



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

Ayla Blanco Poltronieri de Oliveira

Efeito da infecção e da terapia de erradicação da *Helicobacter pylori* na  
expressão gênica de paciente com gastrite crônica

São José do Rio Preto  
2016

Ayla Blanco Poltronieri de Oliveira

Efeito da infecção e da terapia de erradicação da *Helicobacter pylori* na expressão gênica de paciente com gastrite crônica

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Elizabete Silva

São José do Rio Preto  
2016

Poltronieri-Oliveira, Ayla Blanco.

Efeito da infecção e da terapia de erradicação da *Helicobacter pylori* na expressão gênica de paciente com gastrite crônica / Ayla Blanco Poltronieri de Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2016  
67 f. : il., 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. Antioncogenes. 6. Estômago – Tumores. I. Oliveira, Ayla Blanco Poltronieri de. II. Silva, Ana Elizabete.  
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616-006.6

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

Ayla Blanco Poltronieri de Oliveira

Efeito da infecção e da terapia de erradicação da *Helicobacter pylori* na expressão gênica de paciente com gastrite crônica

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<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Elizabete Silva

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Dr<sup>a</sup> Patrícia Matos Biselli Chicote

FAMERP – São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília de Freitas Calmon Saiki

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
04 de março de 2016

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

*Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra e Rene, e ao meu marido Bruno. O amor que nos une é infinito e o apoio que compartilhamos é fundamental. Dividir a minha vida com vocês é um privilégio. Muito obrigada por estarem ao meu lado me mostrando que a vida será sempre uma viagem desafiadora, na qual o que realmente importa é a companhia, é se fazer presente na vida de quem amamos. Amo muito vocês!!!*

## **Agradecimentos**

*Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas oportunidades concedidas que me fortalecem e me ensinam a ter humildade e perseverança.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pelo acolhimento, conhecimentos compartilhados e oportunidade de crescer em minha vida acadêmica. Sua dedicação e paciência permitiram que eu realizasse mais esta importante etapa da minha vida acadêmica, desenvolvendo o pensamento crítico e a visão científica. Muito obrigada!*

*À banca examinadora Dra. Patrícia Matos Biselli Chicote e Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon Saiki, por aceitarem participar desta banca, contribuindo grandemente em minha formação. Muito obrigada!*

*À Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira por fornecer gentilmente um dos reagentes necessários para os experimentos. Muito obrigada!*

*As minhas queridíssimas amigas do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana Ana Flávia, Fernanda, Joice, Marcela e Nathália pela convivência agradável, risadas e apoio de toda natureza que permitiram o desenvolvimento deste projeto com leveza, otimismo e entusiasmo. Sem vocês os desafios da pesquisa seriam muito mais difíceis de resolver. Sentirei saudades, adoro vocês! Muito obrigada!*

*À Dra. Joice Matos Biselli Périco e à Me. Ana Flávia Teixeira Rossi pelo brilhantismo profissional e generosidade intelectual. O empenho e ajuda de vocês são muito importantes para todos nós. Muito obrigada!*

*Aos meus queridos amigos professores da Escola Municipal Profa. Regina Mallouk que me acompanharam nessa caminhada com muita alegria. Obrigada pelo apoio e incentivo constantes!*

*À instituição IBILCE/UNESP pelo espaço físico e todo apoio que proporciona o desenvolvimento de nossas pesquisas.*

*Aos profissionais de saúde do Hospital de Base de São José do Rio Preto e Hospital João Paulo II pela ajuda inestimável e aos pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa. Sem vocês a pesquisa não aconteceria. Muito obrigada!*

*As agências de fomento CNPq e FAPESP, pelo apoio a pesquisa.*

*Aos meus pais, Sandra e Rene, pela renúncia e amor incondicionais que resultaram no momento que vivo hoje. A minha vitória é apenas um reflexo da grande luta de vocês no dia-a-dia para vencer as barreiras que a vida nos impõe para que possamos crescer. Agradeço a Deus por ter colocado vocês como meus pais. Obrigada por me incentivarem e acreditarem no meu sucesso! Amo muito vocês!!!*

*Ao meu marido, Bruno, pelo apoio indispensável. Sem você a caminhada seria muito mais difícil, seu apoio torna tudo mais leve e agradável. Você é um exemplo para mim, alvo de admiração. Obrigada pela paciência inacreditável, por descomplicar aquilo que penso ser insolúvel e por me fazer feliz. Amo você!*

*À minha família pelas risadas, apoio, carinho e incentivo constantes. Vocês me ensinaram como é importante construir uma vida individual, mas que é sempre bom ter para quem retornar. Quando nos reunimos é sempre uma festa. Amo vocês!*

*À minha segunda família, Ivani, Pedro, Raissa, Danilo, Carol e meu doce sobrinho Gabriel, que sempre me apoiaram oferecendo uma amizade e carinho sem precedentes. Esse momento também é de vocês. Muito obrigada! Amo vocês!*

*As minhas queridíssimas amigas/irmãs Ana Beatriz, Ana Flávia e Lara. Não tenho palavras para descrever quão fundamentais são para mim. Desde nossos primeiros momentos na faculdade nos identificamos e percebemos que nunca mais estaríamos sozinhas. Obrigada por sempre me apoiarem! Amo vocês!*

*As minhas companheiras de apê Lu, Larissa, Mayra e Érica pelas risadas, conversas e conselhos que me ajudaram a ser mais paciente e acreditar no melhor. Saudades!*

*Aos meus amigos de fora da Universidade que sempre me apoiaram e acreditaram na minha vitória, especialmente Gy e Biel. Adoro vocês!*

*A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para esse momento.*

*“Seja a mudança que você  
quer ver no mundo”.*

*Dalai Lama*

## RESUMO

**Introdução:** A inflamação crônica desencadeada pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), a qual é considerada o principal fator ambiental relacionado ao câncer gástrico, está associada ao desenvolvimento e progressão de lesões gástricas pré-cancerosas, desencadeando diversas modificações histológicas e moleculares que promovem a transformação maligna do estômago. Para isso, conta com fatores de virulência que promovem alterações superficiais e em vias de sinalização das células epiteliais gástricas. Consequentemente pode levar a alterações no padrão de expressão de genes supressores tumorais e da atividade de enzimas DNA metil transferases (DNMTs), responsáveis pela metilação do DNA e silenciamento gênico. **Objetivos:** O presente estudo avaliou se a infecção pela bactéria *H. pylori*, bem como sua erradicação, altera a expressão do RNAm dos genes supressores *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3* e dos genes de DNMTs (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) em pacientes com gastrite crônica infectados (Hp+) em comparação com indivíduos com gastrite crônica sem infecção (Hp-). Além disso, investigou a ocorrência de correlação negativa entre a expressão do RNAm dos genes supressores tumorais com a dos genes das DNMTs, assim como a associação dos níveis de expressão gênica em relação aos fatores de risco idade, sexo, tabagismo, etilismo e genótipo bacteriano *cagA*. **Material e Métodos:** A quantificação relativa (RQ) do RNAm foi realizada por PCR (*polymerase chain reaction*) quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando ensaios TaqMan® em 9 pacientes com gastrite crônica Hp- e 19 Hp+, sendo estes também avaliados três meses depois da terapia de erradicação bacteriana. O diagnóstico molecular e genotipagem do fator de virulência *cagA* foram realizados por PCR convencional. **Resultados:** Os resultados mostraram que a infecção pela *H. pylori* e sua erradicação não alteraram significativamente a expressão dos genes *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3* e DNMTs, as quais apresentaram, de modo geral, expressão reduzida (RQ < 1,0), enquanto foi observado expressão mais elevada de *SOCS1* e *RPRM* no grupo sem infecção Hp-. Quanto aos fatores de risco, também não foram encontradas associações significantes com os níveis de expressão dos genes avaliados. A análise de correlação não mostrou correlação negativa da expressão gênica entre os supressores tumorais e as DNMTs, mas evidenciou algumas correlações positivas entre a expressão dos genes *SOCS1* e *DNMT1* e do *RPRM* com *DNMT3A* e *DNMT3B* no grupo Hp+, que podem ter sido casuais. **Conclusão:** Nossos resultados não indicam que a infecção causada pela bactéria *H. pylori* e sua erradicação em pacientes com gastrite crônica afetam a expressão dos supressores tumorais *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3* e das DNMTs, assim como que seja influenciada pelos fatores idade, sexo, tabagismo, etilismo e genótipo bacteriano *cagA*. Além disso, a expressão reduzida das DNMTs e ausência de correlação negativa com a dos genes supressores tumorais não permite indicar que a baixa expressão dos genes supressores tumorais seja devido a hipermetilação do DNA em consequência da infecção.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*. Gastrite Crônica. Terapia de erradicação. Expressão Gênica. Genes supressores tumorais. DNA metiltransferases.

**ABSTRACT**

**Introduction:** Chronic inflammation caused by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), which is considered the main environmental factor related to gastric cancer, is associated with the development and progression of precancerous gastric lesions, triggering several histological and molecular changes that promote stomach malignant transformation. For this, it has virulence factors promoting superficial and signaling pathways of gastric epithelial cells changes. Consequently, it can lead to alterations in the expression of tumor suppressor genes and DNA enzyme activity methyl transferases (DNMTs), responsible for DNA methylation and gene silencing. **Objectives:** This study evaluated whether the infection by the bacterium *H. pylori* and its eradication change the mRNA expression of suppressor genes *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3* and DNMTs (*DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B*) genes in patients with chronic gastritis infected (Hp+) compared to individuals with chronic gastritis without infection (Hp-). In addition, we investigated the occurrence of negative correlation between mRNA expression of tumor suppressor genes with the ones of DNMTs, as well as the association of gene expression levels in relation to the risk factors age, sex, smoking, drinking and bacterial genotype *cagA*. **Methods:** The relative quantification (RQ) mRNA was performed by PCR (polymerase chain reaction) quantitative real-time (qPCR) using TaqMan® assays in 9 patients with chronic gastritis Hp- and 19 Hp+, which are also evaluated three months after bacterial eradication therapy. The molecular diagnostics and genotyping of the virulence factors CagA were performed by standard PCR. **Results:** The results showed that the infection by *H. pylori* and eradication did not significantly alter the gene expression of *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3* and DNMTs, which presented, in general, reduced expression (RQ <1.0); on the other hand, higher expression of *SOCS1* and *RPRM* was observed in the group without Hp- infection. As for risk factors, no significant associations with the expression levels of evaluated genes were found. The correlation analysis not showed a negative correlation of gene expression in the tumor suppressor and DNMTs, but showed some positive correlations between the expression of *SOCS1* and *DNMT1* genes and *RPRM* with *DNMT3A* and *DNMT3B* the Hp + group, which may have been casual. **Conclusion:** Our findings do not indicate that the infection caused by the bacterium *Helicobacter pylori* and its eradication in patients with chronic gastritis affect the expression of tumor suppressor *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3* and DNMTs, as it is influenced by factors such as age, sex, smoking, alcoholism and bacterial genotype *cagA*. Furthermore, the reduced expression of DNMTs and no negative correlation with the tumor suppressor genes do not indicate that the low expression of tumor suppressor genes is due to DNA hypermethylation in consequence of infection.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*. Chronic gastritis. Eradication therapy. Gene expression. Tumor suppressor genes. DNA methyltransferases.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-AzaC	do inglês, <i>5-azacytidine</i>
<i>ACTB</i>	do inglês <i>actin beta</i>
BabA	do inglês <i>blood group antigen-binding adhesion</i>
Pb	pares de base
cDNA	DNA complementar
<i>cagA</i>	do inglês <i>cytotoxin-associated gene</i>
CagA	Citotoxina A
<i>cagPAI</i>	do inglês <i>cag Pathogenicity Island</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
<i>CYP1A1</i>	do inglês <i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	do inglês <i>desoxirribonucleic acid</i>
DNMT	DNA metil transferases
DNMT1	DNA metil transferase 1
<i>DNMT1</i>	do inglês <i>DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1</i>
DNMT3A	DNA metil transferase 3A
<i>DNMT3A</i>	do inglês <i>DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha</i>
DNMT3B	DNA metil transferase 3B
<i>DNMT3B</i>	do inglês <i>DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Beta</i>
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
et al	e outros, do latim <i>et alii</i>
G2	do inglês <i>Gap 2</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hp+	<i>H. pylori</i> positivo
Hp-	<i>H. pylori</i> negativo
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Câncer</i> )
IBP	Inibidor de Bomba de Prótons
<i>IL6</i>	do inglês <i>interleukin 6</i>
JAK/STAT	do inglês <i>Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MALT	do inglês <i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>
miRNAs	microRNAs
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MGMT	do inglês <i>O6-methylguanine-DNA methyl-transferase</i>
mM	Milimolar
MMP9	metaloproteinase de matriz 9
MyD88	do inglês <i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</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 <sup>-9</sup> grama)
P	Probabilidade
p53	Proteína 53
p53	do inglês <i>tumor protein p53</i>
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
R	Coefficiente de Correlação
RPRM	Reprimo
RPRM	do inglês <i>TP53 Dependent G2 Arrest Mediator Candidate</i>
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNAm	RNA mensageiro
rRNA	do inglês <i>ribosomal RNA</i>
RQ	do inglês <i>relative quantification</i>
RT	do inglês <i>Reverse transcriptase</i>
RUNX3	Fator de transcrição 3 relacionada ao runt
RUNX3	do inglês <i>runt-related transcription factor 3</i>
Snai1	do inglês <i>Snail Family Zinc Finger 1</i>
STAT3	do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SOCS1	Supressor da sinalização de citocinas
SOCS1	do inglês <i>Suppressor Of Cytokine Signaling 1</i>

<i>SOCS2</i>	do inglês <i>Suppressor Of Cytokine Signaling 2</i>
<i>SOCS3</i>	do inglês <i>Suppressor Of Cytokine Signaling 3</i>
<i>T4SS</i>	do inglês <i>type- IV secretion system</i>
<i>Taq</i>	do inglês <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
<i>TIMP1</i>	do inglês <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
<i>TLR4</i>	do inglês <i>Toll-like receptor 4</i>
<i>TNFA</i>	do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
<i>tsaA</i>	do inglês <i>alkyl hydroperoxide reductase subunit C</i>
U	Unidade
<i>UBC</i>	do inglês <i>Ubiquitin C</i>
<i>ureA</i>	do inglês <i>urease subunit alpha</i>
<i>vacA</i>	do inglês <i>vacuolating cytotoxin</i>
VacA	Citotoxina vacuolizante
<i>VEGF</i>	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
Δ	Delta
®	marca registrada
°C	graus Celsius (medida de temperatura)
μL	microlitro (unidade de volume: 10 <sup>-6</sup> litro)
μM	Micromolar

## Sumário

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
I.1 <i>Helicobacter pylori</i> : inflamação crônica e lesões gástricas .....	14
I.2 Infecção pela <i>Helicobacter pylori</i> e alterações na expressão gênica .....	19
<b>II- OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>III- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
III.1. Casuística .....	25
III-2. Estudo Molecular .....	27
III-2.1 Extração de ácidos nucleicos .....	27
III-2.2 Diagnóstico molecular da <i>H. pylori</i> e genotipagem do gene <i>cagA</i> .....	27
III-2.3 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....	30
III-3. Análise estatística .....	31
<b>IV- RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
IV-1. Diagnóstico molecular para <i>H. pylori</i> e genotipagem do gene <i>cagA</i> .....	32
IV-2. Expressão gênica relativa dos genes <i>SOCS-1</i> , <i>RPRM</i> , <i>RUNX3</i> , <i>DNMT1</i> <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> .....	32
IV-3. Análise de correlação entre a expressão do RNAm das DNMTs e dos supressores tumorais <i>SOCS1</i> , <i>RPRM</i> e <i>RUNX3</i> .....	38
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b> .....	<b>47</b>
<b>V. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>
<b>VI. ANEXOS</b> .....	<b>59</b>
Anexo 1: Parecer substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional .....	59
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96) .....	62

## I. INTRODUÇÃO

### I.1 *Helicobacter pylori*: inflamação crônica e lesões gástricas

A interação de patógenos com células específicas do hospedeiro pode causar inflamação crônica e estabelecer doenças infecciosas ou, em alguns casos, pode ser silenciosa em decorrência de adaptações ao hospedeiro, como fatores especializados para escapar de seus mecanismos de defesa (POSSELT; BACKERT; WESSLER, 2013). Estima-se que de 10 a 15% das neoplasias estão relacionados à inflamação crônica desencadeada por bactérias, vírus e outros patógenos (WANG et al., 2013). Uma importante e bem estabelecida relação entre patógeno, inflamação crônica e ocorrência de lesões teciduais é observada entre a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e a cascata de progressão tumoral do estômago. No tecido gástrico, o epitélio é a primeira barreira efetiva contra patógenos e possui uma camada de muco que o protege contra a ação de enzimas e do ácido gástrico, mantendo sua função e integridade (WROBLEWSKI; PEEK, 2011, CADAMURO et al., 2014). Ainda assim, a *H. pylori* possui inúmeras estratégias para colonizar o estômago humano (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004), como os fatores de virulência capazes de atuar na membrana ou serem translocados para o citoplasma das células hospedeiras, atuando diretamente em suas funções (POSSELT; BACKERT; WESSLER, 2013).

