

Weck, M.N., Gao, L., Brenner, H. (2009) *Helicobacter pylori* infection and chronic atrophic gastritis associations according to severity of disease. *Epidemiology*, **20**, 569-574.

Wu, M.S., Huang, S.P., Chang, Y.T., Lin, M.T., Shun C.T., Chang, M.C., Wang, H.P., Chen, C.J., Lin, J.T. (2002). Association of the –160 C > A promoter polymorphism of *E-Cadherin* gene with gastric carcinoma risk. *Cancer*, **94**, 1443–1448.

Wyatt, J.I. (1991) Gastritis and its relation to gastric carcinogenesis. *Semin. Diagn. Pathol.*, **8**, 137–148.

Yang, C.X., Matsuo, K., Wang, Z.M., Tajima, K. (2005) Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: a meta-analysis of the literature. *World J. Gastroenterol.*, **11** (17), 2531–2538.

Zhang, K.L., Ma, J.X., Chen, X.Y., Sun, Y., Kong, Q.Y., Liu, J., Li, H. (2004) Frequent *CYP1A1* expression in gastric cancers and their related lesions. *Oncol. Rep.*, **12**, 1335 – 1340.

Zhuo, W.L., Wang, Y., Zhuo, X.L., Zhu, B., Zhu, Y., Chen, Z.T. (2009) Polymorphisms of *CYP1A1* and *GSTM1* and laryngeal cancer risk: evidence-based meta-analyses. *J Cancer Res. Clin. Oncol.*, **135**, 1081–1090.

FIGURAS

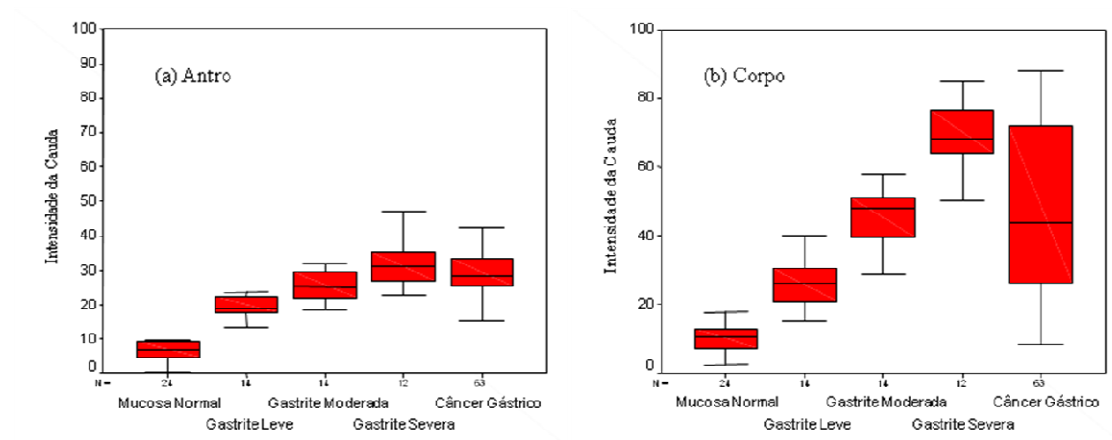


Fig. 1 Relação entre os níveis de danos no DNA (intensidade da cauda) e o grau de gastrite no antro e no corpo gástrico e câncer gástrico. Os pacientes com mucosa normal apresentaram menores níveis de danos no DNA que pacientes com gastrite leve, moderada, severa e câncer gástrico.

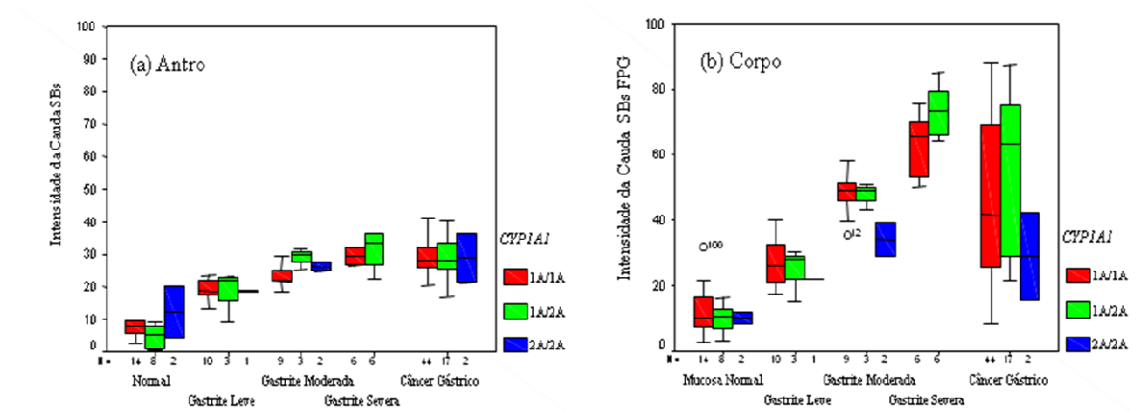


Fig. 2 Associação entre os níveis de danos no DNA (intensidade da cauda) e o polimorfismo *T3801C CYP1A1* acordo com o e o grau de gastrite no antro e no corpo gástrico e câncer gástrico. O polimorfismo *T3801C CYP1A1* não influenciou os níveis de danos no DNA em nenhum dos grupos.