A resposta inflamatória é um processo complexo que envolve diversos mediadores pró e anti-inflamatórios responsáveis por iniciar e, posteriormente, levar à resolução apropriada da inflamação (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Entretanto, a infecção persistente pela *H. pylori* estabelece um ambiente inflamado no qual pode ocorrer o desenvolvimento de lesões teciduais (HAN; ULEVITCH, 2005) em decorrência do estímulo prolongado para a liberação de citocinas pelas células epiteliais gástricas e imunes, causando remodelação dos componentes da matriz extracelular (PARDO; SELMAN, 2005), dano ao DNA por espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (FUENTES-PANANÁ; CAMORLINGA-PONCE; MALDONADO-BERNAL, 2009), recrutamento de células imunes e promoção da angiogênese (CHIBA et al., 2012), favorecendo a transformação celular maligna e a propagação de doenças invasivas (FERRONE; DRANOFF, 2010; BALKWILL; MANTOVANI, 2012).

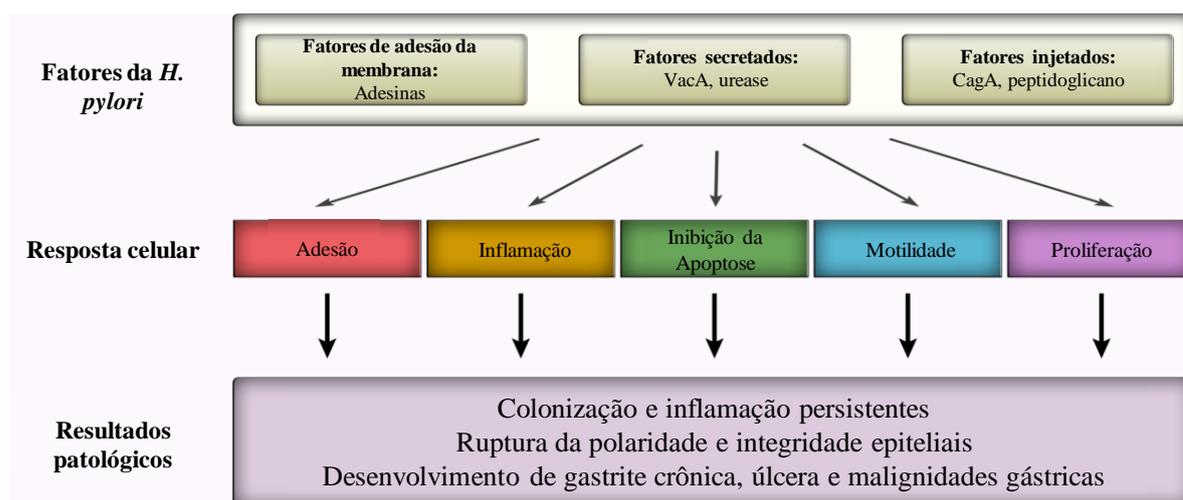
A etiologia multifatorial das doenças gástricas há muito tempo vem sendo investigada, mas somente na década de 1980 foi elucidado o fato de que a *H. pylori*, e não o estresse é o principal fator associado ao desenvolvimento da gastrite (PARSONNET; FRIEDMAN; VANDERSTEEN, 1991). Esta descoberta revolucionou o gerenciamento e o desenvolvimento

de terapias para doenças gástricas, fornecendo uma inestimável contribuição para o entendimento da patogênese e consequências da infecção e inflamação crônica nos pacientes (KUSTERS, 2006). Além disso, por ser um fator de risco ao desenvolvimento do câncer gástrico, foi considerada um carcinógeno do tipo I pela Agência Internacional para a Investigação do Câncer (IARC, 1994).

A *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa que infecta mais da metade da população mundial (BANATVALA et al., 1993), sendo adquirida geralmente no início da vida pelas vias fecal-oral ou gástrico-oral, particularmente nos países em desenvolvimento devido a sua relação ao nível socioeconômico (FIEDOREK et al., 1991; SITAS, YARNELL, FORMAN, 1992) e condições precárias de sanitização e higiene (PERRY et al., 2006).

Em termos evolutivos, o tempo de interação deste patógeno com os seres humanos é estimado em 100.000 anos, e a diversidade de cepas bacterianas e sua distribuição acompanha a dos homens anatomicamente modernos (LINZ; BALLOUX; MOODLEU, 2007). Este tempo de convivência resulta em questões intrigantes, como o fato da *H. pylori* ser beneficiada pela inflamação desencadeada pela infecção (TAN; TIMPKINS; AMIEVA, 2009). A maior parte da população bacteriana presente no estômago coloniza a camada de muco, onde recebe nutrientes essenciais provenientes das células danificadas em resposta à infecção (TAN; TIMPKINS; AMIEVA, 2009). Comparada à outras bactérias Gram-negativas, seu lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular é considerado pouco endotóxico e imunogênico (MUOTIALA et al., 1998), sendo proposto que a manipulação da resposta imune do hospedeiro não é um evento decisivo para o seu estabelecimento, mas sim para sua permanência (BAMFORD et al., 1998).

A habilidade da *H. pylori* em manipular a célula hospedeira ocorre por interferências nos processos celulares e desregulação de vias de sinalização, resultando em aderência, resposta pró-inflamatória, inibição da apoptose, proliferação e liberação de citocinas e quimiocinas (POSSELT; BACKERT; WESSLER, 2013) (Figura 1). Dos fatores bacterianos de risco envolvidos nesses processos estão as proteínas bacterianas CagA e VacA (AMIEVA; EL-OMAR, 2008), e a adesina BabA (ILVER et al., 1998) (Figura 2). Cepas triplo positivas (VacA<sup>+</sup>, CagA<sup>+</sup>, BabA<sup>+</sup>) exibem maiores densidades de colonização e intensa resposta inflamatória no tecido gástrico (RAD et al., 2002). Além dos fatores de virulência, a *H. pylori* também sintetiza a enzima urease, que hidrolisa a ureia em amônia e dióxido de carbono, neutralizando o pH e permitindo a colonização do ambiente inóspito do estômago (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003).



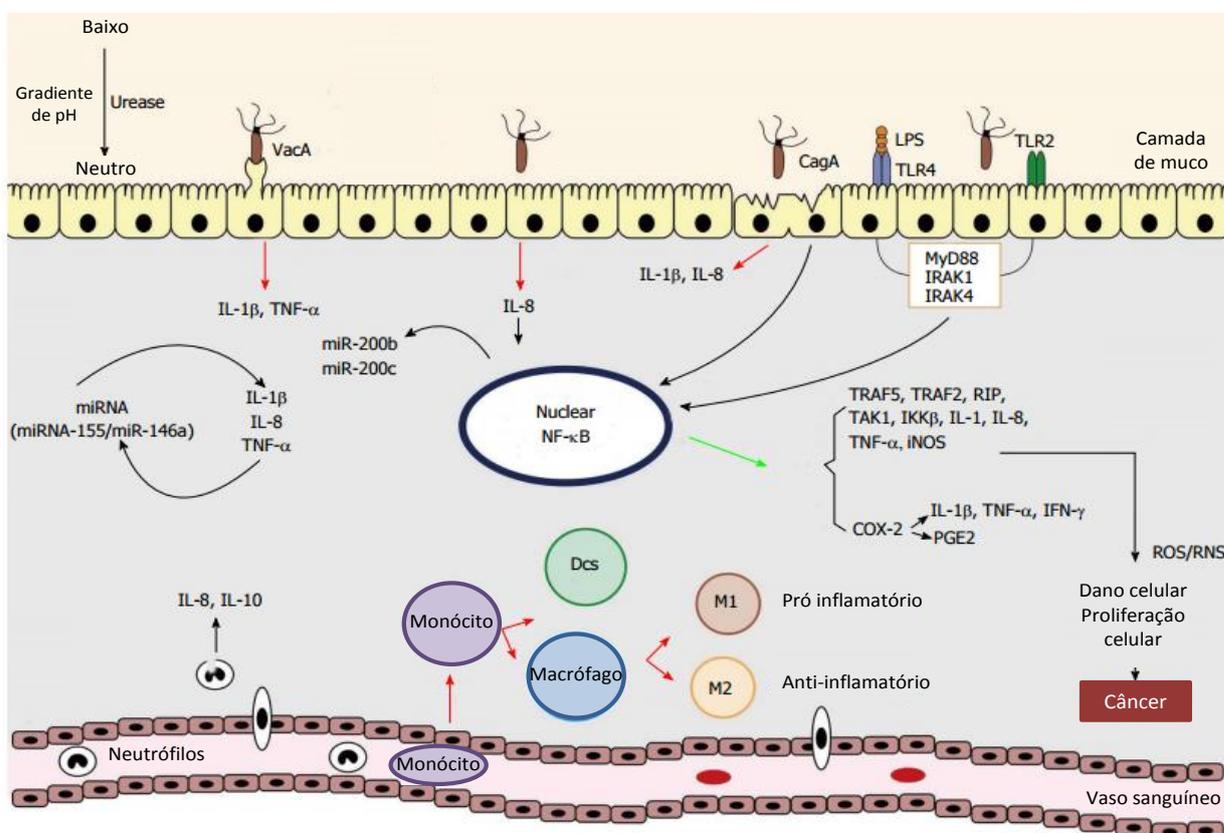
**Figura 1. Resposta celular a colonização da *H. pylori* no epitélio gástrico.** A bactéria expressa fatores de adesão de membrana e libera fatores que podem ser injetados na célula hospedeira, como o CagA via sistema de secreção tipo 4 (T4SS). Estes fatores atuam nas células epiteliais gástricas promovendo diversas respostas celulares, que podem resultar em infecção persistente, inflamação e progressão da cascata tumoral. Adaptado de Posselt, Backert e Wealler (2013).

O fator de virulência BabA promove a adesão da *H. pylori* às células epiteliais gástricas, permitindo a translocação de CagA via sistema de secreção tipo IV (T4SS) (MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004). O gene *cagA* (*cytotoxin-associated gene*) é o responsável pela produção do fator de virulência CagA, e está localizado em um segmento de DNA denominado ilha de patogenicidade *cag* (*cag* PAI), onde também estão os genes que originam os componentes do T4SS (HATAKEYAMA, 2009; BAUER; MEYER, 2011). Uma vez injetados via T4SS, CagA e lipoproteínas alteram e/ou desencadeiam vias de sinalização dentro da célula hospedeira, alterando sua morfologia e polaridade (BACKERT; CLYNE; TEGTMEYER, 2011; WESSLER, GIMONA, RIEDER, 2011), induzindo também a inflamação e a ativação de proto-oncogenes (BASSO et al., 2008; ISHIJIMA et al., 2011).

O gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin*) codifica o fator de virulência VacA, o qual provoca as respostas celulares de vacuolização e apoptose para inibir as funções das células T durante a resposta inflamatória (COVER, BLANKE, 2005; RASSOW, 2011). Por sua vez, a proteína VacA é considerada heterogênea e pode apresentar diferentes atividades na infecção pela *H. pylori* (POSSELT, BACKERT, WESSLER, 2013) devido a diversidade de genótipos bacterianos em decorrência de polimorfismos nos alelos *s* (*s1* ou *s2*) e *m* (*m1* ou *m2*) presentes na sequência do gene (ATHERTON et al., 1995; RHEAD et al., 2007).

Em conjunto, essas alterações são responsáveis pela colonização persistente da bactéria ao longo da vida do hospedeiro, causando diversas doenças gastrointestinais como a

gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, úlcera péptica, linfoma MALT (tecido linfoide associado a mucosa) e o adenocarcinoma gástrico (WEN; MOSS, 2009) (Figura 2). A gastrite crônica consiste em uma inflamação crônica da mucosa gástrica, cuja etiologia predominante é a infecção pela *H. pylori* (BODGER; CRABTREE, 1998). Nesta lesão, se observa aumento no infiltrado inflamatório, como linfócitos na lâmina própria, e a presença de leucócitos polimorfonucleados indicam inflamação ativa (BODGER; CRABTREE, 1998). Na gastrite atrófica ocorre a perda ou encolhimento de glândulas com morfologia e função apropriadas associado a expansão fibrótica da lâmina circundante, resultando em diminuição da massa glandular, sem modificações no epitélio inicial (RUGGE et al., 2008). Por outro lado, na metaplasia as glândulas nativas geralmente são substituídas por um componente celular intestinal, não necessariamente ocorrendo redução no número de glândulas (RUGGE et al., 2008).



**Figura 2. Efeito dos fatores de virulência bacterianos na célula hospedeira.** A maior parte da população de *H. pylori* se estabelece na camada de muco do estômago, onde são secretados diversos fatores que atuam favorecendo a infecção e a persistência da bactéria. A enzima urease promove a neutralidade do microambiente circundante, enquanto CagA e VacA alteram diretamente as funções da célula epitelial gástrica, modulando as respostas inflamatória e imune. A longo prazo, tais alterações podem propiciar a transformação do tecido,

inclusive no desenvolvimento de lesões malignas como o adenocarcinoma gástrico. Adaptado de Cadamuro et al., 2014.

Embora seja o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, nem todos os indivíduos infectados pela *H. pylori* desenvolvem a doença em decorrência da heterogeneidade das cepas bacterianas, das características de predisposição do hospedeiro, como fatores genéticos (AMIEVA; EL-OMAR, 2008), e também dos fatores de risco ambientais, como consumo de sal na dieta (FORMAN; BURLEY, 2006) e os hábitos tabagista (OLIVEIRA; SILVA, 2012) e etilista (JORGE; DUARTE; SILVA, 2010). Neste aspecto, é estabelecido que a carcinogênese gástrica ocorre ao longo de estágios histológicos e patofisiológicos bem definidos, nos quais a inflamação crônica da mucosa gástrica, seguida por atrofia, é a entidade patológica mais relevante, enquanto a diminuição do ácido clorídrico na secreção gástrica é a principal anormalidade fisiológica.

O adenocarcinoma gástrico é o tipo histológico mais comum do câncer gástrico, correspondendo à 95% dos tumores malignos (INCA, 2016), o qual pode ser classificado como intestinal ou difuso (LAUREN, 1964). De acordo com o modelo de múltiplos estágios proposto por Correa (1988), o adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal pode ocorrer a partir da gastrite crônica decorrente da infecção pela *H. pylori*, que progride para atrofia glandular, metaplasia intestinal, displasia e carcinoma, com subsequente disseminação metastática (PIAZUELO; EPPLEIN; CORREA, 2010).

O câncer gástrico possui alta incidência mundialmente, responsável pela morte de 14.182 pessoas no Brasil em 2013 e estimativas do Instituto Nacional do Câncer apontam 20.520 novos casos para o ano de 2016, sobretudo em indivíduos do sexo masculino com idade superior à 50 anos (INCA, 2016). Nos pacientes com diagnóstico precoce, cerca de 90% têm taxa de sobrevivência de 5 anos (WANG et al., 2013), enquanto 80% dos pacientes diagnosticados tardiamente morrem em decorrência de tumores locais recorrentes ou pela presença de metástases mesmo após a remoção cirúrgica do tumor e tratamento quimioterápico (HARTGRINK et al., 2009).

Assim, uma maneira de prevenir a progressão de lesões precursoras para o câncer gástrico associado à bactéria *H. pylori* é a sua erradicação. Existem terapias diversas de erradicação, como a realizada pela combinação de dois ou três antibióticos e um inibidor de bombas de prótons (IBP), com ou sem sal de bismuto, no período de uma ou duas semanas (RIMBARA et al., 2011). Na terapia tripla padrão, o IBP é administrado junto a claritromicina e amoxicilina ou metronidazol, de sete a quatorze dias (CHUAH et al., 2011). A

terapia quádrupla é utilizada nos casos em que a terapia tripla padrão falha, e consiste na administração de bismuto ou a terapia com levofloxacina, a qual tem alta taxa de erradicação com poucos efeitos adversos (CHUAH et al., 2011). Revisão recente da literatura mostrou que embora outras terapias possam ser empregadas por apresentarem resultado mais eficiente em casos de resistência, a terapia tripla padrão continua sendo a primeira indicação de tratamento para pacientes com *H. pylori* (MEDSCAPE, 2016). Geralmente, a erradicação da *H. pylori* reverte o quadro de lesão pré-maligna e previne a progressão da cascata carcinogênica (TSAI et al., 2006) e, em indivíduos com infecção recente, tende a diminuir o risco de câncer gástrico. No entanto, esse efeito parece não ocorrer em pacientes expostos de forma crônica à bactéria (MABE et al., 2009).

## I.2 Infecção pela *Helicobacter pylori* e alterações na expressão gênica

No ambiente inflamado do estômago, ocorre a liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (FUENTES-PANANÁ; CAMORLINGA-PONCE; MALDONADO-BERNAL, 2009) que podem induzir alterações genéticas e epigenéticas em vários proto-oncogenes e genes supressores de tumor, favorecendo o aparecimento de diversos tipos de cânceres (USHIJIMA; HATTORI, 2012).

Neste sentido, foram observadas mudanças na expressão gênica da mucosa gástrica de indivíduos infectados pela *H. pylori*, incluindo receptores, co-receptores e proteínas transdutoras de sinal importantes no reconhecimento e sinalização celular em resposta ao patógeno. Além deles, houve aumento na expressão de quimiocinas e de seus receptores, os quais estão envolvidos nas respostas inflamatória e imune do hospedeiro (HOFMAN et al., 2007). Na via epigenética, a presença deste patógeno está relacionada a metilação progressiva de genes supressores tumorais (MAEKITA et al., 2006; SHIN et al., 2010), evento drasticamente reduzido após a sua erradicação, sugerindo uma maneira de atrasar ou reverter a carcinogênese gástrica mediada pela *H. pylori* (LEUNG et al., 2006; PERRI et al., 2007). Os genes supressores tumorais *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3* encontram-se hipermetilados em uma variedade de tumores (TAN et al., 2007; CORVALÁN et al., 2014; KIM et al., 2015), constituindo alvos interessantes de estudo, ainda pouco explorados no contexto da infecção pela *H. pylori* em lesões gástricas.

O gene *SOCS1* (*suppressor of cytokine signaling 1*) faz parte de uma família gênica de supressores da sinalização de citocinas durante a resposta inflamatória que regula negativamente a via JAK/STAT (*Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*) (OSHIMO et al., 2004). Além disso, a proteína SOCS1 se liga a moléculas

adaptadoras na via de sinalização de TLR4 dependente de *MyD88*, inibindo a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS bacteriano (NAKAGAWA et al., 2002; NAKA et al., 2005). Estudo com camundongos deficientes em *SOCS1* indicou que este gene está envolvido na supressão do desenvolvimento de tumores (NARAZAKI et al., 1998). Nesse aspecto, o silenciamento de *SOCS1* por hipermetilação já foi demonstrado em câncer cervical (KIM et al., 2015), câncer de ovário (ZHANG et al., 2015) e câncer gástrico (OSHIMO et al., 2005). Em carcinoma hepatocelular, a hipermetilação de *SOCS1* está relacionada ao aumento da ativação da via STAT3 (YOSHIKAWA et al., 2001; NAGAI et al., 2003), evento ligado a tumorigênese associada a inflamação (BURKE et al., 2001; RAHAMAN et al., 2002; YU; PARDOLL; JOVE, 2009), inclusive no câncer gástrico primário (KANDA et al., 2004). O efeito da infecção pela *H. pylori* na expressão e metilação de *SOCS1* foi investigado em amostras de câncer gástrico e de mucosa normal adjacente ao tumor de indivíduos *H. pylori* positivos. Indivíduos com câncer apresentaram diminuição na expressão de *SOCS1* correlacionada à metilação do promotor gênico em comparação à mucosa gástrica normal. No entanto, o padrão de metilação no tecido normal e no tecido tumoral não foram correlacionados a infecção pela bactéria (TO et al., 2014).

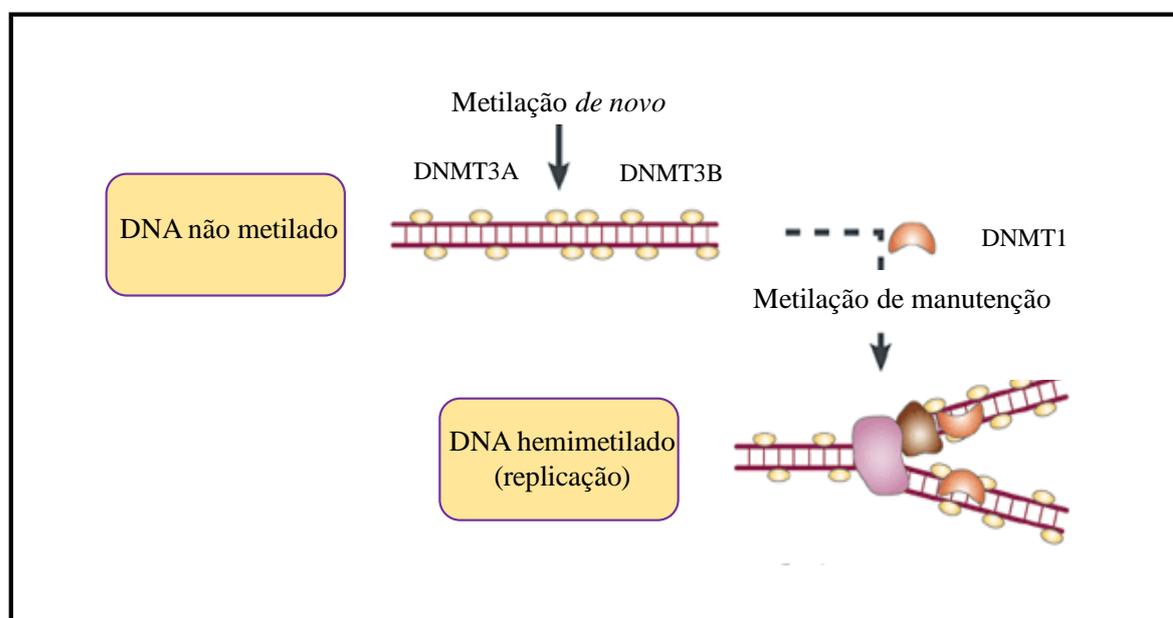
O gene *RPRM* (*reprimó, TP dependente G2 mediator candidate*) localizado em 2q23.3 é considerado um supressor tumoral, sendo responsável por codificar a proteína citoplasmática *Reprimo* que atua na via de sinalização de *p53* induzindo a parada do ciclo celular no *checkpoint* G2 (OHKI et al., 2000). Este gene encontra-se silenciado pela metilação de seu promotor em vários tipos de cânceres como câncer cervical, câncer colorretal, câncer renal (TAKAHASHI et al., 2005; MORRIS et al., 2011) e no adenocarcinoma gástrico (CORVALÁN et al., 2014). Em relação à *H. pylori*, a metilação de *RPRM* tem sido associada a cepas mais agressivas da bactéria (*cagA*-positivas e *vacA* s1/m1), conferindo risco aumentado no desenvolvimento de câncer gástrico (SCHNEIDER et al., 2010). O gene *RPRM* também foi indicado como um marcador no plasma para a análise do padrão de metilação em pacientes com câncer gástrico, uma vez que apresenta padrão distinto dos apresentados pelos indivíduos saudáveis, dessa forma podendo ser utilizado como uma alternativa não invasiva para o diagnóstico precoce (BERNAL et al., 2008). Caso esta correspondência entre tecido tumoral e plasma for confirmada para outros genes supressores tumorais, futuramente poderão ser desenvolvidas novas estratégias de diagnóstico e prevenção do câncer.

Outro gene com função de supressão de tumores é *RUNX3* (*runt-related transcription factor 3*), o qual desempenha diversas outras funções, como o desenvolvimento do trato gastrointestinal (FUKAMACHI, 2004) e a diferenciação de células T (WOOLF et al., 2003).

A proteína RUNX3 possui um domínio 'runt' altamente conservado que se liga diretamente ao DNA de modo a mediar a ativação ou repressão transcricional de genes alvos (LIN et al., 2012). Localizado na região cromossômica 1p36, sua inativação em tumores ocorre principalmente por hipermetilação do promotor (TAN et al., 2007), como nos cânceres de pulmão (LI et al., 2004), laringe e mama (KIM et al., 2004) e, uma vez que sua inativação ocorre por um mecanismo biológico reversível, é considerado uma alternativa para estratégias de tratamentos (BALMAIN, 2002). Cerca de 80% dos pacientes com câncer gástrico apresentam diminuição ou perda da expressão de *RUNX3* resultando no favorecimento da iniciação tumoral (GIAMBRA et al., 2012), da transição epitélio mesenquimal (VOON et al., 2012) e da angiogênese (PENG et al., 2006). Baixa expressão de *RUNX3* ocorre também em lesões como gastrite, metaplasia e displasia (LI et al., 2011), sendo que a infecção pela *H. pylori* pode atuar no silenciamento progressivo de *RUNX3* no estômago desde a mucosa normal até o tecido tumoral, correlacionado positivamente com a severidade das lesões e ao estágio do tumor (LU et al., 2012). Além disso, o fator de virulência CagA está diretamente relacionado a inativação de *RUNX3* pela via Src/MEK/ERK, contribuindo para a patogênese da *H. pylori* (LIU et al., 2012).

Para promover o silenciamento gênico por meio de hipermetilação do DNA, a bactéria geralmente induz o aumento da expressão das DNA-metiltransferases (DNMTs) (NA, WOO, 2014). As DNMTs constituem uma família de enzimas que catalizam a transferência de um grupo metil para o quinto carbono de resíduos de citosina da molécula de DNA (AGARWAL et al., 2013). Assim, são as responsáveis pela metilação do DNA, uma modificação epigenética crítica para o desenvolvimento, diferenciação e regulação da expressão gênica e da estrutura da cromatina (HACKETT; SURANI, 2013), sendo que falhas neste processo podem causar doenças humanas (SCHOOF; BERDEL; MULLER, 2014). A infecção pela *H. pylori* é capaz de promover a hipermetilação de genes supressores tumorais nas células epiteliais gástricas, apresentando resultado progressivo em relação à gravidade da lesão (MAEKITA et al., 2006). Por sua vez, a erradicação bacteriana reduz drasticamente a metilação decorrente da infecção (LEUNG et al., 2006; PERRI et al., 2007). O mecanismo pelo qual a bactéria promove a hipermetilação de genes específicos não está completamente esclarecido. No entanto, foi proposto que além de induzir o aumento da expressão de enzimas DNA-metiltransferases na mucosa gástrica, o estresse oxidativo em resposta à bactéria promove a ligação da proteína Snai1 aos promotores gênicos, a qual recruta enzimas DNMTs para o local promovendo o silenciamento transcricional (NA; WOO, 2014).

Nos mamíferos existem três isoformas de DNMT identificadas como ativas: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (AGARWAL et al., 2013) (Figura 3). A isoforma DNMT1 é a mais abundante e por apresentar uma preferência de 5 a 30 vezes maior para substratos hemimetilados, foi associada a função de manter o padrão de metilação após as divisões celulares (OKANO; XIE; LI, 1998), embora não exista evidência direta de que não possa estar envolvida em certos tipos de metilação *de novo* (YODER et al., 1997). A proteína ativa apresenta diferentes regiões funcionais que atuam no reconhecimento do substrato e auxiliam em sua distribuição espacial durante as divisões celulares (LEONHADT et al., 1992). Em relação à tumorigênese, foi observado que o número médio de genes metilados está correlacionado positivamente ao aumento da expressão proteica de DNMT1 na progressão de lesões de carcinoma de ducto pancreático (KANAI; HIROHASHI, 2007). Além disso, já foi relatado que a presença de polimorfismos no gene *DNMT1* está associada ao risco diferencial de infecção pela *H. pylori*, possivelmente por alterar a função da proteína e interromper os diversos processos essenciais para a manutenção da infecção na mucosa gástrica mediada por DNMT1 (JIANG et al., 2012).



**Figura 3. Metilação de dinucleotídeos CpG no DNA de mamíferos.** O DNA não metilado recebe grupos metil por meio da ação das enzimas DNMT3A e DNMT3B, principalmente, de modo a determinar o padrão de metilação da célula. Este padrão é mantido ao longo das divisões celulares pela ação da enzima DNMT1, que possui alta afinidade à moléculas de DNA hemimetiladas. Adaptado de Reik & Walter (2001).

As enzimas DNMT3A e DNMT3B realizam, principalmente, a metilação *de novo* do DNA, pois adicionam grupos metil à sítios genômicos não metilados, estabelecendo o padrão

de metilação da célula (OKANO et al., 1999). No entanto, já foram consideradas importantes para a manutenção do padrão global de metilação do DNA em alguns tipos celulares (CHEN et al., 2003). Em conjunto, as três isoformas de DNMTs já foram associadas à metilação aberrante da mucosa gástrica em indivíduos com câncer quando com expressão elevada, de maneira independente da infecção pela *H. pylori* (CAO et al., 2014). Resultados semelhantes foram observados por Yang et al. (2011), sendo as DNMT1 e DNMT3B relacionadas à características clinicopatológicas como estadiamento tumoral e metástase de linfonodo, respectivamente. Nas células tumorais é comum a mudança no padrão global de metilação do DNA em relação a células normais geralmente com hipometilação global enquanto algumas regiões específicas são hipermetiladas, incluindo genes supressores tumorais (USHIJIMA, 2005, BAYLIN; OHM, 2008).

Embora o aumento de expressão das DNMTs não seja comumente observado em indivíduos com gastrite infectados pela *H. pylori*, o silenciamento de genes supressores tumorais pode ocorrer, influenciando no risco de desenvolvimento do câncer gástrico (KAISE et al., 2008). Portanto, considerando a papel evidente da *H. pylori* na cascata de lesões que levam ao desenvolvimento do câncer gástrico, é fundamental avaliar alterações causadas pelo patógeno em indivíduos com lesão precursora como a gastrite crônica, bem como o efeito de sua erradicação no restabelecimento da homeostase da mucosa gástrica. A expressão gênica é um dos parâmetros moleculares alterados pela bactéria, e estudos realizados pelo nosso laboratório já evidenciaram que a infecção altera a expressão de alguns genes envolvidos com resposta inflamatória e imune, carcinogênese e genes de microRNAs, a qual é restabelecida após a erradicação da bactéria (CADAMURO, 2014; CADAMURO et al., 2015; ROSSI, 2015). Contudo, ainda há poucas informações sobre a ocorrência de mudanças no padrão de expressão das DNMTs e se estão correlacionadas com a expressão de genes supressores neste tipo de tumor. Ainda considerando que os supressores tumorais *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3* encontram-se silenciados por metilação em uma variedade de tumores humanos e que sua função na tumorigênese gástrica e na infecção causada pela *H. pylori* permanecem indefinidos é relevante estudar a expressão destes genes e dos genes das DNMTs, que atuam diretamente no silenciamento gênico, em indivíduos com gastrite crônica infectados pela bactéria.

## II- OBJETIVOS

Diante das considerações citadas, os objetivos do presente estudo foram:

- a) Avaliar o efeito da infecção pela *H. pylori* e de sua erradicação na expressão quantitativa do RNAm dos genes supressores tumorais *SOCS-1*, *RPRM* e *RUNX3* e das DNMTs (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) em pacientes com gastrite crônica;
- b) Investigar a associação dos fatores idade, sexo, tabagismo, etilismo e genótipo bacteriano *cagA* com a expressão dos genes supressores tumorais e DNMTs avaliados;
- c) Avaliar a ocorrência de correlação negativa entre a expressão do RNAm das DNMTs e dos genes *SOCS-1*, *RPRM* e *RUNX3*.

### III- MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana a partir de amostras armazenadas no laboratório provenientes de estudo prévio (CADAMURO, 2014) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia, Letras e Ciências Exatas (CEP/IBILCE/UNESP) conforme Parecer nº 738.505 de 2014 (Anexo 1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os participantes após os devidos esclarecimentos realizados pela pesquisadora envolvida, no qual já estava previsto o armazenamento de amostras e o seu uso em pesquisas futuras (Anexo 2). Portanto, a pesquisa foi desenvolvida conforme as Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos, Resolução CNS 466/12.

#### III.1. Casuística

Foram utilizadas 32 amostras de DNA e RNA extraídas a partir de fragmentos da região antral do estômago de indivíduos com queixa de dispepsia gástrica pelos Serviços de Endoscopia do Hospital de Base e do Hospital João Paulo II, ambos em São José do Rio Preto. Participaram da pesquisa indivíduos jovens-adultos, de ambos os sexos, com diagnóstico histopatológico de gastrite crônica ou atrófica, por vezes acompanhadas de metaplasia intestinal, de acordo com a classificação de Sydney (DIXON et al., 1996). Do total, 19 apresentaram diagnóstico positivo para a bactéria *H. pylori* (Hp+) e 9 negativo (Hp-), além de 4 amostras de mucosa gástrica normal *H. pylori*-negativa, usadas como calibrador da expressão gênica relativa. Na Tabela 1 estão detalhados os dados epidemiológicos dos grupos avaliados. Os pacientes infectados pela *H. pylori* foram submetidos à terapia tripla padrão para a erradicação da bactéria, por prescrição médica, consistindo em amoxicilina (1g), claritromicina (500mg) e omeprazol (20mg), ingeridos duas vezes por dia durante uma semana. Cerca de três meses depois do tratamento, os pacientes se submeteram a uma nova endoscopia para biópsia da mesma região gástrica, utilizada para confirmar a erradicação da bactéria. Também foram obtidas informações por meio de questionários sobre identificação, histórico familiar de lesões gástricas ou câncer, tabagismo, etilismo, entre outras. Todas as amostras foram referidas por código resguardando a identificação dos indivíduos. Como critérios de exclusão, não foram considerados os pacientes com câncer gástrico, doenças infecciosas ou processos inflamatórios relatados durante a entrevista, sob tratamento com antibióticos e/ou anti-inflamatórios até 1-2 meses antes do exame de endoscopia, e pacientes

que fizeram uso de inibidores de bomba de prótons ou antagonistas de H<sub>2</sub> cerca de 10-15 dias antes do exame de endoscopia.

**Tabela 1.** Dados epidemiológicos dos grupos de mucosa gástrica normal sem infecção pela *H. pylori* (Hp-), gastrite crônica *H. pylori*-negativos (Hp-) e gastrite crônica *H. pylori*-positivos (Hp+).

Variável	Mucosa normal (Hp-) N (%)	Gastrite crônica (Hp-) N (%)	Gastrite crônica (Hp+) N (%)
<b>Idade (anos)</b>			
Média ± desvio padrão	30 ± 12,50	41 ± 21,91	44 ± 12,60
< 30	3 (75)	< 41 6 (66,7)	< 44 7 (36,8)
≥ 30	1 (25)	≥ 41 3 (33,3)	≥ 44 12 (63,2)
<b>Total</b>	4	9	19
<b>Sexo</b>			
Feminino	3 (75)	6 (66,7)	11 (57,9)
Masculino	1 (25)	3 (33,3)	8 (42,1)
<b>Total</b>	4	9	19
<b>Tabagismo</b>			
Tabagista	0 (0)	5 (100,0)	6 (33,3)
Não tabagista	4 (100)	0 (0,0)	12 (66,7)
<b>Total</b>	4	5*	18*
<b>Etilismo</b>			
Etilista	0 (0)	3 (60,0)	6 (33,3)
Não etilista	4 (100)	2 (40,0)	12 (66,7)
<b>Total</b>	4	5*	18*
<b>Histologia</b>			
Gastrite crônica		8 (88,9)	13 (68,4)
Gastrite atrófica		0	5 (26,3)
Gastrite crônica ou atrófica com metaplasia intestinal		1 (11,1)	1 (5,3)
<b>Total</b>	4	9	19

\* Informação não disponível para alguns indivíduos. N = número de indivíduos.

## III-2. Estudo Molecular

### III-2.1 Extração de ácidos nucléicos

A extração dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) foi realizada pelo método do reagente Trizol (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Brevemente, o material proveniente de biópsia gástrica foi macerado utilizando-se pinças e mergulhadas em 1mL de Trizol, seguindo-se uma lavagem com clorofórmio (separação), após a qual se reservou a fase orgânica que contém o DNA para posterior extração. Nas próximas fases procederam-se as lavagens com álcool isopropílico (precipitação), etanol 75% (separação) e eluição do RNA em 30 µl de água DEPC (Invitrogen). Após quantificação do RNA no equipamento *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Uniscience) e avaliação da qualidade pela presença das bandas 18S e 28S do RNA ribossômico em eletroforese em gel de agarose 1%, as amostras de RNA foram estocadas a -80 °C. A partir da fase orgânica reservada, acrescentou-se, no dia anterior a extração de DNA, 20 µL de RNase, 20 µl de Proteinase K (20 mg/1 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura) e 20 µL de SDS 10% e incubou-se as amostras em banho-maria a 37°C por 16 horas. Posteriormente procedeu-se à lavagem com etanol 100% gelado, seguida de duas lavagens com citrato de sódio 0,1 M em etanol 10% e uma lavagem com etanol 75%. Então, o DNA foi dissolvido em 40µL de água ultrapura autoclavada e permaneceu em banho-maria a 37°C por 72 horas. Após quantificação no equipamento *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Uniscience) foi estocado a -20 °C para uso posterior.

### III-2.2 Diagnóstico molecular da *H. pylori* e genotipagem do gene *cagA*

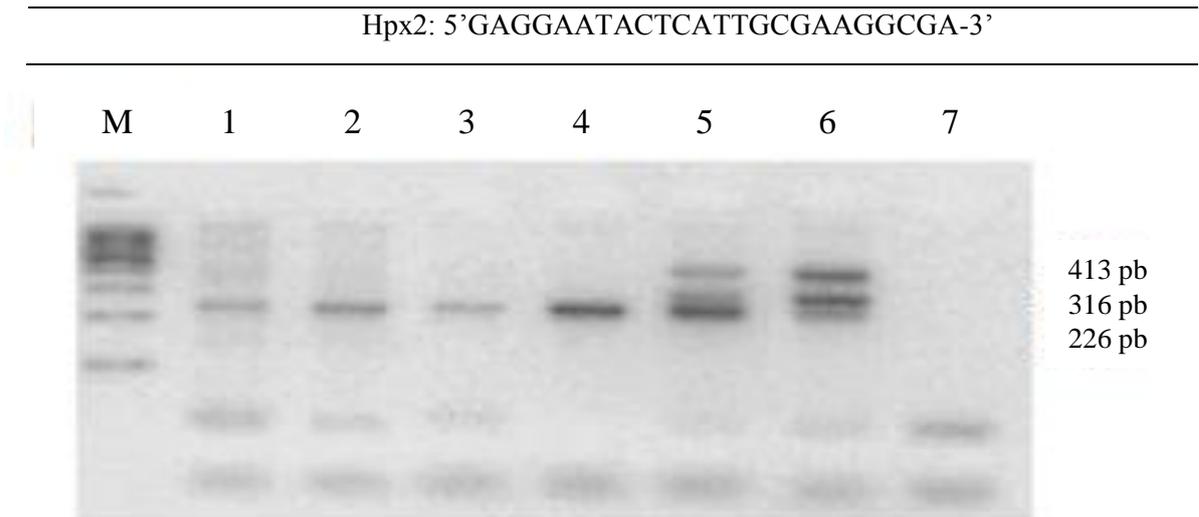
O diagnóstico molecular para a bactéria *H. pylori* foi realizado pela reação de PCR (*Polymarese Chain Reaction*) *multiplex* contendo os iniciadores dos genes bacterianos *ureA* e *tsaA* (alquil hidropéroxido redutase) e do gene constitutivo humano *CYP1A1* para verificar a integridade do DNA e eficiência da reação de PCR (Tabela 2). Nas reações foram utilizados Tampão 1X (-MgCl<sub>2</sub>), 1,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (Invitrogen), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 mM de cada iniciador (Invitrogen), 1,8 U de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen) e 100 ng de DNA, com volume final de 25 µL. O material foi processado em termociclador automático, sendo inicialmente submetido a uma temperatura de 94°C por 3 minutos para desnaturação. Posteriormente, para amplificação, foi submetido a 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, a 60°C por 30 segundos e a 72°C por 1 minuto. A extensão final ocorreu por 10 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. As amostras Hp+ apresentaram as

bandas com 413 pb (*tsaA*), 316 pb (*ureA*) e 226 pb (*CYP1A1*), enquanto a presença apenas do fragmento de 226 pb (*CYP1A1*) confirmou uma amostra Hp- (Figura 3). As amostras com resultados divergentes entre os diagnósticos histológico e molecular não foram incluídas no estudo.

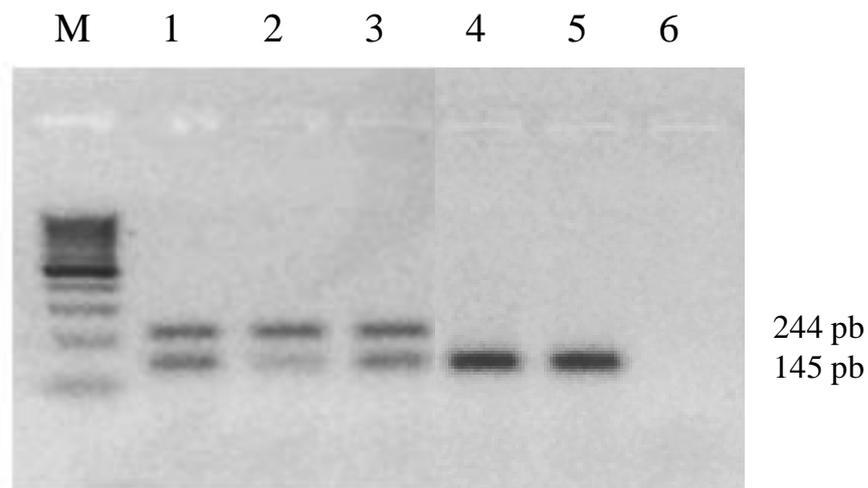
Após a confirmação da infecção pelo diagnóstico molecular, as amostras positivas foram submetidas a uma segunda PCR para determinação da presença do genótipo *cagA*. Além de iniciadores para o gene de virulência bacteriano (Tabela 2), também foram utilizados iniciadores para a amplificação de um fragmento de 145 pb correspondente ao RNA ribossômico 16S com especificidade para a *H. pylori*, conforme descrito por Scholte et al. (1997), sendo este necessário para confirmar a eficiência da reação de PCR. A reação continha Tampão 1X (-MgCl<sub>2</sub>), 1,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (Invitrogen), 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada iniciador (Invitrogen), 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen) e 300 ng de DNA, com volume final de 25 µL. Inicialmente, o material foi submetido a uma temperatura de 94°C por 5 minutos para desnaturação. Para amplificação, foi submetido a 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, a 56°C por 1 minuto e a 72°C por 1 minuto e extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo, para a observação dos fragmentos de 145 pb e 244 pb dos genes 16S-rRNA e *cagA*, respectivamente, sendo que a presença dos dois fragmentos representa uma cepa *cagA*-positiva e a presença apenas do fragmento de 145 pb indica uma cepa *cagA*-negativa (Figura 4).

**Tabela 2.** Sequências de oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos fragmentos gerados pela técnica de PCR *multiplex* para determinação do diagnóstico molecular da *H. pylori* e seus genes de virulência.

Gene	Sequência	Fragmento
<i>CYP1A1</i>	F: 5'-CTCACCCCTGATGGTGCTAT-3' R: 5'-TTTGGAAGTGCTCACAGCAG-3'	226 pb
<i>ureA</i>	F: 5'- TTCCTGATGGGACCAAACCTC-3' R: 5'- TTACCGCCAATGTCAATCAA-3'	316 pb
<i>tsaA</i>	F: 5' – CCTGCCGTTTTAGGAAACAA- 3' R: 5' – TCCGCATTCCTACCTAATGG- 3'	413 pb
<i>cagA</i>	F: 5'-ATGACTAACGAAACTATTGATC-3' R: 5'-CAGGATTTTTGATCGCTTTATT-3'	244 pb
16S-rRNA	Hp1.1: 5'-CTGGAGARACTAAGYCCTCC-3'	145 pb



**Figura 3.** Padrão de migração eletroforético para diagnóstico molecular da bactéria *H. pylori*. Colunas 1-4: amostras *H. pylori*-negativas. Colunas 5-6: amostras *H. pylori*-positivas. Coluna 7: Controle negativo da reação. Produto de amplificação da reação de PCR *multiplex* para os genes *tsaA* (413 pb), *ureA* (316 pb) e *CYP1A1* (226 pb). M: Marcador molecular de 100 pb.



**Figura 4.** Padrão eletroforético para determinação do genótipo de virulência *cagA* da *H. pylori*. Colunas 1-3: amostras *cagA*-positivas. Colunas 4 e 5: amostras *cagA*-negativas. Coluna 6: Controle negativo da reação. Produto de amplificação da reação de PCR *multiplex* para os genes *cagA* (244 pb) e *16S-rRNA* (145pb). M: Marcador molecular de 100 pb.

### III-2.3 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Após a extração do RNA total, foi realizada a transcrição reversa com o kit *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, para produzir o cDNA (DNA complementar), armazenado na concentração de 100 ng/μL. Para testar o funcionamento das sondas *TaqMan® Gene Expression Assays 20X* dos genes de interesse *SOC-1* (Hs00705164\_s1), *RPRM* (Hs04189060), *RUNX3* (Hs00231709\_m1), *DNMT1* (Hs00945875\_m1), *DNMT3A* (Hs01027166) e *DNMT3B* (Hs00171876\_m1) e dos genes de referência *ACTB* ( $\beta$ -actina, Catalog#: 4352935E) e *UBC* (*Ubictin C*, Hs00824723\_m1) foi realizada uma reação de PCR quantitativa (qPCR) no equipamento *StepOnePlus Real Time PCR System 2.2.3* (Applied Biosystems) nas condições de ciclagem referentes ao protocolo STANDARD, com temperatura de 50°C a 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C a 1 minuto, utilizando os volumes e concentrações de reagentes indicados pelo fabricante com amostras em triplicata. Após a confirmação, algumas amostras de cDNA (100 ng/μL) foram submetidas a pré-amplificação *multiplex* utilizando um *pool* das sondas citadas testando as concentrações de cDNA a 50 ng, 100 ng, 150 ng e 200 ng, sendo escolhida a concentração de cDNA 50 ng após os resultados da qPCR. As reações de pré-amplificação foram realizadas com volume final de 10 μL, contendo 5 μL *TaqMan® PreAmp Master Mix* (Applied Biosystems) 1X, 2,5 μL de *pool* de sondas 0,2X (concentração final de 0,05X por sonda), 2,0 μL de água tratada com DEPC (Ambion®) e 0,5 μL (50 ng) de cDNA. As condições de ciclagem em termociclador automático foram de 95°C por 10 minutos, seguido de 10 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

Posteriormente, foi realizada a curva padrão para todos os genes alvos e de referência, a qual verificou a eficiência e reprodutibilidade das réplicas no fator de diluição 1:5. Para todos os experimentos foi realizada reação de qPCR com volume final de 10 μL, contendo 5 μL de *GoTaq Probe qPCR Master Mix* (Promega), 0,5 μL de *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, 2X), 2 μL de água DEPC e 2,5 μL de cDNA pré-amplificado (1:10). As reações de qPCR foram realizadas em duplicata e em todos os experimentos houve um controle negativo, usado como controle de contaminação. Os genes constitutivos  $\beta$ -actina e *UBC* foram utilizados como controles de normalização, pois tinham sido avaliados em amostras de tecido gástrico em estudos prévios e apresentaram amplificação estável (FASSUNKE et al., 2010). A quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes foi calculada usando o método  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando como calibrador um *pool* das amostras do grupo de mucosa normal Hp- e os genes de referência.

### III-3. Análise estatística

Inicialmente, os dados obtidos foram submetidos ao método gráfico box-plot para detecção de *outliers* (MOROCO, 2003), os quais foram excluídos das análises subsequentes. O teste de normalidade D'Agostino-Pearson foi utilizado para avaliar a distribuição de dados contínuos. Alteração da expressão de RNAm entre os grupos foi avaliada pelo Teste de Wilcoxon Signed Rank, considerando o valor um como mediana teórica referente ao *pool* de amostras de mucosa normal Hp-, utilizados como calibrador de acordo com o método do  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O teste de Mann-Whitney foi empregado para comparar os valores de expressão gênica entre os grupos, bem como entre os subgrupos com alta e baixa expressão no grupo Hp+, enquanto o Teste t pareado para as comparações dos subgrupos com alta expressão, comparando os indivíduos antes e depois do tratamento. Teste de Mann-Whitney foi também utilizado para comparar as medianas de RQ do grupo Hp+ considerando os fatores de risco idade, sexo, tabagismo, etilismo e genótipo bacteriano *cagA*. A avaliação de correlação entre a expressão dos genes *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3* e a expressão das *DNMTs* foi realizada pela Correlação de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## IV- RESULTADOS

### IV-1. Diagnóstico molecular para *H. pylori* e genotipagem do gene *cagA*

As 19 amostras provenientes dos pacientes com gastrite crônica antes do tratamento foram confirmadas como Hp+ pelo diagnóstico molecular. Da mesma forma, as amostras de mucosa gástrica histologicamente normal e as do grupo com gastrite sem infecção foram confirmadas como Hp-. Depois do tratamento, a erradicação da bactéria também foi confirmada pelo método molecular. As amostras com resultados divergentes entre os diagnósticos histopatológico e molecular foram excluídas do estudo. A Tabela 3 apresenta os resultados referentes ao genótipo *cagA*. Do total de 19 amostras Hp+, 12 amplificaram para o gene *cagA*. Destas, 50% (6/12) foram *cagA*-positivas e 50% (6/12) *cagA*-negativas.

**Tabela 3.** Frequências de indivíduos com genótipos *cagA* no grupo com gastrite crônica Hp+.

Diagnóstico	Hp+ N (%)
<i>cagA</i> +	6 (50,0%)
<i>cagA</i> –	6 (50,0%)
<b>Total</b>	12

N = número de indivíduos.

### IV-2. Expressão gênica relativa dos genes *SOCS-1*, *RPRM*, *RUNX3*, *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*

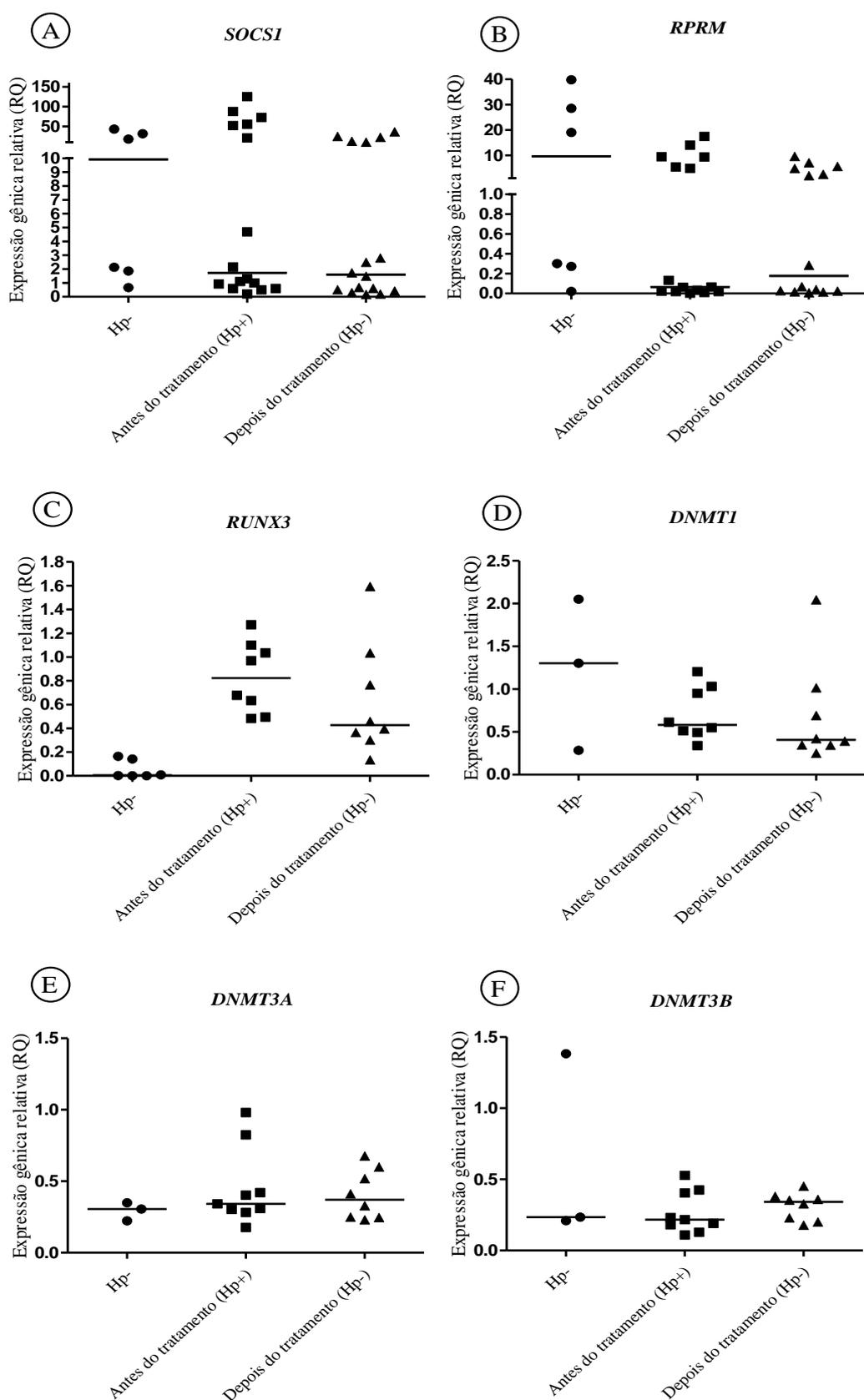
Na Tabela 4 encontram-se os dados referentes a expressão gênica relativa dos genes *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3*, *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* nos grupos de pacientes com gastrite crônica *H. pylori*-negativos (Hp-) e *H. pylori*-positivos (Hp+) antes e depois o tratamento de erradicação da bactéria. A expressão dos genes *SOCS1*, *RPRM* e *DNMT1* não apresentou diferenças significantes nos grupos Hp- e Hp+ quando comparados entre si e em relação à mucosa normal, bem como não houve diferença no grupo Hp+ antes e depois do tratamento. No grupo Hp+ os genes *SOCS1* e *RPRM* apresentaram mediana de expressão relativa menor que o observado no grupo Hp-, porém sem diferenças significantes, possivelmente em decorrência da expressão heterogênea apresentada pelos indivíduos desse grupo (Figuras 5A e 5B; Tabela 5). A expressão do gene *RUNX3* não foi significantemente alterada no grupo Hp+, porém no grupo Hp- houve uma diminuição significativa em relação à mucosa normal ( $p=0,031$ ) e ao grupo Hp+ antes ( $p=0,001$ ) e depois do tratamento ( $p=0,003$ ). Para os genes

*DNMT3A* e *DNMT3B* observou-se expressão reduzida em ambos os grupos Hp- e Hp+ de forma independente à erradicação da bactéria (Figuras 5E e 5F).

**Tabela 4.** Expressão relativa do RNAm dos genes *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3*, *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em pacientes com gastrite crônica *H. pylori*-negativos (Hp-) e *H. pylori*-positivos (Hp+) antes e depois o tratamento de erradicação da bactéria.

Genes	Hp-	Antes do tratamento (Hp+)	Depois o tratamento (Hp-)
<b><i>SOCS1</i></b>			
Amostras (N)	7	19	19
Mediana de RQ	9,92	1,73	1,61
Varição	(0,66 - 42,97)	(0,19 - 124,99)	(0,18 - 36,21)
P		0,796	0,146
<b><i>RPRM</i></b>			
Amostras (N)	6	19	19
Mediana de RQ	9,67	0,06	0,17
Varição	(0,02 - 28,50)	(0,02 - 17,47)	(0,01 - 9,63)
P		0,094	0,735
<b><i>RUNX3</i></b>			
Amostras (N)	6	8	8
Mediana de RQ	0,004**	0,824	0,43
Varição	(0,0002 - 0,16)	(0,48 - 1,27)	(0,13 - 1,59)
P		0,001*	0,130
<b><i>DNMT1</i></b>			
Amostras (N)	3	8	8
Mediana de RQ	1,30	0,58	0,40
Varição	(0,28 - 2,05)	(0,34 - 1,21)	(0,25 - 2,05)
P		0,497	0,382
<b><i>DNMT3A</i></b>			
Amostras (N)	3	9	9
Mediana de RQ	0,31	0,34**	0,37**
Varição	(0,22 - 0,34)	(0,17 - 0,98)	(0,23 - 0,67)
P		0,482	0,945
<b><i>DNMT3B</i></b>			
Amostras (N)	3	9	9
Mediana de RQ	0,23	0,22**	0,34**
Varição	(0,20 - 1,38)	(0,10 - 0,52)	(0,17 - 0,45)
P		0,373	0,383

\* Valores estatisticamente significantes. \*\* Valores estatisticamente significantes em relação à mucosa gástrica normal. N = número de indivíduos. RQ = Quantificação relativa. p = Teste de Mann-Whitney.



**Figura 5.** Expressão relativa do RNAm dos genes *SOCS1* (A), *RPRM* (B), *RUNX3* (C), *DNMT1* (D), *DNMT3A* (E) e *DNMT3B* (F) em pacientes com gastrite crônica *H. pylori*-negativo (Hp-) e *H. pylori*-

positivo antes (Hp+) e depois do tratamento (Hp-). Cada ponto representa o RQ de um indivíduo do grupo. Os dados estão apresentados em escala linear.

Na Figura 5 (A-B) é possível observar indivíduos em ambos os grupos Hp- e Hp+ com valores de expressão dos genes *SOCS1* e *RPRM* reduzidos e outros elevados. Portanto, no grupo Hp+ a mediana de expressão foi utilizada para classificar os subgrupos de alta e baixa expressão antes e após o tratamento. Estes subgrupos apresentaram diferenças significantes entre si, indicando a heterogeneidade de expressão dos pacientes avaliados antes e após o tratamento (Tabela 5). O subgrupo de alta expressão apresentou uma mediana superior antes do tratamento em relação ao depois do tratamento para os dois genes, contudo, sem diferenças significantes.

**Tabela 5.** Comparação entre os subgrupos de pacientes com gastrite crônica Hp+ com alta e baixa expressão gênica relativa dos genes *SOCS1* e *RPRM* antes e depois do tratamento.

	<i>SOCS1</i>		p	<i>RPRM</i>		p
	Antes do tratamento	Depois do tratamento		Antes do tratamento	Depois do tratamento	
<b>Expressão</b>						
Alta (N)	6	5		6	6	
Mediana de RQ	53,73	11,40	0,051	7,42	4,89	0,156
Baixa (N)	10	10		10	8	
Mediana de RQ	0,76	0,46	0,154	0,02	0,02	0,659
P	0,0002*	0,0002*		0,0003*	0,0006*	

\* Valores estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). N = número de indivíduos. RQ = Quantificação Relativa. p = Teste de Mann-Whitney e Teste t pareado.

Em outra análise, para avaliar a ocorrência de associação entre a expressão gênica e os fatores de risco no grupo Hp+, comparou-se os valores de expressão dos genes avaliados em relação aos fatores idade, sexo, tabagismo, etilismo e genótipo bacteriano *cagA* (Tabela 6), contudo não foram observadas diferenças significantes.

**Tabela 6.** Expressão relativa do RNAm (RQ) dos genes *SOCS1*, *RPRM*, *RUNX3*, *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* comparados de acordo com as variáveis idade, sexo, hábitos tabagista e etilista, e genótipo bacteriano *cagA* no grupo Hp+.

	<i>SOCS1</i>	<i>RPRM</i>	<i>RUNX3</i>	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3B</i>
<b>Idade (anos)</b>						
< 44	7 (36,8%)	7 (36,8%)	5 (50%)	6 (42,9%)	5 (55,5%)	5 (55,5%)
Mediana de RQ (variação)	1,10 (0,49- 87,85)	0,06 (0,02- 9,47)	0,39 (0,25 - 1,02)	0,78 (0,34 - 1,46)	0,31 (0,28 - 0,98)	0,22 (0,11 - 0,43)
≥ 44	12 (63,2%)	12 (63,2%)	5 (50%)	8 (57,1%)	4 (44,5%)	4 (44,5%)
Mediana de RQ (variação)	21,21 (0,19 - 87,85)	2,51 (0,01 - 14,06)	0,46 (0,13 - 1,59)	1,02 (0,26 - 2,45)	0,40 (0,34 - 0,82)	0,23 (0,19 - 0,53)
p	0,535	0,628	0,841	0,662	0,571	0,571
<b>Sexo</b>						
Feminino	10 (55,5%)	9 (56,3%)	7 (70%)	8 (57,1%)	6 (66,7%)	6 (66,7%)
Mediana de RQ (variação)	1,00 (0,19 - 125,0)	0,03 (0,02- 17,47)	0,68 (0,49 - 1,10)	0,56 (0,26 - 2,45)	0,33 (0,28 - 0,42)	0,20 (0,11 - 0,40)
Masculino	8 (44,5%)	7 (43,7%)	3 (30%)	6 (42,9%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)
Mediana de RQ (variação)	4,97 (0,60 - 87,85)	4,89 (0,003 - 14,06)	0,60 (0,48 - 1,27)	1,21 (0,55 - 2,13)	0,82 (0,18 - 0,98)	0,43 (0,13 - 0,53)
p	0,211	0,469	0,667	0,142	0,548	0,381
<b>Tabagismo</b>						
Sim	6 (33,3%)	6 (33,3%)	4 (40%)	5 (38,5%)	4 (44,4%)	4 (44,4%)
Mediana de RQ (variação)	1,38 (0,19 - 125,0)	0,08 (0,003 - 17,47)	0,62 (0,48 - 0,68)	1,21 (0,49 - 2,13)	0,37 (0,18 - 0,82)	0,21 (0,13 - 0,53)
Não	12 (66,7%)	12 (66,7%)	6 (60%)	8 (61,5%)	5 (55,5%)	5 (55,5%)
Mediana de RQ (variação)	2,99 (0,49 - 87,85)	0,07 (0,02 - 14,06)	1,00 (0,49 - 1,27)	0,89 (0,34 - 2,45)	0,31 (0,28 - 0,98)	0,22 (0,11 - 0,43)
p	0,713	0,529	0,067	0,833	1,000	0,905
<b>Etilismo</b>						

Sim	6 (33,3%)	6 (33,3%)	4 (40%)	6 (46,2%)	4 (44,4%)	4 (44,4%)
Mediana de RQ (variação)	1,73 (0,60 - 72,60)	0,09 (0,003 - 5,03)	0,82 (0,48 - 1,27)	1,21 (0,34 - 2,13)	0,57 (0,18 - 0,98)	0,32 (0,13 - 0,53)
Não	12 (66,7%)	12 (66,7%)	6 (60%)	7 (53,8%)	5 (55,5%)	5 (55,5%)
Mediana de RQ (variação)	11,15 (0,19 - 125,0)	0,06 (0,01 - 17,47)	0,68 (0,49 - 1,10)	0,84 (0,49 - 2,45)	0,34 (0,28 - 0,42)	0,19 (0,11 - 0,40)
p	1,000	0,607	1,000	0,628	0,730	0,413
<b><i>CagA</i></b>						
Positivo	6 (54,5%)	6 (50%)	5 (45,5%)	4 (40%)	4 (66,7%)	4 (66,7%)
Mediana de RQ (variação)	1,19 (0,60 - 87,85)	0,42 (0,003 - 9,47)	0,02 (0,003 - 5,44)	0,75 (0,34 - 1,46)	0,31 (0,018 - 0,98)	0,19 (0,13 - 0,43)
Negativo	5 (45,5%)	6 (50%)	6 (54,5%)	6 (60%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)
Mediana de RQ (variação)	21,21 (0,93 - 72,60)	7,15 (0,06 - 14,06)	7,15 (0,06 - 14,06)	1,12 (0,26 - 2,45)	0,62 (0,42 - 0,82)	0,47 (0,40 - 0,53)
p	0,428	0,132	0,052	0,762	*	*

\* N° amostral insuficiente. RQ: Quantificação Relativa p= Teste de Mann-Whitney.

### IV-3. Análise de correlação entre a expressão do RNAm das DNMTs e dos supressores tumorais *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3*

Na Tabela 7 estão os resultados da análise de correlação entre os níveis de expressão gênica das DNMTs e supressores tumorais no grupo Hp+ antes e após o tratamento de erradicação, sendo observadas apenas correlações positivas. O gene *DNMT1* apresentou expressão do RNAm positivamente correlacionada à do gene *SOCS1* no grupo Hp+ antes do tratamento (p=0,011). Os genes *DNMT3A* e *RPRM* apresentaram correlação positiva tanto antes (p=0,021) como depois da erradicação da bactéria (p=0,011). Enquanto para o gene *DNMT3B* houve correlação positiva apenas com o gene *RPRM* nas amostras infectadas pela *H. pylori* (p=0,031).

**Tabela 7.** Coeficiente de correlação entre a expressão relativa dos genes das DNMTs e dos genes *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3* no grupo de pacientes com gastrite crônica Hp+ antes e depois do tratamento.

Gene	Antes do tratamento		Depois do tratamento		
	Coefficiente de correlação	P	Coefficiente de correlação	P	
<i>DNMT1</i>	<i>SOCS1</i>	0,68	0,011*	0,65	0,067
	<i>RPRM</i>	0,36	0,209	0,52	0,162
	<i>RUNX3</i>	-0,01	1,000	0,67	0,083
<i>DNMT3A</i>	<i>SOCS1</i>	0,50	0,178	0,28	0,501
	<i>RPRM</i>	0,77	0,021*	0,86	0,011*
	<i>RUNX3</i>	0,48	0,188	0,14	0,752
<i>DNMT3B</i>	<i>SOCS1</i>	0,63	0,076	0,28	0,501
	<i>RPRM</i>	0,73	0,031*	0,45	0,268
	<i>RUNX3</i>	0,42	0,265	0,24	0,582

\* Valores estatisticamente significantes (p < 0,05). RQ = Quantificação Relativa. p = Correlação de Spearman.

## V. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou pela primeira vez o efeito da infecção pela bactéria *H. pylori* e de sua erradicação na expressão relativa do RNAm dos genes supressores tumorais *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3* e das enzimas DNMTs *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em pacientes com gastrite crônica. De modo geral, os resultados mostraram expressão relativa reduzida dos supressores tumorais e das DNMTs nos pacientes infectados mesmo após a erradicação bacteriana. Nos pacientes sem infecção pela *H. pylori*, embora a expressão gênica de *SOCS1*, *RPRM* e *DNMT1* fosse elevada, não se observou diferença significativa em relação aos pacientes infectados. Em relação aos fatores de risco idade, sexo, tabagismo, etilismo e genótipo bacteriano *cagA* não foi encontrada associação com a expressão do RNAm dos genes avaliados. Além disso, não foram observadas correlações negativas entre a expressão do RNAm dos genes supressores e DNMTs nos pacientes infectados antes e depois da sua erradicação. Portanto, de modo geral nossos resultados não evidenciaram alteração expressiva nos níveis do RNAm dos genes avaliados em decorrência da infecção e erradicação da *H. pylori* em pacientes com gastrite crônica.

Alteração na expressão gênica é um dos parâmetros moleculares que tem sido relatada em decorrência da infecção pela *H. pylori* (HOFMAN et al., 2007; YANG; CHEN; WANG, 2012), inclusive pelo nosso grupo de pesquisa (CADAMURO, 2014; CADAMURO et al., 2015; ROSSI, 2015). Rossi (2015) encontrou expressões aumentadas do RNAm de genes envolvidos na resposta inflamatória em pacientes infectados pela *H. pylori*, com redução significativa dos mediadores pró-inflamatórios *TNFA* e *IL6* após a erradicação da bactéria. Ainda neste estudo, foi sugerido que a *H. pylori* pode alterar o controle epigenético da expressão de alguns genes por meio da alteração na expressão de microRNAs, os quais mostraram-se negativamente correlacionados com a expressão de algumas citocinas avaliadas, como o TNF- $\alpha$ . Também na via epigenética, a metilação de regiões promotoras de genes supressores tumorais leva ao silenciamento transcricional envolvido na promoção da tumorigênese (TAN et al., 2007; CORVALÁN et al., 2014; KIM et al., 2015), a exemplo dos genes *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3*, que se encontram hipermetilados e exibem baixa expressão gênica e proteica em algumas malignidades humanas, como o câncer cervical (TAKAHASHI et al., 2005; KIM et al., 2015) e o câncer gástrico (OSHIMO et al., 2004; CORVALÁN et al., 2014).

No presente trabalho, a presença da *H. pylori* não alterou significativamente a expressão do RNAm do gene supressor de tumor *SOCS1* no epitélio com gastrite infectado em relação aos não infectados, assim como após a terapia de erradicação, possivelmente devido a heterogeneidade de expressão entre os indivíduos. *SOCS1* é um membro da família de supressores da sinalização de citocinas fundamental na regulação negativa destes mediadores durante a resposta inflamatória (COONEY, 2002). As citocinas são proteínas que atuam em processos celulares essenciais, podendo levar a ativação da transcrição gênica via JAK/STAT (*Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*) (OSHIMO et al., 2004). Considerando seu papel relevante, estudos sobre *SOCS1* revelaram sua atividade de supressor tumoral, inclusive no câncer gástrico, por suprimir o desenvolvimento, progressão e ocorrência de metástases (OSHIMO et al., 2004). Também é fundamental no controle da sinalização em resposta ao LPS da parede celular bacteriana, o qual pode induzir a transcrição de mediadores pró-inflamatórios por meio da ativação do NF- $\kappa$ B (NAKAGAWA et al., 2002).

Em carcinoma gástrico, este gene é alvo de silenciamento por meio da hipermetilação de seu promotor com consequente diminuição da expressão do RNAm, diferindo do padrão apresentado pela mucosa não neoplásica (OSHIMO et al., 2004). Deste modo, é sugerido que a inativação transcricional de *SOCS1* desempenha um papel importante na tumorigênese do estômago (OSHIMO et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em células de carcinoma cervical, no qual a expressão gênica e proteica dos genes *SOCS1*, *SOCS2* e *SOCS3* foi significativamente menor em relação ao tecido não tumoral. Além disso, a inibição de DNMTs 1, 3A e 3B resultou no reestabelecimento da expressão de *SOCS1*, corroborando com a ideia de que a metilação promoveu silenciamento transcricional de *SOCS1*, o qual possui algum envolvimento na tumorigênese e manutenção deste tipo de tumor (KIM et al., 2015). Por outro lado, não há estudos sobre a participação da *H. pylori* na expressão e silenciamento por metilação de *SOCS1* em lesões precursoras ao câncer gástrico, embora haja um relato em que se observou metilação deste gene em gastrite crônica relacionada à *H. pylori* (THOMAZINI et al., 2008).

Outro gene supressor tumoral comumente silenciado em tumores é o *Reprimo* (*RPRM*). Nossos dados mostraram expressão relativa de *RPRM* mais baixa nos indivíduos infectados, porém sem diferenças significantes em comparação com os indivíduos sem infecção, o que pode sugerir que a bactéria, e não apenas a inflamação da mucosa decorrente da gastrite, pode ser um fator importante na repressão deste gene. A proteína *RPRM* é altamente glicosilada e se localiza predominantemente no citoplasma celular (OHKI et al.,

2000), onde atua junto à outras proteínas na via de sinalização de p53 resultando na parada do ciclo celular na fase G2 (OHKI et al., 2000). Estudos em ratos mostraram que mutações em *p53* resultam em baixa expressão de *RPRM* em comparação a ratos selvagens, indicando que a expressão deste gene é controlada positivamente por *p53* (LUO et al., 2011), o qual atua, portanto, como um fator importante na regulação da expressão de *RPRM*.

Takahashi et al. (2005) mostraram que o silenciamento gênico de *RPRM* ocorre em uma variedade de malignidades humanas, como câncer gástrico, colorretal e cervical, principalmente por metilação da região promotora, reduzindo sua expressão. Em câncer de pâncreas, a metilação de *RPRM* foi frequente e semelhante em linhagem celular e amostras clínicas de forma coordenada à baixa expressão gênica, a qual obteve aumento significativo após tratamento com a substância desmetilante 5AzaC (5-azacitidina) (CORVALÁN, 2013). Em linhagens de câncer gástrico, a restauração da expressão gênica de *RPRM* foi obtida pela combinação de danos ao DNA por luz ultravioleta e o uso de agentes desmetilantes, inibindo fortemente a proliferação celular e promovendo a indução da apoptose *in vitro* (OOKI et al., 2013). De modo esperado, a perda de sua expressão se reflete em profunda invasão tumoral, invasão linfática e metástase de linfonodo, que caracteriza um tipo mais agressivo de adenocarcinoma gástrico (LUO et al., 2011). Além disso, a metilação de *RPRM* está relacionada à baixa resposta ao tratamento quimioterápico em pacientes com este tipo de tumor (OOKI et al., 2013).

Em lesões gástricas precursoras, foi observado que a metilação do promotor de *RPRM* está positivamente associada com o diagnóstico histológico, ou seja, a proporção de metilação aumenta ao longo da sucessão de lesões gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia (SCHNEIDER et al., 2010). Além disso, foi apontado que nos indivíduos infectados por cepas *H. pylori cagA* positivas – *vacA s1m1* a metilação foi significativamente maior, e que este nível era semelhante no plasma e no tecido tumoral no mesmo indivíduo (SCHNEIDER et al., 2010). Desta forma, foi sugerido que o padrão de metilação de *RPRM* pode se tornar um potencial biomarcador para o diagnóstico precoce do câncer gástrico. No entanto, a metilação deste gene foi raramente detectada em tecidos não tumorais de diversos órgãos humanos, podendo ocorrer apenas em até 11% dos tecidos gástricos sem tumor (TAKAHASHI et al., 2005).

A expressão gênica de *RUNX3* não apresentou alteração em resposta a infecção pela *H. pylori*, embora os indivíduos com gastrite Hp- apresentassem uma diminuição significativa. Os genes da família *RUNX* originam fatores de transcrição importantes na regulação da resposta ao dano na molécula de DNA dependente de p53 (OZAKI; NAKAGAWARA;

NAGASE, 2013), sendo que *RUNX3* é crítico na regulação da proliferação, indução da apoptose e controle da angiogênese, bem como da adesão celular e invasão (SUBRAMANIAM et al., 2009). Além disso, o aumento de sua expressão causa parada do ciclo celular e apoptose e, uma vez que a perda de sua expressão está envolvida no desenvolvimento dos processos de invasão e metástase (CHEN et al., 2012), diversas investigações têm buscado respostas que auxiliem no gerenciamento de pacientes com câncer, os quais podem apresentar um prognóstico ruim em decorrência de metástases e tumores recorrentes mesmo após a remoção dos tumores e tratamento quimioterápico (HARTGRINK et al., 2009; REDIG; McALLISTER, 2013). A perda da expressão de *RUNX3* por hipermetilação de seu promotor gênico é relatada em câncer de mama (YU et al., 2014), pulmão (BARNIE et al., 2014), rim (CHEN et al., 2013), colorretal (IMAMURA et al., 2005), estômago (CHEN et al., 2011), entre outros, evidenciando seu papel de supressor tumoral. Apenas em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço este gene parece desempenhar atividade de oncogene (TSUNEMATSU, 2009), enquanto no câncer de ovário a função de oncogene ainda é questionável (NEVADUNSKY et al., 2009).

De modo geral, em tumores de diferentes tecidos é observado o envolvimento da perda de *RUNX3* na ocorrência de metástase, já citada como um dos pontos críticos no prognóstico clínico. Em tumores de estômago avançados e altamente metastáticos cerca de 90% apresentam expressão diminuída de *RUNX3* (LI et al., 2002), sobretudo nos tecidos de metástase peritoneal em comparação aos tumores gástricos primários (SO et al., 2006). Além disso, foi significativamente associada com a diminuição da sobrevivência dos pacientes com este tipo de tumor (CHEN et al., 2011). A proteína *RUNX3* atua em processos celulares cuja desregulação é necessária para a ocorrência de metástase, como inibição da expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) (PENG et al., 2006), controle da atividade da metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) e de seu repressor TIMP1 (CHEN et al., 2011), e regulação da expressão de e-caderina e vimentina envolvidas na transição epitélio-mesenquimal (EMT) (LIU et al., 2014). Conforme esperado, observa-se alteração na expressão e atividade destes mediadores na ausência de *RUNX3*, promovendo a transformação do fenótipo celular, invasão do tecido e ocorrência de metástases distantes (CHEN et al., 2011; LIU et al., 2014).

Por outro lado, em lesões não-cancerosas poucos estudos têm investigado o papel de *RUNX3* na progressão dessas lesões. Lu et al. (2012) avaliaram a metilação de seu promotor gênico nas diferentes lesões de estômago, desde mucosa normal adjacente ao tumor, gastrite atrófica crônica, metaplasia intestinal, adenoma gástrico, displasia e câncer gástrico.

Relataram que a frequência e proporção de metilação progrediram de acordo com a severidade das lesões de maneira relacionada à infecção pela *H. pylori*. De modo interessante, esta progressão não foi observada nos indivíduos sem infecção (LU et al., 2012). Em indivíduos com mucosa gástrica normal há uma relação inversamente proporcional entre a taxa de metilação deste gene e idade dos indivíduos, indicando que o envelhecimento promove diminuição na metilação de *RUNX3* (WAKI et al., 2003; FAN et al., 2011). Em gastrite crônica não existem estudos avaliando a participação de *RUNX3* na cascata tumorigênica do estômago, seja associada ou não à *H. pylori*, sendo necessários estudos posteriores para determinar seu papel nesta lesão.

A família de enzimas DNMTs atuam na regulação da expressão gênica promovendo o silenciamento por meio da metilação da região promotora (AGARWAL et al., 2013), evento que, quando desregulado, encontra-se associado com o desenvolvimento de doenças humanas, como doenças inflamatórias (NAKANO; BOYLE; FIRESTEIN, 2013) e o câncer (YANG et al., 2011). O silenciamento transcricional promovido pelas DNMTs é uma das anormalidades epigenéticas envolvidas na iniciação e progressão tumoral, inativando preferencialmente genes supressores tumorais (TABY; ISSA, 2010), sendo que cerca de 600 ilhas CpG estão diferencialmente metiladas em uma variedade de tumores humanos primários (COSTELLO et al., 2000). A infecção pela *H. pylori* parece influenciar o padrão de metilação gênica mesmo após a sua erradicação de forma dependente do grau da lesão tecidual. Nanjo et al. (2011) compararam pacientes com câncer gástrico e indivíduos saudáveis, ambos com infecção no passado seguida de erradicação, e observaram que os indivíduos com câncer apresentavam maiores níveis de metilação em genes de risco para o desenvolvimento desta malignidade em relação aos indivíduos saudáveis. Dessa forma, consideramos relevante avaliar a expressão do RNAm das três formas de DNMTs em resposta a infecção, e a ocorrência de correlação negativa de sua expressão com a expressão dos genes supressores tumorais avaliados, uma vez que se encontram frequentemente hipermetilados no câncer gástrico.

De modo geral a expressão gênica das DNMTs foi reduzida nos grupos de indivíduos infectados e não infectados pela *H. pylori*, exceto no grupo Hp- quanto à expressão de *DNMT1*. A expressão gênica da enzima DNMT1 não apresentou alteração nos indivíduos avaliados no presente trabalho. Esta isoforma foi a primeira metiltransferase de DNA descoberta em mamíferos e é considerada a principal responsável por manter a integridade genômica em eucariotos superiores em decorrência de sua participação na preservação e propagação fieis dos padrões de metilação existentes (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011). Em células normais, é mantido um estado basal de expressão de DNMT1

controlado por diversas vias de sinalização (ROULEAU; MACLAEO; SZYF, 1995). Por exemplo, a proteína p53 se liga diretamente ao promotor gênico de *DNMT1* controlando a expressão do RNAm. No entanto, quando ocorrem danos ao DNA e a ativação da via de sinalização de p53, há diminuição no controle sobre sua transcrição, promovendo um aumento de expressão (PETERSON; BÖGLER; TAYLOR, 2003). Neste sentido, DNMT1 apresenta um importante papel na transformação maligna por inibir a expressão de genes supressores tumorais quando com expressão aumentada (BIGEY et al., 2000).

O aumento da expressão proteica de DNMT1 foi associado a formas mais avançadas de tumor astrocítico e correlacionado negativamente com a expressão de MGMT (0-6-metilguanina-DNA metiltransferase) (RAHMAN et al., 2015), uma proteína de reparo responsável por proteger a célula contra mutações letais ocasionadas por agentes alquilantes (WOOD, 1996). Em amostras de tumores gástricos, cerca de 65% apresentaram aumento de expressão proteica de DNMT1, distribuída tanto no núcleo quanto no citoplasma da célula (YANG et al., 2011). No entanto, na mucosa gástrica normal de indivíduos saudáveis ou adjacente ao tumor a expressão de *DNMT1* não foi alterada pela presença da *H. pylori*. Análises de metilação de promotores gênicos mostraram que embora alguns genes sejam resistentes, outros são suscetíveis a metilação relacionada à infecção mesmo sem alterar a expressão gênica e proteica das DNMTs (NAKAJIMA et al., 2009).

Nossos dados mostraram que os indivíduos infectados pela *H. pylori* e após a sua erradicação, assim como os não infectados apresentaram diminuição do RNAm dos genes *DNMT3A* e *DNMT3B*. Inicialmente, as isoformas ativas DNMT3A e DNMT3B foram consideradas fundamentais no desenvolvimento embrionário inicial de mamíferos por realizarem a metilação *de novo*, na qual são adicionados grupos metil em sítios genômicos não metilados de modo a estabelecer o padrão de metilação que será reproduzido ao longo das divisões celulares (RAZIN; CEDAR, 1993). No entanto, suas funções não estão restritas a este período, pois atuam em fases mais tardias do desenvolvimento (OKANO, 1999) e podem estar envolvidas no aparecimento de doenças de vida adulta, como o câncer (YANG et al., 2011). Neste aspecto, existem inúmeras evidências de que ocorre expressão aumentada de DNMTs em tecidos tumorais (MIZUNO et al., 2001; LIN et al., 2007; QU et al., 2010), atuando na metilação e consequente silenciamento preferencial de genes supressores tumorais, favorecendo a tumorigênese (MOMPARLER, 2003; BELINSKY, 2004).

Na carcinogênese gástrica é relatada a expressão aumentada dos genes *DNMT3A* e *DNMT3B* (NA; WOO, 2014, para revisão) e o envolvimento das alterações epigenéticas no silenciamento de genes supressores tumorais, interferindo em processos celulares como ciclo

celular, migração, crescimento e apoptose (QU; DANG; HOU, 2013). Esta relação não está bem estabelecida em lesões precursoras como a gastrite e na infecção pela *H. pylori*. Entretanto, é reconhecido que a infecção causa um quadro de inflamação crônica, desencadeando danos à molécula de DNA em decorrência do estresse oxidativo, e a promoção de alterações epigenéticas que causam o silenciamento de genes supressores tumorais (NARDONE; COMPARE, 2008) e de outros genes envolvidos na homeostase tecidual (LU et al., 2012; CHENG et al., 2013). Neste sentido, foi observado que a erradicação da bactéria pode reverter o padrão de metilação de promotores gênicos (CHAN et al., 2006; NANJO et al., 2012) e, por vezes, atenuar as lesões gástricas desencadeadas pela infecção (CHAN et al., 2006).

A expressão gênica das enzimas DNMTs pode ser controlada por diversos mecanismos. O controle pré-transcricional dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* pode ser realizado pela proteína p53, como já relatado, a qual se liga e modifica a cromatina da região promotora (TANG et al., 2014). Além disso, o microRNA-29 promove o controle pós-transcricional, ligando-se ao RNAm dos genes *DNMT3A* e *DNMT3B*, inibindo a sua tradução (OLIVEIRA et al., 2015). Contudo, em gastrite crônica associada à *H. pylori* não há relatos de redução da expressão DNMTs. Na & Woo (2014) relataram diversas alterações na mucosa gástrica causadas pela *H. pylori* que, em conjunto, permitiram aos autores concluir que a bactéria promove a hipermetilação de ilhas CpG por meio do aumento da expressão das DNMTs. Contrariamente, Nakajima et al. (2009) não encontraram diferenças na expressão gênica e proteica de *DNMT3A* e *DNMT3B* no epitélio gástrico de indivíduos infectados em relação aos não infectados, tanto em lesão não cancerosa como em pacientes com câncer gástrico. Embora não tenha sido observado o aumento na expressão destas enzimas em alguns estudos de pacientes com câncer gástrico *H. pylori*-positivos (ETOH et al., 2004; CAO et al., 2014), a infecção foi capaz de aumentar a atividade de DNMTs nas linhagens celulares de câncer gástrico MKN7 e MKN74 (HUANG et al., 2012).

O aumento de expressão gênica de DNMTs em tecidos tumorais fornece uma explicação plausível para o seu envolvimento na tumorigênese por meio do silenciamento transcricional de genes supressores tumorais. No entanto, a hipometilação global também é evento associado à transformação maligna do tecido (LAIRD; JAENISCH, 1996; JONES; LAIRD, 1999; BAYLIN; HERMAN, 2000), o que indica que tanto a hipermetilação quanto a hipometilação substancialmente contribuem para a iniciação e progressão do câncer (CUNNUYER, 2015). A hipometilação do DNA é um evento que ocorre mais amplamente no genoma da célula tumoral, como em sequências repetitivas, atuando como um promotor do

desenvolvimento tumoral devido ao aumento da instabilidade genômica (GAUDET et al., 2003). Neste sentido, a diminuição na expressão gênica de DNMT3A causa a perda do padrão metilado de sequência pericentromérica da região satélite 2 em glioblastoma (FANELLI et al., 2008). No caso da isoforma DNMT3B, a perda da expressão gênica *in vitro* promoveu uma diminuição no padrão de metilação global do DNA, associadas a anormalidades cromossômicas como poliploidias e aneuploidias. Além disso, a maioria da população de células tornou-se imortalizada, pois continuaram a se proliferar após a senescência replicativa das células controle (DODGE et al., 2005). Embora com número amostral pequeno, nossos resultados mostraram expressão reduzida das DNMTs no processo inflamatório de gastrite crônica associada à infecção pela *H. pylori*, que deve ser melhor investigada quanto ao seu envolvimento na cascata tumorigênica do estômago.

Considerando o papel das DNMTs no silenciamento gênico, tem-se observado correlação negativa entre sua expressão em relação aos seus genes alvos silenciados por hipermetilação do promotor (RAHMAN et al., 2015). Contudo, no presente estudo observaram-se apenas correlações positivas entre as expressões dos genes *SOCS1* e *DNMT1* e do *RPRM* e *DNMT3A* e *DNMT3B*, evento que pode ter sido casual devido ao número reduzido de indivíduos avaliados.

O presente estudo não evidenciou alteração na expressão de genes supressores tumorais e das DNMTs avaliados em pacientes com gastrite crônica em decorrência da infecção pela *H. pylori*, assim sugerindo novas investigações sobre o envolvimento dessa bactéria em vias epigenéticas como o padrão de metilação global e a expressão de genes supressores em lesões que participam da cascata de progressão do câncer gástrico.

## VI. CONCLUSÕES

Considerando o número amostral avaliado, os resultados apresentados nos permitem as seguintes conclusões:

- a- Em pacientes com gastrite crônica, a infecção pela bactéria *H. pylori* e sua erradicação não promoveram alteração significativa na expressão do RNAm dos supressores tumorais *SOCS1*, *RPRM* e *RUNX3*, e das *DNMTs*, que de modo geral apresentam expressão reduzida;
- b- A expressão do RNAm dos genes supressores e das *DNMTs* avaliados não foram associadas aos fatores de risco idade, sexo, tabagismo, etilismo e genótipo bacteriano *cagA*;
- c- A expressão reduzida das *DNMTs* independente da infecção pela *H. pylori* e a ausência de correlação negativa não permite sugerir que a expressão dos genes supressores tumorais esteja reduzida por hipermetilação do DNA em consequência da infecção.

## V. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. et al. Mahainine restores *RASSF1A* expression by down-regulating DNMT1 and DNMT3B in prostate cancer cells. **Mol Can**, v. 12, p. 1-12, 2013.
- AMIEVA, M.R.; EL-OMAR, E.M. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. **Gastroenterology**, v.134, p.306-323, 2008.
- ATHERTON, J.C. et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem**, v. 270, p. 17771-17777, 1995.
- BACKERT, S.; CLYNE, M.; TEGTMEYER, N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 28, 2011.
- BALKWILL, F.R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol**, v.22, p.33-40, 2012.
- BALMAIN, A. Cancer new-age tumour suppressors. **Nature**, v. 417, p. 235–237, 2002.
- BAMFORD, K. B. et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. **Gastroenterology**, v. 114, n. 3, p. 482–492, 1998.
- BANATVALA, N. et al. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. **J Infect Dis**, v. 168, p. 219-221, 1993.
- BASSO, D. et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms. **Gastroenterology**, v. 135, p. 91-99, 2008.
- BARNIE, P.A. et al. CpG-oligodeoxynucleotides suppress the proliferation of A549 lung adenocarcinoma cells via toll-like receptor 9 signaling and upregulation of Runt-related transcription factor 3 expression. **Biomed Rep**, v. 2, n. 3, p. 374-377, 2014.
- BAUER, B.; MEYER, T.F. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. **Ulcers**, v. 2011, article ID 340157, 23 páginas, 2011.
- BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet**, v. 16, p. 168–174, 2000.
- BAYLIN, S.B., OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer**, v. 6, p. 107–116, 2006.
- BELINSKY, S. A. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 707–717, 2004.
- BERNAL, C. et al. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, p. 6264-6269, 2008.

- BIGEY, P. et al. Transcriptional regulation of the human DNA Methyltransferase (dnmt1) gene. **Gene**, v. 242, p. 407-418, 2000.
- BODGER, K.; CRABTREE, J.E. Helicobacter pylori and gastric inflammation. **Br Med Bull**, v. 54, p. 139-150, 1998.
- BURKE, W.M. et al. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. **Oncogene**, v. 20, p 7925–7934, 2001.
- CADAMURO, A.C.T. Expressão gênica e proteica e cinética celular no processo inflamatório induzido pela Helicobacter pylori antes e após terapia de erradicação. 2014. 150 f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biologia, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2014.
- CADAMURO, A.C.T. et al. Effect of Helicobacter pylori Eradication on TLR2 and TLR4 Expression in Patients with Gastric Lesions. **Mediators of Inflamm**, v. 2015, article ID 481972, 9 pages, 2015.
- CANNUYER, J. et al. A gene expression signature identifying transient DNMT1 depletion as a causal factor of cancer-germline gene activation in melanoma. **Clin Epigenetics**, v. 4, p. 1-17, 2015.
- CAO, X. Y. et al. DNA methyltransferase3a expression is an independent poor prognostic indicator in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 25, p. 8201-8208, 2014.
- CHAN, A. O. et al. Eradication of Helicobacter pylori infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation. **Gut**, v. 55, n. 4, p. 463–8, 2006.
- CHEN, T. et al. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a e Dnmt3b. **Mol Cell Biol**. V. 23, n. 16, p. 5594-5605, 2003.
- CHEN, Y. et al. Runx3 suppresses gastric cancer metastasis through inactivation of MMP9 by upregulation of TIMP-1. **Int J Cancer**, v. 129, n. 7, p. 1586-1598, 2011.
- CHEN, L.F. Tumor suppressor function of RUNX3 in breast cancer. **J Cell Biochem**, v. 113, p. 1470–1477, 2012.
- CHEN, F. et al. RUNX3 Suppresses Migration, Invasion and Angiogenesis of Human Renal Cell Carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 2, e56241, 2013.
- CHENG, A. S. et al. Helicobacter pylori causes epigenetic dysregulation of FOXD3 to promote gastric carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 144, p. 122- 33, 2013.
- CHIBA, T.; MARUSAWA, H.; USHIJIMA, T. Inflammation-Associated Cancer Development in Digestive Organs: Mechanisms and Roles for Genetic and Epigenetic Modulation. **Gastroenterology**, 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.

- COONEY, R. N. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. **Shock**, v. 17, p. 83–90, 2002.
- CORREA, P. Human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Res**, v.48, p.3554-3560, 1988.
- CORVALÁN, A. Bases epigenéticas del cáncer gástrico: oportunidades para la búsqueda de nuevos biomarcadores. **Rev Med Chile**, v. 141, p. 1570-1577, 2013.
- COSTELLO, J. F. et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. **Nat Genet**, v. 24, p. 132–138, 2000.
- COVER, T.L.; BLANKE; S.R. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 320-332, 2005.
- DIXON, M.F. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol**, v. 10, p. 1161-81, 1996.
- DODGE, J.E. et al. Inactivation of *DNMT3B* in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. **J Biol Chem**, v. 280, n. 18, p. 17986-179991, 2005.
- ETOH, T. et al. Increased DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Protein Expression Correlates Significantly with Poorer Tumor Differentiation and Frequent DNA Hypermethylation of Multiple CpG Islands in Gastric Cancers. **Am J Pathol**, v. 164, n. 2, 689-699, 2004.
- FAN, X.Y. et al. Association between RUNX3 promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis. **BMC Gastroenterol**, v. 11, n. 92, p. 1-9, 2011.
- FANELLI, M.; CAPRODOSSI, S. Loss of pericentromeric DNA methylation pattern in human glioblastoma is associated with altered DNA methyltransferases expression and involves the stem cell compartment. **Oncogene**, v. 27, p. 358–365, 2008.
- FERRONE, C.; DRANOFF, G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. **J Clin Oncol**, v.28, p.4045-4051, 2010.
- FIEDOREK, S.C. et al. Factors influencing the epidemiology of Helicobacter pylori infection in children. **Pediatrics**, v. 88, p. 578-582, 1991.
- FORMAN, D.; BURLEY, V.J. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol**, v. 20, p. 633–649, 2006.
- FUENTES-PANANÁ, E; CAMORLINGA-PONCE, M.; MALDONADO-BERNAL, C. Infección, inflamación y cáncer gástrico. **Salud Publica Mex**, v.51, p.427-433, 2009.
- GAUDET, F. et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. **Science**, v. 300, p. 489–492, 2003.

- GIAMBRA, V. et al. NOTCH1 promotes T cell leukemia-initiating activity by RUNX-mediated regulation of PKC- $\theta$  and reactive oxygen species. **Nat Med**, v. 18, p. 1693–1698, 2012.
- HACKETT, J.A.; SURANI, M.A. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 268, p. 1-7, 2013.
- HAN, J.; ULEVITCH, R.J. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. **Nat Immunol**, v. 6, n. 12, p. 1198-1205, 2005.
- HARTGRINK et al. Gastric cancer. **Lancet**, v. 374, p. 477-490, 2009.
- HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **J Gastroenterol**, v.44, p.239-248, 2009.
- HOFMAN, V.J. et al. Gene expression profiling in human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. **Modern Pathology**, v.20, p. 974–989, 2007
- HUANG, F.Y. et al. *Helicobacter pylori* Induces Promoter Methylation of E-cadherin via Interleukin-1 $\beta$  Activation of Nitric Oxide Production in Gastric Cancer Cells. **Cancer**, v 118, n. 20, p. 4969-4980, 2012.
- ILVER, D. et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998, 279:373–377.
- IMAMURA, Y. et al. RUNX3 promoter region is specifically methylated in poorly-differentiated colorectal cancer. **Anticancer Res**, v. 25, n. 4, p. 2627-2630, 2005.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Schistosomes, Liver Flukes, and *Helicobacter pylori*. Lyon: IACR, 1994.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>>. Acesso em: 16/02/2016.
- ISHIJIMA, N. et al. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. **J Biol Chem**, v. 286, p. 25256–25264, 2011.
- JIANG, J. et al. Polymorphisms of the DNA Methyltransferase 1 Associated with Reduced Risks of *Helicobacter pylori* Infection and Increased Risks of Gastric Atrophy. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. 1-6, 2012.
- JONES, P.A.; LAIRD, P.W. Cancer epigenetics comes of age. **Nat Genet**, v. 21, p. 163–167, 1999.
- JORGE, Y.C.; DUARTE, M.C.; SILVA, A.E. Gastric cancer is associated with NOS-954G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population. **BMC Gastroenterol**, v. 10, n. 64, p. 1-8, 2010.

JURKOWSKA, R.Z.; JURKOWSKI, T.P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **Chembiochem**, v. 12, p. 206-222, 2011.

KAISE, M. et al. CpG Island Hypermethylation of Tumor-Suppressor Genes in *H. pylori* - Infected Non-Neoplastic Gastric Mucosa Is Linked with Gastric Cancer Risk. **Helicobacter**, n. 13, p. 35-41, 2008.

KANAI, Y.; HIROHASHI, S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 12, p. 2434-2442, 2007.

KANDA, N. et al. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with surviving expression in gastric cancer cells. **Oncogene**, v. 23, p. 4921-4929, 2004.

KIM, M. H. et al. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Genes Are Silenced by DNA Hypermethylation and Histone Deacetylation and Regulate Response to Radiotherapy in Cervical Cancer Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 4, ID e0123133, p. 1-14, 2015.

KUSTERS, J.G.; VANVLIET, A.H.M.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 449-490, 2006.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **J Bras Pat Med Lab**, v.39, p.335-342, 2003.

LAIRD, P.W.; JAENISCH, R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. **Annu Rev Genet**, n. 30, p. 441-464, 1996.

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.

LAWRENCE, T. et al. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

LEONHARDT, H. et al. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. **Cell**, v. 71, p. 865-874, 1992.

LEUNG, W. K. et al. Effects of *Helicobacter pylori* Eradication on Methylation Status of *E-Cadherin* Gene in Noncancerous Stomach. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 10, p. 3216-3221, 2006.

LI, Q.L. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. **Cell**, v. 109, n. 1, p. 113-124, 2002.

LI, Q.L. et al. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 314, n. 1, p. 223-228, 2004.

LI, W.Q.; PAN, K.F.; ZHANG, Y.; DONG, C.X.; ZHANG, L.; MA, J.L.; ZHOU, T.; LI, J.Y.; YOU, W.C. *RUNX3* methylation and expression associated with advanced precancerous gastric lesions in a Chinese population. **Carcinogenesis**, v. 32, p. 406-410, 2011

- LIN, F.C. et al. RUNX3-mediated transcriptional inhibition of Akt suppresses tumorigenesis of human gastric cancer cells. **Oncogene**, n. 31, p. 4302-4316, 2012.
- LIN, R.K. et al. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 55, p. 205–213, 2007.
- LINZ, B., BALLOUX, F.; MOODLEY, Y. Moodley. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 915–918, 2007.
- LIU, Z. et al. *Helicobacter pylori* CagA inhibits the expression of RUNX3 via Src/MEK/ERK and p38 MAPK pathways in gastric epithelial cell. **J Cell Biochem**, v. 113, p. 1080-1086, 2012.
- LIU, Z. et al. RUNX3 regulates vimentin expression via miR-30a during epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer cells. **J Cell Mol Med**, v. 18, n. 4, p. 610-623, 2014.
- 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.
- LU, X.X. et al. Stepwise Cumulation of *RUNX3* Methylation Mediated by *Helicobacter pylori* Infection Contributes to Gastric Carcinoma Progression. **Cancer**, p. 5507-5517, 2012.
- LUO, J. et al. Loss of Reprimo and S100A2 Expression in Human Gastric Adenocarcinoma. **Diagnostic Cytopathology**, v. 39, n. 10, p. 752-757, 2011.
- MABE, K. et al. Does *Helicobacter pylori* eradication therapy for peptic ulcer prevent gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 15, p. 4290-4297, 2009.
- MAEKITA, T. et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. **Clin Cancer Res**, v. 12, p. 989-995, 2006.
- MEDSCAPE. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/176938-treatment>>. Acesso em: 04/02/2016.
- MIZUNO, S. et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. **Blood**.v. 97, p. 1172–1179, 2001.
- MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v. 22, p. 6479–6483, 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.
- MOROCO, J. *Análise Estatística de dados – com utilização do SPSS*, Edições Sílabo, Lisboa, pág. 36, 2003.

MORRIS, M. R. et al. Identification of Candidate Tumour Suppressor Genes Frequently Methylated in Renal Cell Carcinoma. **Oncogene**, v. 29, n. 14, p. 2104-2117, 2010.

MUOTIALA, A. et al. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. **Infect Immun**, v. 60, n. 4, p. 1714-1716, 1992.

NA, H. K.; WOO, J. H. Helicobacter pylori Induces Hypermethylation of CpG Islands Through Upregulation of DNA Methyltransferase: Possible Involvement of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 4, 259-264, 2014.

NAGAI, H. et al. Combined hypermethylation and chromosome loss associated with inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas. **Cancer Lett**, v. 186, p. 59–65, 2002.

NAKA, T. et al. SOCS1, Negative regulation of cytokine and TLR signalings by SOCS and others. **Adv Immunol**, v. 87, p. 116–122, 2005.

NAKAGAWA, R. et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 677-687, 2002.

NAKAJIMA, T. et al. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. **Int J Cancer**, v. 124, p. 905-910, 2009.

NAKANO, K.; BOYLE, D. L.; FIRESTEIN, G. S. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. **J Immunol**, v. 190, n. 3, 1297-1303, 2013.

NANJO, S. et al. Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past *H. pylori* infection. **Gastric Cancer**, v.15, p. 382-388, 2012

NARAZAKI, M. et al. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 13130–13134, 1998.

NARDONE, G.; COMPARE, D. Epigenetic alterations due to diet and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 2, p. 243-248, 2008.

NEVADUNSKY, N.S. et al. RUNX3 protein is overexpressed in human epithelial ovarian cancer, **Gynecol Oncol**, v. 112, n. 2, p. 325-330, 2009.

OHKI, R. et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. **J Biol Chem**, v. 275, p. 22627-30, 2000.

OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247–257, 1999.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nat Genet**, v. 19, p. 219-220, 1998.

- OLIVEIRA, J.G.; SILVA, A.E. Polymorphisms of the *TLR2* and *TLR4* genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 11, p. 1235-1242, 2012.
- OLIVEIRA, L. H. et al. Potential roles of microRNA-29a in the molecular pathophysiology of T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Sci**, v. 106, n. 10, p. 1264-1277, 2015.
- OOKI, A. et al. DNA damage-inducible gene, Reprimo functions as a tumor-suppressor and is suppressed by promoter methylation in gastric cancer. **Mol Cancer Res**, v.11, n. 11, p. 1362-1374, 2013.
- OSHIMO, Y. et al. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. **Int J Cancer**, v. 112, p. 1003-1009, 2004.
- OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A.; NAGASE, H. RUNX Family participates in the regulation of p53-dependent DNA damage response. **Int J Genomics**, v. 2013, p. 271347, 2013.
- PARDO, A.; SELMAN, M. MMP-1: the Elder of the Family. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 2, p. 283-288, 2005.
- PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G. D.; VANDERSTEEN, D. P. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v. 325, n. 16, p. 1127– 1131, 1991.
- PENG, Z. et al. RUNX3 inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and reduces the angiogenesis, growth, and metastasis of human gastric cancer. **Clin. Cancer Res**, v. 12, p. 6386–6394, 2006.
- PERRI, F. et al. Aberrant DNA Methylation in Non-Neoplastic Gastric Mucosa of H. Pylori Infected Patients and Effect of Eradication. **Am J Gastroenterol**, v. 102, p. 1361-1371, 2007.
- PERRY, S. et al. Gastroenteritis and transmission of Helicobacter pylori infection in households. **Emerg Infect Dis**, v.12, p. 1701-1708, 2006.
- PETERSON, E.J.; BÖGLER, O.; TAYLOR, S.M. p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. **Cancer Res**, v. 63, p. 6579-6582, 2003.
- PIAZUELO, M. B.; EPPLEIN, M.; CORREA, P. Gastric Cancer: An Infectious Disease. **Infect Dis Clin N Am**, v.24, p.853-869, 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 Communication and Signaling**, v. 11, n. 77, p. 2-14, 2013.
- QU, Y. et al. Overexpression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b significantly correlates with retinoblastoma tumorigenesis. **Am J Clin Pathol**, v. 134, p. 826–834, 2010.
- QU, Y.; DANG, S.; HOU, P. Gene methylation in gastric cancer. **Clin Chim Acta**, v. 424, p. 53-65, 2013.

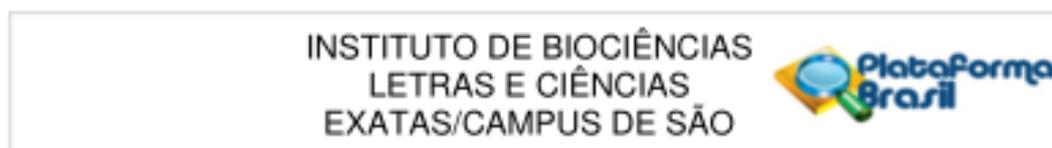
- RAD, R. et al. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. **J Immunol**, v. 168, p. 3033–3041, 2002.
- RAHAMAN, S.O. et al. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. **Oncogene**, v. 21, p.8404–13, 2002.
- RAHMAN, W.F.W. et al. Overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in astrocytic tumour and its correlation with O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 6, p. 6095-6106, 2015.
- RASSOW, J. Helicobacter pylori vacuolating toxin A and apoptosis. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 26mona, 2011.
- RAZIN, A.; CEDAR, H. DNA methylation and embryogenesis. In: Jost JP, Saluz HP, editors. *DNA methylation. Molecular and biological significance*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag, 1993, p. 343–357.
- REDIG, A.J.; McALLISTER, S.S. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. **J Intern Med**, v. 274, p. 113–126, 2013.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, p. 1089-1093, 2001.
- RHEAD, J.L. et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric câncer. **Gastroenterology**, v. 133, p. 926-936, 2007.
- RIMBARA, E.; FISCHBACH, L.A.; GRAHAM, D.Y. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 8, p. 79-88, 2011.
- ROSSI, A.F.T. Efeito do tratamento da *H. pylori* na expressão de citocinas e microRNAs associados ao processo inflamatório. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biologia, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2015.
- ROULEAU, J.; MacLEOD, A.R.; SZYF, M. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 270, p. 1595-1601, 1995.
- RUGGE, M. et al. OLGA staging for gastritis: a tutorial. **Dig Liver Dis**, v. 40, n. 8, p. 650-658, 2008.
- SCHNEIDER, B. G. et al. Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric câncer. **Int J Cancer**, v. 127, p. 2588-2597, 2010.
- SCHOOFS, T.; BERDEL, W.E.; MILLER-TIDOW, C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 28, p. 1–14, 2014.
- SHIN, C. M. et al. Role of *Helicobacter pylori* infection in aberrant DNA methylation along multistep gastric carcinogenesis. **Cancer Sci**, v. 101, n. 6, p. 1337-1346, 2010.

- SITAS, F.; YARNELL, J.; FORMAN, D. Helicobacter pylori infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. **Gut**, v. 33, p. 1582, 1992.
- SO, K. et al. Quantitative assessment of RUNX3 methylation in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia using a DNA microarray. **Pathol Int**, v. 56, p. 571–575, 2006.
- SUBRAMANIAM, M.M. et al. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, p. 315–331, 2009.
- TABY, R.; ISSA, J.P. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin**, v. 60, p. 376–392, 2010.
- TAKAHASHI, T. et al. Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies. **Int J Cancer**, v. 115, p. 503–510, 2005.
- TAN, S.; TOMPKINS, L. S.; AMIEVA, M. R. Helicobacter pylori usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, e1000407 (1-13), 2009.
- TANG, Y. A. T. et al. Deregulation of p53 and RB Transcriptional Control Leads to Overexpression of DNA Methyltransferases in Lung Cancer. **J Cancer Res Pract**, v. 1, n. 1, p. 14-27, 2014.
- THOMAZINI, C. M. et al. Epigenetic inactivation of CDH-1, SOCS-1 and COX-2 by CpG island. Hypermethylation in chronic gastritis. In: 11<sup>th</sup> Regional Meeting of Biomedicine, Botucatu, 2008. Anais eletrônicos J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. V.14, n.4, p.752-814, 2008. Disponível em: <[http://www.jvat.org.br/full/n-2008/volume\\_14/number\\_4/11th\\_regional\\_meeting\\_of\\_biomedicine/b-abstracts\\_16-30/30-11th\\_regional\\_meeting\\_14\\_1\\_2008.htm](http://www.jvat.org.br/full/n-2008/volume_14/number_4/11th_regional_meeting_of_biomedicine/b-abstracts_16-30/30-11th_regional_meeting_14_1_2008.htm)>. Acesso em: 08 nov. 2015.
- TO, K. F. et al. Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. **Br J Cancer**, v. 91, p. 1335-1341, 2004.
- TSAI, M.Y. et al. A mitotic lamin B matrix induced by ranGTP required for spindle assembly. **Science**, v. 311, p. 1887-93, 2006.
- TSUNEMATSU, T. et al. RUNX3 Has an Oncogenic Role in Head and Neck Cancer. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, e589, 2009.
- USHIJIMA, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 223–231, 2005.
- USHIJIMA, T.; HATTORI, N. Molecular pathways: involvement of Helicobacter pylori-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. **Clin Cancer Res**, v. 18, p. 923–929, 2012.
- VOON, D.C. et al. Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity. **Stem Cells**, v. 30, p. 2088–2099, 2012.

- WANG, F. et al. *Helicobacter pylori* infection predicts favorable outcome in patients with gastric cancer. **Current Oncology**, v. 20, n. 5, p. e388-e395, 2013.
- WAKI, T. et al. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. **Oncogene**, v. 22, n. 26, p. 4128-4133, 2003.
- WEN, S.; MOSS, S.F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, v.282, p.1-8, 2009.
- WESSLER, S.; GIMONA, M.; RIEDER, G. Regulation of the actin cytoskeleton in *Helicobacter pylori*-induced migration and invasive growth of gastric epithelial cells. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 27, 2011.
- WOOD, R.D. DNA repair in eukaryotes. **Annu Ver Biochem**, v. 65, p. 135-167, 1996.
- WOOLF, C. et al. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis, **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, n. 100, p. 7731–7736, 2003.
- WROBLEWSKI, L.E., PEEK JR, R.M. Targeted disruption of the epithelial-barrier by *Helicobacter pylori*. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 29, 2011.
- YANG, J. et al. Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. **Mol Med Rep**, v.4, n. 6, p. 1139-1143, 2011.
- 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, n. 3, e33030-e33030 (1-12), 2012.
- YODER, J.A. et al. DNA methyltransferases in mouse tissues and cells. Studies with a mechanism-based probe. **J Mol Biol**, n. 270, p. 385–395, 1997.
- YOSHIKAWA, H. et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/ STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. **Nat Genet**, v. 28, p. 29–35, 2001.
- YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p. 798–809, 2009.
- ZHANG, X. et al. Upregulation of miR-572 transcriptionally suppresses SOCS1 and p21 and contributes to human ovarian cancer progression. **Oncotarget**, v. 6, n. 17, p. 15180-15193, 2015.

## VI. ANEXOS

### Anexo 1: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito da infecção pela *Helicobacter pylori* na metilação e expressão de genes em lesões gástricas.

**Pesquisador:** Ayla Blanco Poltronieri

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 33508114.3.0000.5466

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

**Patrocinador Principal:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 738.505

**Data da Relatoria:** 01/08/2014

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa da grande área Ciências Biológicas que pretende avaliar o efeito da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* na metilação e expressão dos genes RUNX3, RPRM e SOCS1 envolvidos no processo inflamatório e na cascata tumoral gástrica antes e após a terapia de erradicação da bactéria. Será realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana, Ibilce-UNESP, utilizando-se de amostras já armazenadas no laboratório em decorrência de estudo prévio (Parecer CEP Ibilce/UNESP nº 030/10), em que foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de todos os participantes, cuja cópia foi anexada ao projeto de pesquisa. Vale ressaltar que neste projeto anterior já estava previsto o armazenamento das amostras e o uso em pesquisas futuras.

Serão utilizadas cerca de 52 amostras de RNA e DNA coletadas para estudo prévio pelos Serviços de Endoscopia do Hospital de Base e do Hospital João Paulo II, ambos em São José do Rio Preto. Tais amostras são provenientes de indivíduos adultos de ambos os sexos, sendo 20 com diagnóstico negativo para *H. pylori* e 32 com diagnóstico positivo, além de 4 amostras de mucosa normal. Também foram obtidas informações por meio de questionários sobre identificação, histórico familiar de lesões gástricas ou câncer, tabagismo, etilismo dentre outras, cuja cópia está anexada ao projeto. Todas as amostras serão referidas por código resguardando a

**Endereço:** CRISTOVAO COLOMBO 2265  
**Bairro:** JARDIM NAZARETH **CEP:** 15.054-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO  
**Telefone:** (17)3221-2428 **Fax:** (17)3221-2500 **E-mail:** iliane@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
LETRAS E CIÊNCIAS  
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 738.505

identificação dos indivíduos. Os resultados do estudo serão divulgados em reuniões científicas/congressos e encaminhados para publicação em revista especializada.

A pesquisadora solicita dispensa do TCLE, justificando que as amostras utilizadas no projeto foram colhidas anteriormente mediante TCLE com a aprovação pelo CEP-IBILCE e que seria inviável localizar todos os participantes da pesquisa para nova assinatura. Ressalta, ainda, que no TCLE utilizado em projeto anterior, estava previsto o armazenamento das amostras e possível uso em projetos futuros.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o efeito da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* na metilação e expressão dos genes RUNX3, RPRM e SOCS1 envolvidos no processo inflamatório e na cascata tumoral gástrica antes e após a terapia de erradicação da bactéria.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos, uma vez que utilizará amostras armazenadas e obtidas para projeto anterior, já aprovado pelo CEP, e onde consta previsão de utilização em projetos futuros.

O risco com constrangimento pela divulgação dos dados em eventos científicos praticamente não existe, pois os pacientes serão identificados por meio de códigos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está bem apresentado com boa fundamentação teórica, bem justificado, definição clara dos objetivos e metodologia detalhada, explicitando o número de participantes, a forma de obtenção das amostras e análise dos dados.

As amostras que serão utilizadas são provenientes de trabalho realizado anteriormente, o qual teve aprovação por este CEP.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A pesquisadora solicita dispensa do TCLE, apresentando como justificativa o fato de que, no projeto anterior, quando as amostras foram obtidas, já constava a previsão de que elas seriam utilizadas em estudos futuros e, também, pela inviabilidade em localizar os participantes da pesquisa para nova assinatura.

**Recomendações:**

Recomento a aprovação do projeto, considerando corretas as justificativas para dispensa do TCLE.

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265  
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-2428 Fax: (17)3221-2500 E-mail: lilane@bilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
LETRAS E CIÊNCIAS  
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 738.505

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomendo a aprovação, não apontando pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados semestralmente, contando a partir desta data.

SAO JOSE DO RIO PRETO, 05 de Agosto de 2014

---

Assinado por:  
Ana Carolina Conti e Silva  
(Coordenador)

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265  
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000  
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO  
Telefone: (17)3221-2428 Fax: (17)3221-2500 E-mail: iliane@bilce.unesp.br

**Anexo 2:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

**Título:** Expressão gênica e cinética celular no processo inflamatório induzido pela *Helicobacter pylori* antes e após terapia de erradicação.

**Pesquisador responsável:** Aline Cristina Targa Cadamuro – Departamento de Biologia IBILCE/Unesp.

A) para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório no estômago saudável e com lesões, os pesquisadores da Unesp de São José do Rio Preto, estão desenvolvendo uma pesquisa que poderá melhorar nosso conhecimento sobre essas lesões gástricas e, portanto, oferecer possibilidade de estratégias futuras de tratamento mais efetivo dessas lesões e prevenção da progressão ao câncer gástrico causado pela bactéria;

B) este estudo tem como objetivo avaliar se ocorrem mudanças na expressão do material genético (DNA) devido à presença ou não da bactéria *H. pylori* antes e após tratamento para erradicação. Esses resultados serão confirmados pelo estudo da expressão de proteínas específicas utilizando-se os blocos de parafina correspondentes armazenados no Serviço de Patologia do hospital;

C) será investigado se você apresenta infecção pela bactéria *H. pylori*, que geralmente é responsável pelo processo de inflamação do estômago;

D) para a realização do estudo serão coletados 5 ml de sangue, utilizando material descartável, feita por profissional qualificado no Setor de Coleta do Ambulatório do Hospital de Base;

E) serão obtidos pequenos fragmentos (biópsias) da parede do estômago com característica alterada como inflamação (gastrite) ou outras lesões (úlceras e metaplasia) durante seu exame de endoscopia, solicitado por seu médico, no Serviço de Endoscopia do Hospital de Base de São José do Rio Preto;

F) não haverá nenhum risco adicional para sua saúde, pois a coleta do material será realizada pelos profissionais qualificados do hospital, sendo necessária a endoscopia independente deste projeto;

G) no caso de você apresentar infecção pela bactéria, seu médico irá prescrever o tratamento padrão e agendar data de retorno para nova endoscopia, onde serão coletados alguns fragmentos (biópsias) da parede do estômago para verificar se houve a eliminação da bactéria e da inflamação ou da lesão existente no estômago. Este material será novamente analisado

para verificar se após o tratamento houveram mudanças na expressão do material genético das células.

H) Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Será solicitado que forneça informações através de um questionário realizado durante uma entrevista antes do seu exame e também deverá autorizar a coleta de dados em seu prontuário médico e obtenção de cortes histológicos dos blocos parafinados para estudo de algumas proteínas. Todas as informações fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, sem sua identificação, pois o material coletado será identificado por código.

I) Os resultados serão utilizados apenas para divulgação em reuniões científicas, congressos e revistas científicas. Você será informado pelo seu médico dos resultados obtidos apenas se houver algum benefício que possa auxiliar seu tratamento ou prevenir a progressão da lesão que apresenta no estômago, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa.

J) Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. O material biológico cedido será armazenado no nosso laboratório e poderá ser utilizado para pesquisas futuras mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005.

Diante das explicações, se você concordar em participar deste projeto, coloque sua assinatura a seguir e forneça os dados solicitados.

Nome: \_\_\_\_\_ R.G. \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Usuário ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador

Nome: Aline Cristina Targa Cadamuro	Cargo/Função:
Fone:	Aluna de Doutorado
Instituição: IBILCE/UNESP	
Endereço: Rua Cristovão Colombo, 2265	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP	
São José do Rio Preto – fone 17-3221-2456/3221-2317	

**Anexo 3: Questionário do projeto: Expressão gênica e cinética celular no processo inflamatório induzido pela *Helicobacter pylori* antes e após terapia de erradicação.**

Responsáveis: Doutoranda Aline Cristina Targa Cadamuro, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva (Departamento de Biologia IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto-SP), Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo (FAMERP), Dr. Fausto Nasser (Hospital de Base).

**I. IDENTIFICAÇÃO**

Nome:.....Prontuário:.....

Data de nascimento:...../...../..... Sexo: ( ) F ( ) M

Grupo étnico: ( ) caucasóide ( ) negróide ( ) asiático

Endereço:.....Fone:.....

Cidade:.....Estado:.....

Profissão atual:..... tempo de atuação:.....

Profissão anterior:.....tempo de atuação:.....

**II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS**

- Consumo de bebida alcoólica: ( ) sim ( ) não ( ) ex-etilista

Há quantos anos:.....Tipo de bebida.....dose/dia.....

- Consumo de cigarro: ( ) sim ( ) não ( ) ex-fumante

Há quanto anos:.....Quantidade (un/dia):.....

- Doenças anteriores ou presentes:

( ) úlcera ( ) gastrite ( ) câncer (tipo:.....)

( ) outras (tipo:.....)

- Tratamentos anteriores ou em andamento: ( ) sim, período:..... ( ) não

Tipo:.....

- Uso de medicamentos: ( ) sim, período..... ( ) não

Tipo:.....

- Cirurgias anteriores: ( ) sim ( ) não

Tipo:.....

História de câncer ou outras doenças na família (grau de parentesco)

( ) câncer (tipo:.....) ( ) úlcera ( ) gastrite

( ) outras (tipo:.....)

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura