

MARISA CLAUDIA ALVAREZ DE PRAX

“Análise da influência da infecção por *Helicobacter pylori* no padrão de metilação de genes envolvidos na carcinogênese gástrica”

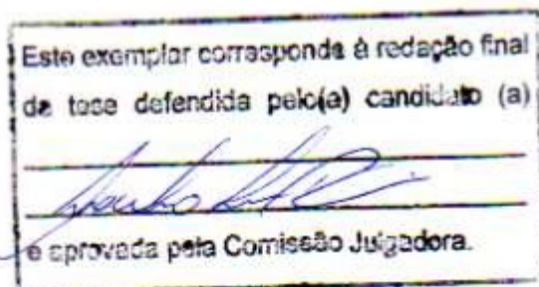
**CAMPINAS
2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARISA CLAUDIA ALVAREZ DE PRAX

**“Análise da influência da infecção por *Helicobacter pylori* no padrão
de metilação de genes envolvidos na carcinogênese gástrica”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. MARCELO LIMA RIBEIRO

**CAMPINAS,
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P891a Prax, Marisa Claudia Alvarez de, 1966-
Análise da influência da infecção por *Helicobacter pylori* no padrão de metilação de genes envolvidos na carcinogênese gástrica / Marisa Claudia Alvarez. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Lima Ribeiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Metilação. 3. Gastrite.
4. Neoplasias gástricas. I. Ribeiro, Marcelo Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of the influence of *Helicobacter pylori* infection on the methylation pattern of genes related to gastric carcinogenesis

Palavras-chave em Inglês:

Helicobacter pylori

Methylation

Gastritis

Stomach neoplasms

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Lima Ribeiro [Orientador]

José Andrés Yunes

Sérgio de Mendonça

Jose Murilo Robilotta Zeitune

Gífone Aguiar Rocha

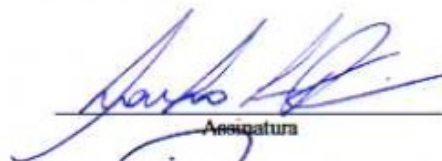
Data da defesa: 14-12-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

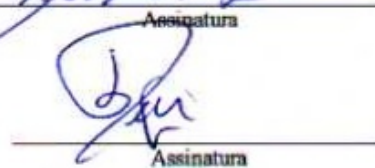
Campinas, 14 de dezembro de 2012 .

BANCA EXAMINADORA

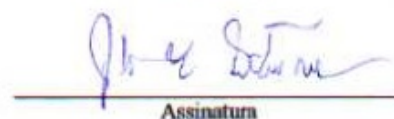
Prof. Dr. MARCELO LIMA RIBEIRO (Orientador)


Assinatura

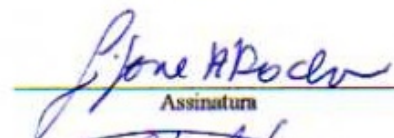
Prof. Dr. JOSÉ ANDRÉS YUNES.


Assinatura

Prof. Dr. JOSE MURILO ROBILOTTA ZEITUNE


Assinatura

Prof. Dr. GIFONE AGUIAR ROCHA


Assinatura

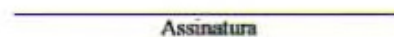
Prof. Dr. SÉRGIO DE MENDONÇA


Assinatura

Profª. Dra. EDI LUCIA SARTORATO


Assinatura

Prof. Dr. LÚCIO FÁBIO CALDAS FERRAZ


Assinatura

Profª. Dra. MARICILDA PALANDI DE MELLO.


Assinatura

*“Contra viento y marea desafiamos
la sombra a la luz de una idea
Con el alma encendida hay que andar
por la vida contra viento y marea
Y aunque el mar sea adverso y estemos
inmersos en aguas muy feas
Continuemos el viaje que a nuestro
coraje la fe lo acarrea...”*

*A Carlos,
pelo estímulo e generosidade de espírito.*

*Aos meus filhos, Santiago e Malena,
pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro, pela competência científica, acompanhamento do trabalho, assim como pelas oportunidades e desafios que possibilitaram meu desenvolvimento.

A Dra. Eliette Touati do Instituto Pasteur pela valiosa oportunidade de realizar estagio no seu laboratório e pela gentileza com que me recebeu.

Aos Professores. Dr. José Andrés Yunes e Dr. Sérgio de Mendonça pela atenção e disponibilidade em participar na pré-banca deste trabalho e pelas valiosas sugestões realizadas.

Aos Professores membros da banca examinadora, Dr. José Andrés Yunes, Dr. Sérgio de Mendonça, Dr. Jose Murilo Robilotta Zeitune, Dr. Gifone Rocha Aguiar, Dra. Edi Lucia Sartotato, Dra. Maricilda Palandi Mello e Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz, que aceitaram prontamente meu convite para participar na avaliação deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pela convivência e os bons momentos partilhados.

A Carlos, meu esposo, pelo incentivo, compreensão e encorajamento constantes.

Aos meus filhos, Santiago e Malena pela compreensão e ternura.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Fapesp pela concessão da bolsa de estudos.

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”
Antoine de Saint -Exupéry*

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

I-INTRODUÇÃO	1
II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1- <i>Helicobacter pylori</i>	5
1.1 Características microbiológicas	6
1.2 Morfologia.....	7
1.3 Fatores de virulência.....	8
2-EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA.....	15
3-TRANSMISSÃO.....	17
3.1 Transmissão gastro-oral.....	18
3.2 Transmissão oral-oral	18
3.3 Transmissão fecal-oral	19
4-PATOGENESE.....	19
4.1 Infecção aguda	21
4.2 Infecção crônica.....	22
4.2.1 Atrofia	23
4.2.2 Metaplasia intestinal	23
4.2.3 Câncer gástrico.....	24

5-MECANISMOS MOLECULARES	26
5.1 Mecanismos associados a inflamação.....	26
5.2 Mecanismos associados ao efeito direto da bactéria e seus produtos sobre as células gástricas	27
5.2.1 Alteração nas vias de sinalização.....	27
5.2.2 Modificações na adesão das células epiteliais.....	28
5.2.3 Alteração do balanço apoptose-proliferação celular	28
5.2.4 Estresse oxidativo e acúmulo de mutações	29
5.2.5 Falha no sistema de reparo ao DNA (<i>mismatch repair</i>).....	30
6-INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES	31
7-METILAÇÃO DO DNA.....	32
III-JUSTIFICATIVA	41
IV-OBJETIVOS	43
1-OBJETIVO GERAL	43
2-OBJETIVO ESPECIFICO.....	43
V-PACIENTES E MÉTODOS	45
1-METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A TRIAGEM INICIAL DO PERFIL DE METILAÇÃO	45
1.1 Cocultura	45
1.2 <i>Promoter Methylation Array</i>	45
1.3 <i>Gastric Cancer DNA Methylation PCR Array</i>	47
2-AVALIAÇÃO EM PACIENTES.....	49
2.1 Pacientes.....	49
2.2 Biopsias.....	50

2.3 Extração de DNA & análises por PCR	50
2.4 Tratamento com bissulfito de sódio.....	52
2.5 Análise do padrão de metilação por MSP – PCR.....	52
2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA	53
2.7 Quantificação da expressão por PCR em tempo real	54
2.8 Análise da instabilidade de microssatélites	55
3-ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>H. PYLORI</i> NA MODULAÇÃO DE <i>GATA-5</i> E <i>TFF1</i> <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	56
3.1 Análises <i>in vitro</i> : bactérias, cocultura e infecção	56
3.2 Análise <i>in vivo</i> : modelo animal.....	57
3.3 Análise da expressão gênica.....	57
4-ANÁLISE DOS DADOS	58
VI-RESULTADOS.....	59
1-TRIAGEM INICIAL DO PADRÃO DE METILAÇÃO	59
1.1 <i>Promoter methylation array</i>	59
1.2 <i>Gastric cancer DNA methylation PCR array</i>	60
1.2.1 Análise de amostras provenientes de pacientes	60
1.2.2 Análise de metilação apos cocultura celular.....	61
2-VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS.....	62
2.1 <i>HIC1</i>	62
2.2 <i>THBS1</i>	64
2.3 <i>GATA-4</i>	66
2.4 <i>GATA-5</i>	68

2.4.1 Avaliação da influência da infecção na regulação de <i>GATA-5</i> e <i>TFF1</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	70
2.4.1.1 Análises <i>in vitro</i> : cocultura	70
2.4.1.2 Análise <i>in vivo</i> : modelo animal	72
2.4.1.3 Análise <i>in vivo</i> : amostras de pacientes.....	72
2.5 <i>MLH1</i> e <i>MGMT</i>	74
3-ANÁLISE DA INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES (MSI)	77
VII-DISCUSSÃO	81
VIII-CONCLUSÕES.....	95
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
X- ANEXOS.....	121
1. Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	121
2. Artigo submetido ao World Journal of Gastroenterology	122
3. Artigo submetido ao Digestive Diseases and Sciences Journal.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

AGS: Adenocarcinoma ephitelial cell

C-Jun: C-jun N terminal kinase

cagA: Citotoxin associated gene

cagPAI: Pathogenicity island cag PAI

COX-2: Ciclooxygenase 2

ERK: Extracellular regulated MAP kinase

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GATA-4: Gata binding protein 4

GATA-5: Gata binding protein 5

HIC1: Hypermethylated in cancer 1

HpNap: *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein

IARC: International Agency for Research on Cancer

IgA: Immunoglobulin A

IL-10: Interleukin 10

IL-1 β : Interleukin 1 beta

IL-6: Interleukin 6

IL-8: Interleukin 8

iNOs: Inducible nitric oxide synthase

LPS: Lipopolysaccharides

MALT: Mucosa Associated Lymphoid Tissue

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MBD: Methyl- binding CpG domain

MGMT: O⁶methyl transferase

MLH1: DNA mismatch repair protein Mlh1

MMR: Mismatch repair system
MSI-H: Microsatellite instability high
MSI-L: Microsatellite instability low
MSI: Microsatellite instability
MSS: Microsatellite stavel
NER: Nucleotide excision repair
NF- κ B; Nuclear factor kappa beta
8OHdG: 8-hidroxideoxiguanosina
OMS: Organização Mundial da Saúde
RNAm: RNA mensageiro
SAH: S-adenosil homocisteina
SAM: S-adenosil L-metionina
SHP2: Protein-tyrosine phosphatase 2
SRC: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SS1: Sidney Strain 1
TFF1: Trefoil factor 1
THBS1: Thrombospondin1
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
vacA: Vacuolating citotoxin gene
WHO: World Health Organization

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Diagrama esquemático do procedimento do *Promoter Methylation Array*. (Página 42)

Figura 2. Genes metilados em amostra de câncer gástrico e gastrite crônica infectado com linhagem mais virulenta . (Página 56)

Figura 3. Genes metilados em amostras de gastrite crônica infectadas com linhagem mais e menos virulentas. (Página 57)

Figura 4. Níveis de RNAm de *HIC1* em biopsias gástricas de pacientes adultos e crianças. (Página 60)

Figura 5. Níveis de RNAm de *THBS1* em biopsias gástricas de pacientes adultos e crianças. (Página 62)

Figura 6. Níveis de RNAm de *GATA-4* em biopsias gástricas de pacientes adultos e crianças. (Página 64)

Figura 7. Níveis de expressão de *GATA-5* em biopsias gástricas de pacientes adultos e crianças. (Página 66)

Figura 8. Efeito *in vitro* da infecção por *H. pylori* na expressão de *GATA-5*. (Página 67)

Figura 9. Efeito *in vitro* da infecção por *H. pylori* na expressão de *TFF1*. (Página 67)

Figura 10. Efeito *in vivo* da infecção por *H. pylori* em camundongos na expressão de *GATA-5*. (Página 68)

Figura 11. Níveis de expressão de *TFF1* nas biopsias gástricas de crianças e adultos. (Página 69)

Figura 12. Níveis de expressão de *TFF1* em amostras de pacientes adultos e crianças infectados por *H. pylori* metilados na região promotora de *GATA-5*. (Página 69)

Figura 13. Níveis de expressão de *MLH1* nas biopsias gástricas de crianças e adultos. (Página 72)

Figura 14. Níveis de expressão de *MGMT* nas biopsias gástricas de crianças e adultos. (Página 72)

Tabela 1. Iniciadores para o detecção de *H. pylori*. (Página 47)

Tabela 2. Iniciadores para análise de metilação. (Página 48)

Tabela 3. Iniciadores humanos (*Homo sapiens*) para PCR em tempo real. (Página 50)

Tabela 4. Iniciadores para análise de MSI. (Página 51)

Tabela 5. Iniciadores camundongos (*Mus musculus*) para PCR em tempo real. (Página 53)

Tabela 6. Padrão de metilação na região promotora de *HIC1* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos e negativos e pacientes com câncer gástrico. (Página 59)

Tabela 7. Padrão de metilação na região promotora de *THBS1* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos e negativos e pacientes com câncer gástrico. (Página 61)

Tabela 8. Padrão de metilação na região promotora de *GATA-4* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos e pacientes com câncer gástrico. (Página 63)

Tabela 9. Padrão de metilação na região promotora de *GATA-5* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos e pacientes com câncer gástrico. (Página 65)

Tabela 10. Padrão de metilação nas regiões promotoras *MLH1* e *MGMT* em pacientes *H. pylori* positivos e negativos e pacientes com câncer gástrico. (Página 71)

Tabela 11. Instabilidade de Microssatélites. (Página 74)

Tabela 12. Resultados para os marcadores *BAT-25*, *BAT-26*, *D2S123*, *D17S50*. (Página 75)

RESUMO

A infecção por *Helicobacter pylori* é usualmente adquirida durante a infância e persiste durante toda a vida caso não seja tratada. A bactéria induz uma resposta inflamatória crônica, que está associada com alterações epigenéticas em oncogenes, genes supressores tumorais, e genes de reparo ao DNA. O Objetivo deste estudo foi avaliar a influência da infecção por *H. pylori* no padrão de metilação de genes envolvidos na carcinogênese gástrica. O perfil de metilação de 106 genes foi caracterizado em biopsias provenientes de 5 pacientes adultos (1 *Helicobacter pylori* negativo, 3 com gastrite crônica infectados com linhagens de diferentes toxicidades e 1 com câncer gástrico) e em DNA proveniente de células epiteliais gástricas infectadas por *H. pylori*. Para estas análises foram utilizados o *Promoter methylation array system*, e o *Gastric Cancer Methyl-Profiler DNA PCR Array*. Os resultados destas análises mostraram que 20 % dos genes se encontravam metilados na amostra de câncer gástrico e 16 % dos genes na amostra de gastrite crônica, entretanto a análise comparativa entre estas amostras mostrou que compartilhavam 8,5 % dos genes metilados. A análise de metilação após cocultura mostrou 12% dos genes metilados. Entre estes genes foram selecionados os seguintes: *THBS1*, *HIC1*, *GATA-4*, *GATA-5* e *MLH1* e *MGMT*, os quais foram avaliados em 239 amostras de biopsias gástricas, provenientes de 50 crianças e 97 adultos infetados ou não pela bactéria e de 92 adultos com câncer gástrico. O padrão de metilação foi avaliado por metilação PCR específica (MSP-PCR). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que não houve metilação da região promotora de *MLH1*, *MGMT* e *HIC1*, nas amostras provenientes de crianças, independente do estado de infecção. Os maiores níveis de metilação entre as amostras oriundas de adultos com gastrite crônica infectados foram observados em *GATA-4* e *THBS1* ($p < 0.05$), *MGMT* e *GATA-5* ($p < 0.001$). Nos pacientes com câncer gástrico os maiores níveis de metilação foram observados em *MGMT* e *GATA-5* ($p < 0.05$, $p < 0.001$, respectivamente). Foi verificado um aumento da instabilidade microssatélites nas amostras de câncer gástrico ($p < 0.03$) e o mesmo

foi associado com um aumento nos níveis de metilação de *MLH1* e sua consequente diminuição de

RNA_m. Foi realizado *in vitro* a análise de expressão de *GATA-5* e *TFF1* após cocultura de diferentes linhagens de *H. pylori* e células AGS, que revelou um aumento nos níveis de RNA_m de *GATA-5* as 6, 24 e 48h após infecção, e aumento de *TFF1* após 48h. Estes aumentos foram independentes da presença de cag PAI. O aumento na expressão de *GATA-5* foi observado em camundongos C57BL/6 após 6 meses de infecção. Foi observado *in vivo* que nas amostras metiladas em *GATA-5* apresentavam níveis diminuídos de *TFF1*. Estes resultados nos permitem sugerir que a metilação acontece precocemente na mucosa gástrica dos pacientes pediátricos e está associada com a infecção por *H. pylori*. Entretanto alguns *loci* como *MGMT* e *MLH1* a metilação parece ser dependente do tempo de infecção. Foi observado que os níveis de metilação aumentaram conforme a idade dos pacientes sugerindo que o maior tempo de exposição induz maiores níveis de metilação.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is usually acquired in childhood and persists into adulthood if untreated. It is known that the bacterium induces a chronic inflammatory response, which is associated with epigenetic alterations in oncogenes, tumor suppressor genes and DNA repair genes. The aim of this study was to evaluate the influence of *Helicobacter pylori* infection on the methylation pattern of genes related to gastric carcinogenesis. The methylation pattern of 106 genes was characterized in gastric biopsies samples from 5 adult patients (1 *H. pylori* negative, 3 chronic gastritis infected with strains of different toxicities, and 1 gastric cancer) and DNA extracted from co-cultured cells infected with *H. pylori*. These analyses were performed with *Promoter methylation array system*, and *Gastric Cancer Methyl-Profiler DNA PCR Array*. The results showed that 20 % of genes were methylated in gastric cancer mucosa and 16% were hyper methylated in the mucosa of the chronic gastritis patients. The comparative analysis showed that 8,5 % of genes were methylated in both samples. The results from the co culture showed that 12% of genes were methylated. Among them the following genes were selected: *THBS1*, *HIC1*, *GATA-4*, *GATA-5* e *MLH1* e *MGMT* and evaluated in 239 gastric biopsies samples from 50 children and 97 adults infected or uninfected by *H. pylori*, and 92 adults with gastric cancer. The methylation pattern was analyzed by methylation specific PCR (MSP-PCR). The results from pediatric samples showed no methylation for *MLH1*, *MGMT* and *HIC1* genes, independent of the infection status. Among the infected adults samples the higher levels of methylation were observed for *GATA-4* e *THBS1* ($p<0.05$), *MGMT* e *GATA-5* ($p<0.001$). Higher levels of methylation were observed for *MGMT* e *GATA-5* ($p<0.05$, $p<0.001$, respectively) in gastric cancer samples. It was observed an increase in microsatellite instability among gastric cancer samples, related to hyper methylation of *MLH1*. The expression levels of *GATA-5* and *TFF1* was analyzed *in vitro*. The results from infected cells showed an up regulation at 6, 24, and 48 for *GATA-5* and at 48 h for *TFF1*. This increase was independent of cagPAI status. In an animal model an up

regulation of *GATA-5* was observed after six months of infection. A decrease in *TFF1* mRNA levels was observed in infected children and adults samples methylated in *GATA-5* promoter region. These data suggest that promoter hyper methylation occurs in gastric mucosa of children in association with *H. pylori* infection, however for some loci as *MGMT* and *MLH1* this event seems to be dependent on the time of exposure. Furthermore it was observed an increase in methylation frequencies in adults samples compared to pediatric samples suggesting that the duration of the infection is related to methylation levels.

I-INTRODUÇÃO

Helicobacter pylori é o principal agente etiológico das infecções gastrointestinais em adultos e crianças, e tem sido implicado na patogênese de diversas doenças tais como: gastrite crônica ativa, úlcera péptica, carcinoma gástrico, e linfoma MALT. Na grande maioria das vezes a bactéria é adquirida durante a infância e uma vez estabelecida a infecção na mucosa gástrica, caso não seja tratada, persiste durante toda a vida do indivíduo. (Drumm, 1993; Drumm et al., 2004). A presença do *H. pylori* é responsável por desencadear uma cascata de eventos na mucosa gástrica que se inicia com a gastrite crônica, progride para gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e eventualmente o câncer gástrico (Correa, 1992).

Na mucosa gástrica do hospedeiro a infecção provoca uma resposta inflamatória, que inclui a infiltração por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, e linfócitos T e B. A resposta inflamatória se estabelece lentamente e persiste durante um longo período de tempo, fazendo-se crônica. Embora os sintomas não sejam tão graves quanto na inflamação aguda, a condição é persistente (Bayarsaihan, 2011). As células inflamatórias ativadas liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem induzir danos ao DNA e apoptose (Shimada et al, 1999). O ambiente inflamatório induzido pelo *H. pylori* atua como indutor e promotor da carcinogênese gástrica, ativando múltiplas vias oncogênicas (Correa & Houghton, 2007; Ding et al., 2010).

Dados epidemiológicos mostram que o câncer gástrico é a segunda causa de morte por câncer no Brasil e no mundo (Jemal et al., 2004; Jemal et al., 2011; INCA, 2012). Embora a incidência mundial da doença esteja declinando e o diagnóstico e o tratamento

tenham melhorado, menos de 20% dos pacientes sobrevivem mais do que 5 anos depois de confirmado o diagnóstico (Smith et al., 2006). Tem sido relatado que um dos mecanismos que contribui significativamente para o desenvolvimento do câncer são as alterações no padrão de metilação nas regiões promotoras de genes supressores tumorais e de protooncogenes (Franco et al, 2008).

A metilação do DNA é reconhecida como uma das mais importantes modificações epigenéticas, e entre os fatores associados encontra-se à inflamação crônica. Esta ocorre nos resíduos citosina nos dinucleotídeos CpG, os quais estão frequentemente organizados em ilhas CpG na região promotora de alguns genes (Roa et al., 2008). A metilação do DNA nestas regiões pode inibir a transcrição através de mudanças na estrutura da cromatina. Tais mudanças são mediadas pela interação das metil citosinas com complexos de proteínas que recrutam enzimas modificadoras de histonas (Esteller et al., 2002; Esteller et al., 2006).

Nas células cancerosas observam-se padrões alterados de metilação, tais como áreas de hipometilação no genoma e sítios hipermetilados, nas ilhas CpG nas regiões promotoras (Feimberg et al., 1983; Baylin et al., 1986). Com base nestes padrões têm surgido várias hipóteses associando a metilação do DNA com a carcinogênese (Laird, 1997). Assim, a amplificação de protooncogenes ou o silenciamento dos genes supressores tumorais, poderia quebrar o balanço que normalmente controla a proliferação celular e culminar em uma sucessão de eventos que desencadearia a carcinogênese. Assim, sabe-se que, a reversão da metilação libera a transcrição, que estava silenciada, e permite a expressão de protooncogenes, que se ativam, e induzem a proliferação celular (Narayanan et al., 2004, Robertson et al, 2005). Por outro lado, o aumento da metilação

em sítios não metilados previamente, como as regiões promotoras de genes supressores tumorais, acabam sendo silenciadas devido à inibição da transcrição e impedindo a supressão da proliferação celular (Wajed et al., 2001).

Desde a descoberta de *H. pylori* por Warren e Marshall em 1982 (Warren and Marshall, 1983), vários estudos demonstram uma associação significativa entre a infecção pela bactéria e o desenvolvimento de diversas doenças gástricas, incluindo o câncer gástrico (Parsonet et al., 1991; Yamagat et al., 2000). A infecção crônica por esta bactéria incrementa o risco de desenvolvimento de câncer gástrico em 5 a 6 vezes. O fato que a infecção induz modificações epigenéticas provê um elo entre o papel causal da infecção por *H. pylori* na carcinogênese gástrica e o profundo envolvimento das alterações epigenéticas no câncer gástrico. O câncer gástrico é uma doença onde a infecção, a inflamação crônica e as alterações epigenéticas encontram-se interconectadas (Ushijima & Hattori, 2012).

II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1-*Helicobacter pylori*

A bactéria hoje conhecida como *Helicobacter pylori*, tem sido objeto de intensas pesquisas desde seu primeiro cultivo a partir de uma biopsia gástrica em 1982. Desde o começo, este microrganismo tem provocado o interesse de diversos profissionais da área da saúde, incluindo pesquisadores na área da oncologia. A possibilidade de que uma bactéria pudesse causar gastrite, úlcera péptica e eventualmente câncer, era um conceito difícil de aceitar. Entretanto, a evidência do envolvimento de um microrganismo no desenvolvimento de úlcera, em animais de experimentação, já era de conhecimento dos pesquisadores desde o século anterior. Bizzozero, em 1893, detectou a presença de organismos espiralados, conhecidos como espiroquetas, nas glândulas gástricas e nas células parietais provenientes de estômagos caninos (Figura & Orderda, 1996).

Posteriormente, na década de 1940, foram identificadas espiroquetas em amostras gástricas de seres humanos, e a maioria delas parecia estar presente em pacientes com úlcera gástrica. Entretanto, o interesse dos pesquisadores em associar uma bactéria como agente causal de úlcera diminuiu devido aos relatos da literatura da época que destacaram uma provável associação entre a presença de vírus e úlcera péptica. Steer e colaboradores renovaram o interesse na associação entre o desenvolvimento de úlcera e a presença da bactéria em 1975, mas falharam no isolamento e identificação dos microrganismos observados (Heatley, 1995).

Finalmente, em 1982, Warren e Marshall relataram a presença de uma bactéria espiralada na mucosa gástrica de pacientes com úlcera péptica e gastrite crônica, evidenciando similaridades nas condições de crescimento, morfológicas e bioquímicas entre este microrganismo e os do gênero *Campylobacter*, dando-lhe a denominação de *Campylobacter like organism*. Posteriormente, o microrganismo recebeu a denominação de *Campylobacter pyloridis*, para logo depois ser corrigido gramaticalmente para *Campylobacter pylori* (Marshall & Goodwin, 1987). Trabalhos posteriores, entretanto, evidenciaram diferenças bioquímicas e moleculares entre esta bactéria e o gênero *Campylobacter*, e em 1989 foi reconhecida como pertencente a um novo gênero, *Helicobacter* (Goodwin et al., 1989) e foi designada *Helicobacter pylori*.

1.1 Características microbiológicas

H. pylori é um bacilo Gram negativo, de crescimento lento e microaerofílico. Apresenta mobilidade pela presença de quatro a seis flagelos uni ou bipolares. Sua principal característica bioquímica é a abundante produção da enzima urease, que tem um papel importante na fase inicial de colonização do epitélio gastrointestinal, já que a mesma produz a hidrólise da uréia, alterando deste modo o pH da mucosa gástrica, tornando-a mais adequada para sua sobrevivência. Esta enzima se tornou um importante marcador da presença da bactéria (Peterson & Graham, 1998).

1.2 Morfologia

O microrganismo existe em duas formas morfológicas diferentes, uma forma espiralada, considerada ativa, e a forma cocóide, considerada como uma provável estrutura de resistência em condições adversas. Em sua forma espiralada, a bactéria possui de 3 a 5 μm de comprimento e aproximadamente 0,5 μm de diâmetro. Esta morfologia é tida como a forma viável do microrganismo, por outro lado, a forma cocóide não é cultivável, mas é metabolicamente ativa já que acumula polifosfatos como reserva de energia (Cellini et al., 1994; Cole et al., 1997). A forma cocóide é a forma predominante em condições de incubação bacteriana por períodos prolongados na água, sugerindo que a infecção através da água seria possível, principalmente em países em desenvolvimento (Klein et al., 1991; Hulten et al., 1996).

A transformação da forma espiralada para a forma cocóide pode ser induzida pelo aumento na concentração de oxigênio, pH alcalino, aumento da temperatura, incubação prolongada, bem como tratamento do paciente com omeprazol ou antibióticos como amoxicilina (Kusters et al., 2006).

Embora a forma espiralada de *H. pylori* seja, normalmente, considerada como a responsável pela patogenicidade, ambas as formas podem ser encontradas no estômago e duodeno humano. A forma cocóide é encontrada aderida às células epiteliais gástricas severamente afetadas, e é prevalente nas margens dos tumores gástricos, sendo observada em 93% das biopsias de pacientes com adenocarcinoma. Entretanto, o papel da forma cocóide na patogênese bacteriana permanece incerto (Cole et al., 1997).

1.3 Fatores de virulência

Os fatores que permitem aos patógenos microbianos se estabelecerem são denominados como fatores de colonização, e normalmente contribuem para a patogenicidade bacteriana. No caso do *H. pylori*, a sobrevivência no ambiente gástrico é atribuída a características especiais, sendo a capacidade de colonizar a superfície do epitélio gástrico abaixo da camada de muco a de maior relevância (McGowan et al., 1996).

Alguns fatores de virulência do *H. pylori* relacionados à colonização gástrica, ao dano tecidual e à sobrevivência deste no hospedeiro, tais como flagelos, a enzima urease e algumas adesinas, já estão bem estabelecidos (Andersen et al., 2001; Kavermann et al., 2003).

A morfologia espiralada do *H. pylori* e os movimentos provocados pelos flagelos permitem a rápida travessia do lúmen do estômago e a penetração na mucosa. Os flagelos, que são essenciais para a mobilidade bacteriana, têm aproximadamente 30 µm de comprimento e 2,5 nm de espessura. A constituição dos mesmos apresenta a estrutura típica de bicamada fosfolipídica de membrana (Dunn et al., 1997). Estruturalmente são compostos de três elementos: o corpo basal, o gancho e o filamento. O filamento atua como propulsor e é formado por 2 subunidades de flagelina: FlaA e FlaB (Leying et al., 1992). *In vitro* foi observado que a mutação em *flaA* resulta no truncamento flagelar e numa diminuição da motilidade (Suerbaum et al., 1993).

H. pylori é um dos maiores produtores de urease entre as espécies bacterianas. A urease é uma das enzimas chaves na patogênese, e possui um peso

molecular de 550 KDa, apresentando três subunidades, UreA, UreB, e UreC. Esta enzima é necessária para que o *H. pylori* mantenha um microambiente de pH neutro ao redor da bactéria, hidrolisando a uréia da mucosa gástrica, resultando na produção de dióxido de carbono e amônia, responsável pela neutralização do pH, necessária para a sobrevivência no meio naturalmente ácido do estômago. A amônia resultante também é utilizada como fonte de nitrogênio para a síntese das proteínas necessárias para que ocorra a aderência bacteriana (Eaton et al., 1995). Além disso, a urease é fortemente imunogênica e quimiotóxica para os fagócitos (Harris et al., 1998; Mobley, 2001). Por outro lado, o *H. pylori* sobrevive com dificuldade em ambientes com pH ácidos e alcalinos, e foi demonstrado que o microrganismo possui a enzima *P type ATPase*, que catalisa a troca de NH_4^+/H^+ , sendo esta atividade responsável pela prevenção de uma alcalinização excessiva gerada pela hidrólise da ureia, catalisada pela enzima urease (Peterson & Graham, 1998).

Outra importante enzima isolada de *H. pylori* é a superóxido dismutase, que permite a sobrevivência da bactéria exposta a baixos níveis de oxigênio no seu ambiente microaerofílico e também frente às espécies reativas de oxigênio (EROs) como os ânions superóxidos liberados pelas células epiteliais, neutrófilos e macrófagos como parte da resposta de defesa do hospedeiro. Esta enzima é responsável pela quebra de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, evitando, deste modo, a morte bacteriana (Spiegelhalder et al., 1993; Seyler et al., 2001). A enzima catalase protege o microrganismo dos efeitos do peróxido de hidrogênio liberado pelos fagócitos. Tanto a catalase como a urease são excretadas

pelo *H. pylori* ao meio circundante e o protege da resposta imune humoral (Andersen et al., 2001).

A habilidade deste organismo em se unir especificamente ao epitélio gástrico é chamada de tropismo tecidual. Esta aderência ao epitélio facilita a colonização inicial, a persistência da infecção e a liberação de fatores de virulência nas células epiteliais do hospedeiro. Além disso, esta propriedade impede que o microrganismo seja removido pela secreção de muco ou pela mobilidade gástrica. Esta aderência é mediada por múltiplas proteínas de membrana como BabA, SabA, AlpA e HopZ e receptores presentes no epitélio gástrico (Guillemin et al., 2002). BabA (*Blood group antigen binding adhesin*) é uma das proteínas de membrana externa (OMP) melhor descrita em *H. pylori*. Esta proteína se une ao antígeno de Lewis Le^b presente na superfície das células epiteliais gástricas (Boren et al., 1993; Gerhard et al., 1999). A expressão variável das adesinas nas diferentes linhagens bacterianas explica a variação na aderência das diferentes linhagens de *H. pylori*, bem como as diferenças na disponibilidade de receptores específicos no hospedeiro. Tal fato sugere uma possível explicação para as diferenças observadas na susceptibilidade à infecção (Dunn et al., 1997; Peterson & Graham, 1998). Estudos relacionados à capacidade de aderência das diferentes linhagens de *H. pylori* provenientes de todas as partes do mundo sugerem que a adesina BabA tem evoluído em resposta aos padrões de glicosilação para permitir ao *H. pylori* adaptar-se e manter a sua colonização persistente (Aspholm-Hurting et al., 2004; Pohl et al., 2009).

O LPS pertence a uma família de glicolipídeos que são encontrados na parede celular das bactérias Gram-negativas, incluindo o *H. pylori*. O LPS, principalmente

através do lipídeo A, que é um dos constituintes, estimula a liberação de citocinas e possui propriedades endotóxicas. Entre outras ações do LPS podem ser incluídas a interferência com as células epiteliais gástricas, que pode levar à perda da integridade da camada mucosa, inibição da síntese de mucina, e estimulação da secreção de pepsinogênio. Apesar das propriedades toxigênicas, o lipídeo A de *H. pylori* é menos imunogênico que o mesmo lipídeo em outras bactérias Gram negativas, o que sugere uma adaptação do *H. pylori* para uma longa existência no estômago (Khamri et al., 2005). A presença da enzima mucinase provavelmente contribui para a ruptura da barreira mucosa e as fosfolipases digerem a membrana rica em fosfolipídios das células mucosas (Langton et al., 1992).

O *H. pylori* produz uma série de proteínas de superfície independentes do LPS, que possuem propriedades quimiotáticas para monócitos e neutrófilos, atraindo-os para a lâmina própria e ativando suas propriedades inflamatórias. Dentre estas proteínas incluem-se a proteína ativadora de neutrófilos HpNap, codificada pelo gene *napA* (Dunn et al., 1997), a qual foi mostrado *in vivo* que é capaz de atravessar o endotélio e promover a adesão de polimorfonucleares favorecendo a reação inflamatória (Polenghi et al., 2007).

O *H. pylori*, assim como outras bactérias patogênicas, causa danos aos tecidos através da liberação de toxinas. Nas últimas décadas foram identificados alguns genes desta bactéria relacionados ao desenvolvimento de doenças gástricas (Blaser et al., 1995).

O primeiro gene linhagem-específico identificado no *H. pylori* foi o gene *cagA* (*cytotoxin associated gene*), que está associado à progressão das doenças

gastrointestinais (Blaser et al., 1995; Censini et al., 1996). As linhagens *cagA*⁺ tendem a ser mais virulentas e a induzir níveis aumentados de algumas citocinas, como a IL-1 β e a IL-8, com o consequente aumento do risco de desenvolvimento de gastrite atrófica e câncer gástrico (Soitcov et al., 2004; Bartchewsky et al., 2008). Huang e colaboradores (2003) demonstraram que pacientes infectados por linhagens *cagA*⁺ apresentam risco 2,87 vezes maior de desenvolver câncer gástrico. O gene *cagA* é considerado um marcador da presença da ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI), a qual possui aproximadamente 40 Kb, codifica 31 genes e é encontrada em cerca de 50% a 60% das linhagens que ocorrem no ocidente e em 90% das amostras asiáticas (Naito e Yoshikawa, 2002). A ilha *cag*-PAI contém genes homólogos a genes de outras bactérias, os quais codificam componentes do sistema de secreção tipo IV, que servem para injetar a proteína CagA, peptidoglicanos e provavelmente outros fatores desconhecidos de virulência dentro da célula hospedeira.

A proteína CagA, a primeira proteína bacteriana a ser descrita como oncogênica (Hatakeyama, 2004), é fosforilada por membros da família de quinases SRC. Uma vez fosforilada, se liga à proteína SHP-2 (SRC – homóloga 2) que age na transdução de sinais mitogênicos via RAS-MAPK, podendo levar a proliferação celular, apoptose e rearranjo do citoesqueleto da célula, alterando sua morfologia, que passa a ser semelhante a um beija-flor, sendo descrita como *hummingbird phenotype* (Hatakeyama, 2004). A fosforilação da proteína CagA ocorre nos *motif* EPIYA que apresentam quatro sítios, A-B-C-D, definidos por diferentes sequências que estão relacionadas a diferentes graus de virulência. Acredita-se que os resíduos de tirosina que constituem o sítio EPIYA-C são o principal local de fosforilação de

tirosina, enquanto aqueles presentes em EPIYA A e -B seriam pouco fosforilados (Higashi et al., 2002). Assim, sugere-se que o número de sítios EPIYA-C está diretamente correlacionado com o nível de fosforilação de CagA (Higashi et al., 2002), tal fato indica que quanto maior for o número de sítios EPIYA-C maior potencial carcinogênico da linhagem. De modo complementar, resultados prévios de nosso grupo e outros autores mostram os mesmos resultados (Azuma et al., 2002; Higashi et al., 2005; Naito et al., 2006; Bartchewsky et al., 2008), enquanto outros não chegam a estas conclusões (Tao et al., 2004; Zhu et al., 2005; Choi et al., 2007).

A produção da citotoxina vacuolizante (VacA), codificada pelo gene *vacA*, é um outro importante fator de virulência do *H. pylori* por induzir a vacuolização citoplasmática em células eucariontes (Cover e Blaser, 1992; Cover et al., 1994; Atherton et al., 1995; de Bernard, 1997; Montecucco et al., 1999).

Embora todas as linhagens desta bactéria secretem o produto VacA, uma considerável variação interlinhagens na atividade vacuolizante da toxina foi detectada por vários autores (Covacci et al., 1990; Cover et al., 1994; Atherton et al., 1995; Forsyth et al., 1998). Acredita-se que a heterogeneidade alélica de *vacA* pode ser um fator determinante nas variações das manifestações clínicas entre pacientes infectados por *H. pylori* (Rudi et al., 1998; Atherton et al., 1999; Covacci et al., 1999; Gerhard et al., 1999; Van Doorn et al., 1999).

Existem duas regiões variáveis no gene *vacA*. Uma região de aproximadamente 50pb, denominada **s**, localizada na região 5' terminal, que codifica o peptídeo sinal. De acordo com a sequência gênica podem ser identificados dois subtipos: **s1** e **s2**. O alelo s1 pode ser classificado como s1a, s1b, s1c (Atherton et al.,

1995; Van Doorn et al., 1998). Outra região que apresenta uma grande heterogeneidade, chamada de **m**, com aproximadamente 700pb está localizada na região mediana do gene (Atherton et al., 1995). Esta apresenta os subtipos **m1** e **m2**, sendo que este pode ser identificado como m2a e m2b (Atherton et al., 1995; VAN Doorn et al., 1998).

A combinação em mosaico desses tipos alélicos distintos (s e m) determina a produção e a especificidade da atividade da citotoxina e está associada à patogenicidade bacteriana (Atherton et al., 1995; Gunn et al., 1998; Van Doorn et al., 1998; Wang et al., 1998). Todas as linhagens possuem um dos tipos de sequência sinal e um dos dois tipos da região mediana, assim sendo podemos ter as combinações s1m1, s1m2, s2m2, e a menos comum s2m1 (Atherton et al., 1997; Morales-Espinosa et al., 1999; Martinez et al., 2001). Análises bioquímicas revelaram que linhagens *vacA* s1m1 produzem uma citotoxina muito mais ativa *in vitro* do que as linhagens *vacA* s1m2 e as bactérias *vacA* s2m2 produzem citotoxinas inativas (Leunk et al., 1988; Tummuru, Cover e Blaser, 1993; Atherton et al., 1995). Diversos estudos epidemiológicos indicam que há uma associação entre a infecção por linhagens *vacA* s1m1 e o desenvolvimento de doenças gástricas (Atherton et al., 1995; Rudi et al., 1998; VAN Doorn et al., 1998; Yamaoka et al., 1999; Fallone et al., 2000; Arents et al., 2001; Godoy et al., 2003; Ribeiro et al., 2003; Erzin et al., 2006; Garcia et al., 2006; Leung et al., 2006, Com et al., 2007; Basso et al., 2008; Yamaoka et al., 2008; Ohna et al., 2009; Cavalcante et al., 2012).

2-EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA

A infecção causada pelo *H. pylori* na mucosa gástrica é considerada a infecção crônica que ocorre em seres humanos com maior frequência (Graham, 2000). Aproximadamente metade da população mundial está infectada por *H. pylori*, tornando esta bactéria um dos principais patógenos da espécie humana e um grave problema de saúde pública (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994; AMERICAN DIGESTIVE HEALTH FOUNDATION, 1997). Embora exista uma alta taxa de colonização, nem sempre a presença da bactéria está associada com o desenvolvimento de doenças, já que 70% da população infectada permanece assintomática. Entretanto, os indivíduos colonizados podem desenvolver gastrite, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) (McColl, 1999; Das e Paul, 2007).

A prevalência da infecção é alta nos países em desenvolvimento (maior que 80%) e menor nos países desenvolvidos (menos que 50%), com tendência a diminuir no mundo inteiro, devido às melhorias nas condições de saneamento básico (Perez-Perez et al., 2004; Kusters et al., 2006). Entretanto, como os níveis sócio econômicos variam entre as subpopulações de um mesmo país, a prevalência nesses subgrupos podem ser diferentes (Bruce e Maaros, 2008).

O aumento na prevalência está diretamente relacionado as condições de vida na infância como o nível socioeconômico, condições sanitárias inadequadas, consumo de água contaminada ou sem tratamento adequado, escassas práticas de higiene, famílias com grande número de indivíduos habitando na mesma moradia e

a presença de crianças na família (Perez –Perez et al., 2004; Lehours & Yilmaz, 2007; Nouraie et al., 2009). Estas condições são normalmente encontradas em países em desenvolvimento, incluído o Brasil, onde de fato ocorre uma alta prevalência da infecção por *H. pylori* (Graham et al., 1991; Queiroz et al., 2012). De modo complementar, foi observado que a melhoria das condições gerais de higiene diminui a prevalência da infecção (Fujimoto et al., 2007). Isto sugere a existência de um conjunto de condições ambientais às quais as crianças se encontram expostas, especialmente nas áreas em desenvolvimento.

No Brasil, estudos realizados com crianças e adolescentes na faixa etária entre 1-18 anos, de nível socioeconômico baixo na cidade de Belo Horizonte, revelaram uma prevalência de 34,1%, sendo esta porcentagem similar entre meninos e meninas (35,8% e 32,3%, respectivamente). Estes estudos ainda verificaram um aumento da prevalência conforme a idade dos indivíduos analisados, sendo de 16,4 % na faixa entre 1 e 2 anos e de 64,3 % entre 15 e 18 anos (Oliveira et al., 1994). Comparativamente foram verificadas porcentagens próximas em países como Chile e Índia, também em desenvolvimento. Na mesma faixa etária observou-se uma porcentagem significativamente inferior em países como França, Bélgica e Inglaterra, e taxas mais altas em países como Nigéria, Índia e Argélia (Oliveira et al., 1994).

Em 1999, o estudo foi repetido com 213 voluntários adultos de baixo nível socioeconômico residentes na área metropolitana de Belo Horizonte e apontaram uma prevalência de 81,7% (Oliveira et al., 1999). Outro estudo realizado com habitantes de Nossa Senhora do Livramento, interior do estado de Mato Grosso,

revelou uma frequência de 77,5 % de crianças e adolescentes contaminados e 84,7% de adultos (Souto et al., 1998).

Outro estudo realizado no Brasil que avaliou os fatores ligados a manutenção da infecção por *H. pylori*, aquisição e perda da mesma em crianças pertencentes a famílias de baixos recursos durante um período de 8 anos, reportou que entre os fatores que levaram a permanência da infecção e a aquisição da mesma destacou-se o aumento do número de crianças habitando na mesma moradia. Observou-se também um aumento na frequência de aquisição e uma diminuição na perda da infecção o que levou a um aumento na prevalência da infecção com a idade (Queiroz et al., 2012).

3-TRANSMISSÃO

A via de transmissão do *H. pylori* ainda não está completamente esclarecida. O único reservatório de *H. pylori* conhecido até agora é o estômago humano (Megraud e Broutet, 2000). Portanto, as novas infecções parecem acontecer como uma consequência direta da transmissão de um ser humano para outro, ou pela contaminação do meio ambiente. Existem evidências que sustentam a transmissão gastro-oral, oral-oral e fecal-oral, mas não existem dados conclusivos estabelecendo a predominância de algumas destas vias de transmissão (Kusters et al., 2006; Azevedo et al., 2009).

A transmissão de pessoa para pessoa pode ser subdividida em duas categorias principais: vertical e horizontal. A transmissão vertical é a infecção transmitida dos ascendentes para os descendentes, dentro da mesma família; a

transmissão horizontal envolve o contato com indivíduos que não pertencem à família e não exclui a contaminação proveniente do meio ambiente (Schwarz et al., 2008).

3.1 Transmissão gastro- oral

H. pylori é adquirido normalmente na primeira infância e o vômito de muco poderia servir como veículo de transmissão. Acredita-se que a via de transmissão possa ser o suco gástrico, especialmente devido a alta frequência de episódios de vômitos nas crianças (Axon, 1995). Por exemplo, a infecção pode ser facilmente transmitida de pessoa para pessoa através da intubação gástrica, pois o *H. pylori* pode sobreviver fora do estômago humano no suco gástrico (Galal et al., 1997). Outros estudos sugerem que a presença de pessoas na família com gastroenterites, em particular com episódios de vômitos, são um fator de risco para a infecção por *H. pylori* (Perry et al., 2006). Estes estudos são favoráveis à transmissão gastro-oral, especialmente durante a infância donde os episódios de vômitos associados às condições de pouca higiene apontam ao suco gástrico como provável via de transmissão.

3.2 Transmissão oral-oral

A saliva é uma outra possível fonte de transmissão de *H. pylori*, uma vez que a microbiota gástrica pode alcançar e colonizar a boca após episódios de regurgitação ou vômito. Diferentes estudos têm relatado a presença de DNA de *H. pylori* oriundos de materiais como saliva, biofilme subgingival e da placa dental (Burguers et al.,

2008; Souto e Colombo, 2008). Existem alguns relatos na literatura de recuperação de *H. pylori* de culturas diretas de saliva (Ferguson et al., 1993; Parsonnet et al., 1999). Entretanto, a recuperação de *H. pylori* não parece aumentar após o vômito, e as quantidades recuperadas na saliva são pequenas (Parsonnet et al., 1999). Assim, existem controvérsias na literatura, visto que existem relatos nos quais o isolamento de *H. pylori* da saliva ou da placa dental não foi possível, mesmo quando as culturas das biopsias gástricas destes pacientes foram positivas (De et al., 2006; Luman et al., 1996).

3.3 Transmissão fecal-oral

Em 1992, Thomaz e colaboradores descreveram pela primeira vez o isolamento do microrganismo em fezes de crianças e adultos contaminados. Posteriormente, outros trabalhos citando a presença do microrganismo nas fezes também foram descritos (Kelly et al., 1994; Notarnicola et al., 1996), possibilitando que as fontes de água pudessem ser consideradas como um importante meio de transmissão, particularmente nos países em desenvolvimento, onde o tratamento dos efluentes não é adequado, o que potencializaria a contaminação através das fezes (Heatley, 1995).

4-PATOGÊNESE

O ser humano ingere muitos microrganismos cada dia, mas a maioria não consegue colonizar o estômago devido a uma das mais importantes propriedades antibacterianas que este órgão possui, o pH ácido. Em condições de jejum o lúmen

gástrico tem um pH < 2, o que previne a proliferação bacteriana. Na camada de muco, que recobre as células epiteliais gástricas, existe um gradiente de pH que vai de 2, na superfície luminal, até 5-6 na superfície das células epiteliais (Quigley et al., 1987; Talley et al., 1992). Após entrar no estômago, o *H. pylori* penetra na camada mucosa gástrica e encontra um ambiente menos ácido que no lúmen gástrico (Schreiber et al, 2004). Dentro da camada mucosa o *H. pylori* pode aderir à superfície apical das células epiteliais gástricas, e ocasionalmente ser internalizado (Amieva et al., 2002; Kwok et al., 2002).

A capacidade do *H. pylori* de colonizar o estômago humano pode ser atribuída à produção de produtos bacterianos específicos. Estes produtos têm sido denominados fatores de colonização com base na demonstração de que as linhagens mutantes deficientes na produção desses fatores não colonizam o estômago em modelos animais. Por exemplo, os mutantes que não possuem flagelos ou urease são incapazes de colonizar o estômago de modelos animais (Eaton et al., 1994; Eaton et al., 1996).

A bactéria possui múltiplas proteínas de membrana como BabA, SabA, AlpA e HopZ que medeiam aderência da bactéria às células epiteliais gástricas, o que resulta na inativação de numerosas vias de sinalização, e permitem a entrada na célula de toxinas e outras moléculas efetoras (Guillemin et al., 2002).

As proteínas de membrana e outros componentes de superfície da bactéria são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, e um dos mecanismos que o *H. pylori* utiliza para evadir este sistema de defesa e cobrir-se de proteínas do hospedeiro como no caso das proteínas PgbA e PgbB, que ligam plasminogênio

(Jonsson et al., 2004). Outro mecanismo de evasão do sistema imune envolve a variação de fase e a variação antigênica dos componentes de superfície, como no caso da variação antigênica do LPS (Appelmeck et al., 1999; Solnick et al., 2004). O LPS expressa antígenos de tipo O que estão estruturalmente relacionados aos antígenos de Lewis dos grupos sanguíneos o que representa uma forma de imunotolerância evitando o reconhecimento destes antígenos pela similaridade com os próprios (Monteiro et al., 1998).

A presença dos fatores de virulência permite à bactéria colonizar e manter-se na mucosa gástrica provocando no hospedeiro uma resposta inflamatória que dará origem a uma série de eventos que podem culminar no câncer gástrico.

4.1 Infecção aguda

A fase inicial da infecção aguda se desenvolve na maioria dos pacientes infectados sub-clinicamente. A bactéria penetra a camada mucosa e se multiplica na proximidade das células epiteliais. O epitélio responde com esfoliação celular e compensa esta esfoliação com mudanças regenerativas. Em seguida verifica-se a infiltração de polimorfonucleares e edema. A fase aguda acontece com hipocloridria e falha da secreção de ácido ascórbico. A resposta aguda é mediada pelo LPS bacteriano e por agentes quimiotáticos que penetram no epitélio danificado e induzem a migração dos polimorfonucleares para a lâmina própria e epitélio. Estes produtos bacterianos ativam mastócitos, que produzem a liberação de grânulos e secretam outros mediadores inflamatórios, que incrementam a permeabilidade vascular, o que aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais

e aumenta a migração dos leucócitos (Graham, 1992). A interação de *H. pylori* com a superfície da mucosa leva a secreção de citocinas pró-inflamatórias como foi mostrado por Yamaoka e colaboradores (1995) que observaram a presença de altos níveis de citocinas na mucosa gástrica de pacientes com gastrite como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e numerosas interleucinas entre elas IL-6, IL-8 e IL-10.

A fase aguda da gastrite é de curta duração e na minoria dos casos a infecção se resolve espontaneamente. Entretanto, na maioria dos casos, o sistema imune não consegue eliminar a infecção, e durante 3 a 4 semanas há um acúmulo gradual de células inflamatórias, o que dá lugar a uma gastrite crônica ativa (Sobala et al., 1991).

4.2 Infecção crônica

Nesta fase, acontece o infiltrado de linfócitos e de células plasmáticas, o que marca um aumento na resposta inflamatória com a produção de citocinas e anticorpos anti-*H. pylori*, desencadeando a ativação do sistema complemento, o que amplifica a reação inflamatória. Entretanto, o organismo não consegue eliminar a infecção e a presença da bactéria estimula a produção de IgA, que recruta linfócitos B nos folículos linfóides com a produção de células plasmáticas. Este aumento na produção de IgA não consegue eliminar a bactéria e o estímulo antigênico persiste, dando lugar a aquisição de tecido linfóide. Desta maneira, o *H. pylori* desencadeia uma resposta inflamatória aguda e uma resposta imune crônica, liderada pelas

células Th1 que promovem a inflamação, e células Th2 que são responsáveis pela resposta imune secretória (Mohammadi et al., 1997, Dixon, 2001).

4.2.1 Atrofia

É a perda do tecido glandular devido ao dano repetido e contínuo da mucosa gástrica, que acontece em todos os processos patológicos, incluindo a presença crônica de *H. pylori*. Assim, a perda das glândulas acontece pela erosão e a ulceração da mucosa ou como resultado do processo inflamatório prolongado, após a perda das glândulas o tecido é trocado por tecido fibroso (Dixon, 2001).

Na infecção por *H. pylori* a atrofia pode ser o resultado dos efeitos da bactéria, ou como consequência da resposta inflamatória do hospedeiro. O dano produzido pelas citotoxinas bacterianas e os produtos de amônia podem levar a destruição do epitélio, como assim também a resposta do hospedeiro que leva a um incremento dos níveis de citocinas, interleucinas e de leucotrienos, especialmente o nível de leucotrieno B4 sintetizado pelos neutrófilos, que é citotóxico para o epitélio gástrico (Gologam et al., 2005).

4.2.2 Metaplasia intestinal

A metaplasia é uma troca reversível na qual um tipo celular diferenciado é substituído por outro tipo de células diferenciadas, e de maneira geral esta troca representa uma adaptação para lidar com um ambiente desfavorável. Assim, a metaplasia intestinal representa uma substituição de um epitélio gástrico por um

epitélio intestinal. A metaplasia está associada com um estímulo de crescimento anormal, como acontece na regeneração após o dano da mucosa (Oohara et al., 1983), a mesma pode ser transiente, mas quando a metaplasia persiste indica que existe uma mudança herdável ao nível da divisão celular, como uma mutação somática ou é uma consequência de uma mudança epigenética sustentada que modula a expressão de genes envolvidos na diferenciação celular o que determina o fenótipo celular (Dixon, 2001).

A gastrite crônica associada à infecção pelo *H. pylori* progride seguindo dois padrões principais: (1) a gastrite predominante de antro, caracterizada pela inflamação, atrofia glandular e metaplasia intestinal limitada ao antro, típico de indivíduos com úlcera duodenal; (2) ou a pangastrite progressiva, caracterizada por uma infecção ativa do corpo e do antro com atrofia e substituição das glândulas por epitélio intestinal, característico dos indivíduos infectados que desenvolvem carcinoma gástrico e úlceras gástricas (Correa, 1992; Cassaro et al., 2000; Sipponen et al., 2000).

4.2.3 Câncer gástrico

O câncer gástrico é um importante problema de saúde, sendo a quarta causa de morte na Europa. Apesar da incidência e mortalidade terem diminuído nas últimas décadas, ele continua sendo uma das doenças malignas mais comuns no mundo (Hatekayama, 2009). Os dados estimativos para 2012 no Brasil apontam à aparição de 20.090 novos casos dentre os quais 12.670 afetaram homens e 7.420 as mulheres (INCA, 2012).

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial. Os carcinomas gástricos resultam da interação de fatores relacionados com a dieta, o meio ambiente, susceptibilidade individual e a infecção pelo *H. pylori*. Sabe-se que dietas com alto conteúdo de sal, e alimentos industrializados com alto conteúdo em nitritos, assim como também o baixo consumo de vegetais e frutas frescas, principais fontes de antioxidantes, estão relacionados a um aumento no risco de desenvolvimento do câncer gástrico (Correa, 1992).

A forte associação epidemiológica entre a infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de câncer gástrico fundamentaram que a *World Health Organization* (WHO) classificasse, no ano 1994, a bactéria como um agente carcinogênico classe I, um carcinógeno definitivo (IARC, 1994; Honda et al., 1998; Watanabe et al., 1998).

O *H. pylori* pode levar ao desenvolvimento do câncer gástrico seja pelo seu próprio efeito de promoção da carcinogênese ou pelo estabelecimento de um ambiente carcinogênico, devido ao tempo de infecção. Existem duas variantes principais do carcinoma gástrico: intestinal e difuso. O câncer gástrico de tipo difuso é pouco diferenciado, não forma estruturas glandulares e usualmente afeta pacientes mais jovens do que o câncer de tipo intestinal (Sipponem et al., 2000). Neste caso, a inflamação persistente provocada pela infecção resultaria em dano ao DNA provocado por EROs, mutações, e eventualmente carcinogênese. Já o câncer gástrico de tipo intestinal transcorre através de progressão bem caracterizada: mucosa normal, gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e eventualmente câncer (Correa et al., 1992; Sipponem et al., 2000).

5-MECANISMOS MOLECULARES

H. pylori pode levar ao desenvolvimento do câncer gástrico pela somatória de efeitos provocados por diferentes tipos de eventos que atingem as células epiteliais gástricas: (1) o dano produzido pela reação inflamatória de longa duração que favorece a aparição de mutações; e (2) os efeitos diretos provocados pela bactéria e seus produtos tóxicos nas células como a alteração do balanço de apoptose – proliferação, ativação ou inativação de vias de sinalização celular, modulação da expressão gênica, indução de estresse oxidativo, indução de falha no sistema de reparo ao DNA e alterações na adesão celular (Gologam et al., 2005).

5.1 Mecanismos associados à inflamação

A infecção pelo *H. pylori* na mucosa gástrica provoca uma reação inflamatória do hospedeiro que consiste na infiltração da mucosa por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos T e B. Tanto o *H. pylori* como as citocinas induzidas durante a infecção podem estimular o recrutamento e a ativação das células inflamatórias. Estas células inflamatórias ativadas liberam EROs (Shimada et al., 1999). Estes intermediários são, em parte, responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo nas células epiteliais gástricas, o qual poderia ser potencializado pela diminuição dos níveis de antioxidantes associados com a infecção por *H. pylori*, como os baixos níveis de vitamina C no suco gástrico de pacientes infectados reportado por Correa e colaboradores. (1998). As EROs podem induzir danos ao DNA com a acumulação de mutações contribuindo na patogêneses do câncer gástrico (Grisham et al., 2000).

5.2 Mecanismos associados ao efeito direto da bactéria e seus produtos sobre as células gástricas

5.2.1 Alteração nas vias de sinalização

O *H. pylori* pode alterar as vias de sinalização celular e a transcrição gênica diretamente pela adesão às células epiteliais gástricas ou por meio da secreção dos produtos bacterianos. A adesão da bactéria às células epiteliais gástricas induz a fosforilação dos resíduos tirosina de proteínas celulares. As linhagens *cagA*⁺ translocam a proteína bacteriana *cagA* na células epiteliais gástricas por meio do sistema de secreção tipo IV, codificado pela ilha de patogenicidade *cag* PAI, esta proteína induz modificações nos estados de fosforilação de diferentes proteínas celulares (Odembreit et al., 2000).

A infecção induz a expressão de várias citocinas, entre elas a IL-8 (Crabtree et al., 1994; Crabtree et al., 1998 ; Yamaoka et al., 1995). NF- κ B regula a expressão de vários genes envolvidos no crescimento celular e na resposta imune, e é um regulador transcricional da produção de IL-8. A infecção ativa NF- κ B, e induz a sua translocação nuclear seguido de um aumento nos níveis de RNAm e de proteína IL-8 (Keates et al., 1997). Tem sido demonstrado, *in vitro*, que a cocultura com linhagens *cagA*⁺ induzem a ativação de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), p38, e de MAP quinases como a c-jun N-terminal quinase (JNK). Outro estudo mostrou que a exposição das células epiteliais gástricas ao *H. pylori* induz a ativação do fator de transcrição proteína 1 e a ativação dos protooncogenes c-fos e c-jun (Meyer Ter Vehn et al., 2000; Sepulveda et al., 2002). Tais efeitos acontecem através

da ativação da cascata ERK/MAP quinase, resultando na fosforilação de Elk-1 e um aumento na transcrição de c-fos (Meyer Ter Vehn et al., 2000). Tendo em vista que as MAP quinases regulam a proliferação celular, a diferenciação, a apoptose, estresse oxidativo e a resposta inflamatória, a ativação das mesmas pela bactéria é essencial para induzir inflamação gastroduodenal e carcinoma (Keates et al., 1999).

5.2.2 Modificações na adesão das células epiteliais

E-caderina é uma proteína essencial na manutenção da adesão celular e na diferenciação, acredita-se que atue como um supressor da invasividade celular e metástases. Além disso, tem sido observado que aproximadamente a metade dos cânceres gastrointestinais do tipo difuso apresentam mutação nesta proteína (Machado et al., 2001). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm associado a infecção com *H. pylori* com uma diminuição na expressão gênica e proteica de E caderina (Terres et al., 1998; Sepulveda et al., 2002).

5.2.3 Alteração do balanço apoptose- proliferação celular

A manutenção da integridade da mucosa gástrica depende do balanço entre a morte celular programada (apoptose) e a proliferação celular. Tem sido observado que tanto os produtos bacterianos como os produtos relacionados com a inflamação produzem um aumento na apoptose e na proliferação celular nas células epiteliais gástricas (Peek et al., 2000; Wagner et al., 1997). A erradicação do *H. pylori* resulta na diminuição da proliferação celular e apoptose (Hoshi et al., 1999). Dessa maneira,

a proliferação celular causada pela infecção por *H. pylori* expõe o epitélio a aumentar o número de células que poderiam estar afetadas por mutações, favorecendo o desenvolvimento do câncer (Asaka et al., 2001).

5.2.4 Estresse oxidativo e acúmulo de mutações

Um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer gástrico é a geração de estresse oxidativo. O dano oxidativo causado no DNA devido a infecção por *H. pylori* tem sido bem documentado em tecidos provenientes de gastrite (Balk et al., 1996; Farinatti et al., 1998). Experimentos *in vitro* indicam que a exposição de células epiteliais gástricas a diferentes linhagens de *H. pylori* e citocinas pro-inflamatórias, geram a produção de EROs. (Obst et al., 2000). Além disso, têm sido observado, em pacientes com gastrite associados a *H. pylori*, níveis aumentados de óxido nítrico sintetase indutível (iNOS) e de ciclooxigenase (COX-2). Tendo em vista que ambos os produtos são potencialmente mutagênicos, acredita-se que estes poderiam estar relacionados às mutações detectadas em pacientes com gastrite crônica com risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma gástrico (Fu et al., 1999; Grisham et al., 2000; Li et al., 2000;). Outro produto importante detectado em pacientes com gastrite crônica infectados pela bactéria, gastrite atrófica e metaplasia intestinal é a 8- hidroxideoxiguanosina (8OHdG), marcador da presença de aductos mutagênicos/carcinogênicos (Grisham et al., 2000; Farinatti et al., 1998). O 8OHdG é o resultado da ação do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) sobre as guaninas oxidadas pela presença das EROs, que as convertem em 8-oxo-7,8 dihidroguanina. Estas guaninas oxidadas podem causar mutações por

transversão como G-T ou G-A, as quais acumuladas podem levar a graves consequências (Lieberman, 2008).

5.2.5 Falha no sistema de reparo ao DNA (*Mismatch repair*)

O sistema de reparo de mal pareamentos (MMR) é o responsável por resguardar a fidelidade durante a replicação do DNA (Kolodner et al., 1999). Este sistema é bem conservado nas bactérias e nos mamíferos. Nas bactérias, ele é composto por três proteínas principais, MutS, MutL e MutH. Nos mamíferos existem 5 homólogos de MutS, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 e MSH6, e 4 homólogos de MutL, MLH1, MLH3, PMS1 e PMS2. MSH2 pode formar heterodímeros com MSH6 ou MSH3, dando origem ao complexo MutS α ou MutS β respectivamente, os que reconhecem os mal pareamentos do DNA de acordo com sua natureza: mal pareamentos de bases, inserções, deleções de um ou vários nucleotídeos. Logo após a união de um destes complexos ao mal pareamento, são recrutados os complexos MutL α ou MutL β . MutL α é formado por MLH1 e as proteínas PMS2, e MutL β , consiste em MLH1 e as proteínas PMS1. A união destes complexos sinaliza os componentes do sistema MMR que procedem a excisão do DNA que apresenta o mal pareamento e a resíntese da nova fita (Raschle et al., 1999; Li, 2003).

Durante a infecção pelo *H. pylori* acontece um aumento na proliferação celular da mucosa gástrica, o que sobrecarrega o sistema de reparo e leva a um aumento na aparição de mutações devido não só a infecção, mas também à presença de outros fatores ambientais. Uma característica importante associada às falhas no

sistema de reparo ao DNA é a presença de instabilidade de microssatélites (MSI), que seria a responsável pela aparição de mutações nas regiões codificadoras de vários genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular. Diversos autores relataram associação entre a infecção por *H. pylori* e a presença de tumores MSI positivos (Wu et al., 1998; Leung et al., 2000). Os dados sugerem que um sistema de reparo deficiente causado pela infecção pelo *H. pylori* poderia favorecer a MSI no epitélio gástrico, representando um mecanismo de acumulação de mutações na mucosa gástrica durante os estágios precoces da carcinogênese gástrica associada à infecção pela bactéria (Gologam et al., 2005).

6-INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

A cada divisão celular, a DNA polimerase comete erros durante a duplicação do DNA. Estes erros, que acontecem mais frequentemente no nível das sequências repetitivas denominadas microssatélites são normalmente reparados pelo sistema MMR. Tumores defeituosos no sistema MMR acumulam mutações (deleções e inserções de alguns nucleotídeos) no nível de microssatélites e são chamados de instabilidade de microssatélites (MSI). Os microssatélites são repetições em tandem de motivos de 1 a 5 nucleotídeos, presentes em grande número e espalhados no genoma, em regiões codantes e não codantes. A instabilidade dos microssatélites não codantes, não parecem ter um papel no processo de transformação celular, mas são bons indicadores do estado do MSI. Por outro lado, a instabilidade causada por deleção ou inserção nas regiões codantes levam a mudanças na matriz de leitura. A

consequência é a inativação do gene, que potencialmente pode ter um importante papel na iniciação ou na progressão tumoral (Hamelin et al., 2008).

O fenótipo MSI foi descrito pela primeira vez em aproximadamente 15% dos cânceres coloretais (HNPCC), do tipo esporádico ou hereditário, e também foi associado aos tumores gástricos e de endométrio, e em menor grau a outros tipos de tumores e, seres humanos. A principal característica destes tumores MSI é que todos são deficientes no sistema MMR, levando a inativação bialélica de um dos maiores genes do sistema (Halling et al., 1999).

Nos casos de câncer col retal de tipo hereditário ou familiar, as principais alterações do sistema MMR são as mutações constitutivas dos genes *MSH2* ou *MLH1*, e menos comuns as mutações em *MSH6* e *PMS2*. Têm sido reportados alguns casos de metilação hemilalélica dos promotores de *MLH1* ou *MSH2*, mas são excepcionais e raramente transmissíveis. Já nos casos dos tumores MSI esporádicos, de cólon, de estômago ou de endométrio, a alteração mais frequente do sistema MMR é a inativação da expressão de *MLH1* pela metilação bialélica do promotor do gene (Kane et al., 1997).

7-METILAÇÃO DO DNA

A epigenética é definida como trocas herdáveis na expressão gênica, que não estão necessariamente acompanhadas de trocas na sequência do DNA. O silenciamento gênico no nível da cromatina é necessário para a vida dos organismos eucariotos, e é particularmente importante na regulação de processos biológicos fundamentais tais como: (1) diferenciação celular; (2) *imprinting* gênico e (3)

silenciamento de domínios cromossomais como a inativação do cromossomo X. Em muitas espécies, o silenciamento pode ser iniciado e mantido por processos que envolvem modificações covalentes das histonas e de outros componentes da cromatina. Nos vertebrados existe a vantagem da herança dos padrões de metilação do DNA acrescentando mais uma linha de controle neste processo. Assim como outros processos biológicos, o silenciamento pode ser desregulado, causando o desenvolvimento de doenças dentre as quais destaca-se o câncer (Jones & Baylin, 2007).

No processo de silenciamento cooperam múltiplos processos como os RNAs não codificadores, modificações covalentes da cromatina, alterações físicas no posicionamento do nucleossomo e a metilação do DNA entre outros (Jones & Baylin, 2007).

A metilação do DNA é um dos eventos epigenéticos mais frequentes que acontece no genoma humano. Esta modificação, herdável, é reversível, fazendo dela um alvo terapêutico. Estudos recentes têm mostrado que a epigenética possui um papel importante na biologia do câncer (Singal et al., 1999; Baylin et al., 2002), nas infecções causadas por vírus (Baylin, 1997), na mobilidade dos elementos transponíveis (Costello et al., 2001), no *imprinting* genômico, nas anormalidades do desenvolvimento, nas doenças mentais e na inativação do cromossomo X (Amir et al., 1999; Laird et al., 2003).

A metilação do DNA é uma modificação química covalente, que resulta na adição de um grupo metila (CH_3) no carbono 5 do anel pirimidina da citosina. Embora a maioria da metilação da citosina acontece na sequência 5' CG 3'

(denominado dinucleotídeo CpG), pode acontecer também nos nucleotídeos CpA e CpT (Ramsahoye et al., 2000). Devido ao DNA estar constituído por quatro bases, existem 16 combinações possíveis, e o dinucleotídeo CpG deveria acontecer com uma frequência de aproximadamente do 6%, mas a presença atual deste dinucleotídeo alcança de 5% a 10% de sua frequência esperada (Antequera et al., 1993). Esta diminuição de CpGs poderia estar relacionada a hipermutabilidade das citosinas metiladas que passam de CpG a TpG. As CpGs podem ser encontradas em frequências próximas às esperadas agrupadas em regiões denominadas ilhas CpG. Estas ilhas provavelmente mantiveram seu conteúdo em CpG durante a evolução pelo fato de estarem sem metilar, e por isso serem mais estáveis. De acordo com esta hipótese, organismos que possuem genomas com baixa frequência de metilação em CpGs, como *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*, possuem CpGs na frequência esperada e apresentam pouca variação na sua distribuição (Elango et al., 2008).

O genoma humano não se encontra uniformemente metilado, e possui regiões não metiladas intercaladas com regiões metiladas (Bird, 1996). Estas regiões foram originalmente identificadas por Bird e colaboradores como regiões do DNA com uma alta densidade de CpG (Bird et al., 1985). As características que definem a presença de uma ilha é o conteúdo de CG maior do que 55% em uma distancia de não mais de 500 pares de bases. Levando em consideração esta definição, o genoma humano possui aproximadamente 38.000 ilhas CpG. A grande maioria destas ilhas (37%) estão localizadas na extremidade 5' das regiões regulatórias, regiões promotoras dos genes e aproximadamente 70 % dos genes

conhecidos possuem uma ilha CpG na região de -2000 kilobases (Kb) a + 1 Kb de seu sítio de início da transcrição (McCabe et al., 2009).

A metilação do DNA é mediada por uma família de enzimas altamente relacionadas, as enzimas DNA metil-transferases, que compreendem a DNMT1, DNMT3A e a DNMT3B, que são as responsáveis em transferir um grupo metila da S-adenosil-L-metionina (SAM) para as citosinas nos dinucleotídeos CpG. A SAM é convertida em S-adenosil homocisteína (SAH) que é clivada em homocisteína e adenosina. A homocisteína é convertida novamente em SAM através de uma via dependente de folato e cobalamina, provedores dos grupos metila para esta reação (Bestor et al., 2000; Hermann et al., 2004). Estas enzimas exibem duas funções diferentes, mas variam em sua habilidade de realizar uma ou a outra. As funções são conhecidas como metiltransferase de manutenção e metiltransferase *de novo*. Na metiltransferase de manutenção, a atividade é atribuída principalmente à DNMT1 (Okano et al., 1998; Bestor, 2000; Hermann et al., 2004). Esta é a responsável pela metilação das fitas de DNA recém sintetizadas, seguindo o padrão da fita simples que lhe deu origem. Esta enzima reconhece o padrão hemimetilado da fita original e reproduz o mesmo na fita filha, permitindo que esta marca seja herdável na replicação do DNA e na divisão celular. A outra função, a metiltransferase *de novo*, é atribuída à DNMT3A e à DNMT3B (Bestor, 2000; Hermman et al., 2004; Okano et al., 1998), que são responsáveis pela metilação de bases previamente não metiladas. Esta atividade acontece extensamente nos estágios iniciais do desenvolvimento do embrião, logo após a implantação. Antes da implantação, o ovo fertilizado passa por

um estágio de demetilação que apaga a maioria dos padrões de metilação pré-existent, herdados do DNA parental, e permite, deste modo o estabelecimento de um novo padrão de metilação no embrião (Razin et al., 1995). A delimitação clara das funções para estas enzimas é uma simplificação já que DNMT1 pode contribuir também a metilação *de novo* tanto *in vivo* como *in vitro* (Vertino et al., 1996; Graff et al., 1997 Bestor, 2000; Hermman et al, 2004), e a manutenção da metilação requer em certas regiões do genoma a presença de DNMT3A e de DNMT3B (Liang et al., 2002).

A regulação da expressão gênica é um processo complexo. O início da transcrição é um evento altamente controlado e envolve fatores que atuam em *cis* e em *trans*. Os elementos que atuam em *cis* são sequências de DNA que atuam como substrato para os fatores *trans*, e, desta maneira, o DNA próximo a esta sequência se prepara para a transcrição. O aumento da metilação na região promotora dos genes leva a uma redução de sua expressão, entretanto a metilação nas regiões a serem transcritas possuem um efeito variável na expressão do gene (Jones, 1999; Singal et al., 2002).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como a metilação do DNA leva a repressão da transcrição. Um dos mecanismos é a interferência na união dos fatores de transcrição, estes reconhecem sequências que possuem resíduos CpG, e ao estarem metilados essa união seria inibida. O segundo modo de repressão envolve a união direta de repressores transcrpcionais no DNA metilado. Estas regiões metiladas são alvo das proteínas *methyl -CpG binding domain* (MBD), MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 (Dhasaraty et al., 2008) e Kaiso,

proteína que se liga através de um *zinc motif* (Prokhortchouc et al., 2001). Assim, as interações destas proteínas com deacetilases de histonas, metiltransferases de histonas e proteínas remodeladoras de cromatina, levam o DNA metilado a um ambiente de heterocromatina que é repressivo para a transcrição (Bird et al., 1999).

Atualmente, é bem conhecida a importância da metilação nas ilhas CpG da região promotora, que poderia culminar no silenciamento gênico, o que tem sido relacionado ao desenvolvimento de câncer. De modo geral as ilhas CpG metiladas não são capazes de serem transcritas da forma em que se encontram. Caso o padrão de metilação seja ignorado por alterações nos fatores de transcrição que modelam a cromatina, tais como a remoção das proteínas que se ligam as citosinas metiladas e as deacetilases, o processo transcorre normalmente (Bakker et al., 2002; Pruitt et al., 2006).

Os estudos de metilação do DNA relacionados à progressão tumoral particularmente objetivam a análise do padrão de metilação das ilhas CpG na região promotora dos genes, embora aproximadamente 40% dos genes não possuam ilhas CpG na suas regiões promotoras (Takai & Jones, 2002). O interesse nas ilhas CpG reside no fato de que a metilação destas é responsável por causar o silenciamento de genes tanto fisiológico como patológico. Além disso, não pode ser desconsiderada a metilação nas regiões promotoras de genes que não possuam ilhas CpG, embora não tenha sido estabelecido que a metilação da citosina nestes promotores seja a causa do bloqueio da transcrição (Jones & Baylin, 2007). Estudos realizados por Futscher et al. (2002) mostraram uma forte associação entre a expressão de *Maspin* e a metilação de citosinas que não pertencem a ilha CpG. Outro estudo avaliou o perfil

de metilação dos cromossomos humanos 6, 20 e 22, e revelou que 17 % dos 873 genes analisados estavam diferencialmente metilados, e que aproximadamente um terço mostrou relação inversa entre metilação e transcrição (Eckhardt et al., 2006).

Diversos estudos têm associado a presença de metilação com a infecção por *H. pylori*, entre eles, o estudo realizado por Kang e colaboradores (2008) no qual foram analisados os perfis de metilação de 27 genes selecionados em amostras provenientes de pacientes com câncer gástrico e gastrite crônica. Neste estudo foi observado que o número de genes metilados foi significativamente maior nas amostras de câncer gástrico do que nas provenientes de pacientes com gastrite crônica, e que a infecção por *H. pylori* esteve fortemente associada com a hipermetilação das ilhas CpG nas amostras de câncer gástrico. Outro estudo realizado por Perri e col. (2007) no qual foi avaliado o padrão de metilação na região promotora de diversos genes em amostras de pacientes infectados com *H. pylori*, antes e após o tratamento para erradicação da bactéria, concluíram que a infecção pela bactéria está associada com a metilação dos genes estudados e após a sua erradicação observou-se uma diminuição nos níveis de metilação.

Além da importância da metilação do DNA no desenvolvimento de câncer somam-se as modificações da cromatina como as modificações covalentes de histonas que poderiam controlar a transcrição. Neste sentido, Jenuwein e col. (2006), mostraram que a deacetilação de histona e a metilação de resíduos específicos de lisina como a lisina 9 na histona 3 e a lisina 27 na histona 3 participam claramente no silenciamento gênico. Estudos realizados por Jones e col. (1998) e Nan et col. (1998) mostraram que as citosinas metiladas nas ilhas CpG

podem atrair proteínas que se ligam no domínio do DNA metilado e deacetilases de histonas durante a compactação da cromatina. Do mesmo modo, as proteínas que se ligam ao DNA metilado (MBD2) interagem com o complexo remodelador do nucleossomo e direciona este complexo ao DNA metilado (Zhang et al., 1999). Assim, estes três processos que incluem a metilação das citosinas na região promotora do DNA, as modificações de histonas e a remodelação da cromatina são processos intimamente relacionados que podem, quando alterados, resultar no silenciamento permanente de genes relevantes no desenvolvimento do câncer.

III-JUSTIFICATIVA

Embora diversos estudos epidemiológicos indiquem que a infecção pelo *H. pylori* esteja relacionada com o desenvolvimento do câncer gástrico, o papel da bactéria na gênese do câncer ainda é controverso, pois apesar de haver uma alta prevalência da infecção, menos de 1% dos indivíduos infectados desenvolvem a doença. No desenvolvimento do câncer estão envolvidas alterações genéticas e epigenéticas que levam ao silenciamento de genes supressores tumorais e a expressão de oncogenes. Entre as alterações epigenéticas que inibem a transcrição gênica estão os RNA não codificadores, as modificações covalentes da cromatina, e a metilação do DNA. Algumas evidências mostram que a interação da bactéria com a superfície do epitélio gástrico leva a um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, que exacerbam a resposta inflamatória. A persistência desta resposta imune leva a inflamação crônica, que é um dos fatores associados com a metilação do DNA. Tendo em vista o que foi anteriormente exposto, nós propusemos a estudar a influência da infecção por *H. pylori* e o tempo de exposição à bactéria no padrão de metilação de diversos genes em crianças e adultos com gastrite crônica, e pacientes adultos com câncer gástrico.

IV- OBJETIVOS

1-OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da infecção por *H. pylori* no padrão de metilação de genes relacionados à carcinogênese gástrica.

2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de metilação de 106 genes em amostras oriundas de pacientes infectados por *H. pylori* com gastrite crônica e câncer gástrico;
- Avaliar os efeitos da infecção por *H. pylori* no padrão de metilação após co-cultura;
- Avaliar o padrão de metilação dos genes selecionados no banco de DNA de pacientes com gastrite crônica e com câncer gástrico da UNIFAG/USF;
- Avaliar os níveis de expressão dos genes selecionados e associar com seus padrões de metilação;
- Detectar a instabilidade de microssatélite dos marcadores BAT-25, BAT-26, D2S123, D17S250 no banco de DNA de pacientes com gastrite crônica e com câncer gástrico da UNIFAG/USF, e associar tais resultados com os padrões de expressão e metilação dos genes de reparo *MLH1* e *MGMT*.

V-PACIENTES E MÉTODOS

1-METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O *SCREENING* INICIAL DO PERFIL DE METILAÇÃO

1.1 Cocultura

A linhagem de *H. pylori* SS1 (Lee et al., 1997) foi cultivada em Agar Columbia (Oxoid) suplementado com 10% de sangue de carneiro e incubada em condições de microaerofilia.

Para o ensaio de cocultura foi utilizada uma linhagem celular epitelial gástrica humana, PG100 (Cell Bank, Rio Janeiro-RJ). Esta linhagem foi cultivada em meio DMEN (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina - estreptomicina.

A suspensão bacteriana foi acrescentada numa multiplicidade de infecção (MOI) de 200:1 bactéria *per* célula durante 48 horas. O DNA extraído foi utilizado para a realização do ensaio de metilação global, para o qual utilizamos *Gastric Cancer DNA Methylation PCR Array* (SA Biosciences, USA).

1.2 *Promoter Methylation Array*

Para a triagem do padrão de metilação utilizou-se o *Promoter Methylation Array* (Panomics, USA). Para tal, foram incluídas amostras provenientes de 5 pacientes, sendo 1 *H. pylori* negativo; 3 *H. pylori* positivos infectados com linhagens de diferentes padrões de virulência e 1 com câncer gástrico.

Para a realização do método, aproximadamente 200 ng de DNA das amostras foram digeridos com a enzima de restrição *MseI* o que permitiu isolar o DNA com as ilhas CpG. O DNA digerido foi transferido para uma coluna de purificação e logo foi eluído. Posteriormente, foram adicionados adaptadores nos extremos cortados com a enzima de restrição. Assim, o DNA adaptado foi incubado com a proteína MBP (*methylation binding protein*) para formar o complexo Proteína/DNA metilado. Estes complexos foram separados em de colunas de separação e o DNA metilado foi isolado. Na etapa seguinte o DNA metilado foi marcado com biotina dCTP via PCR e hibridizado na membrana, conforme ilustrado na Figura 1. Os resultados gerados foram analisados no *ImageQuant* 350 (GE Healthcare, UK).

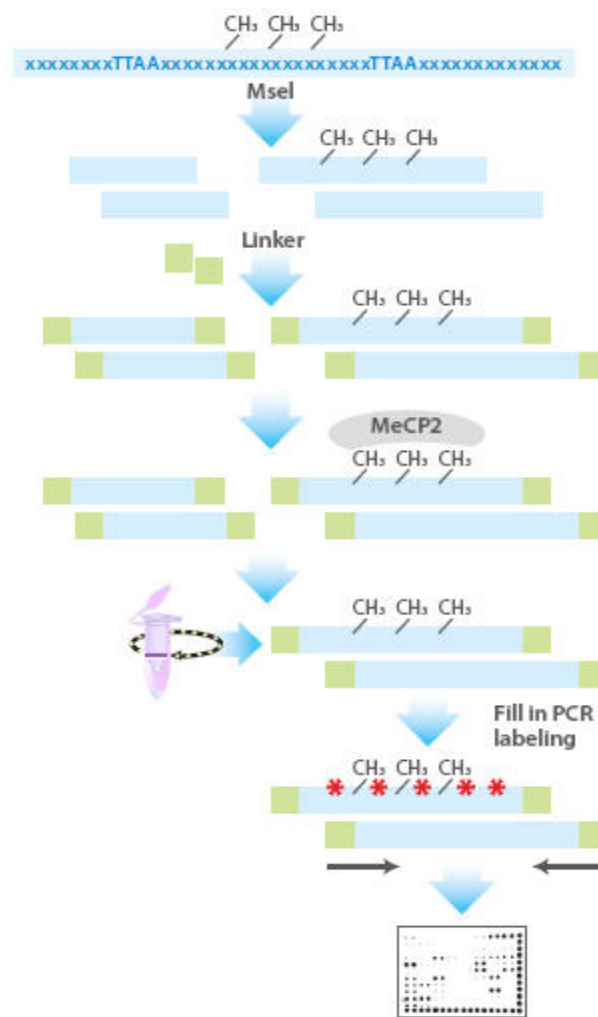


Figura 1. Diagrama esquemático do procedimento do *Promoter Methylation Array*.

1.3 Gastric Cancer DNA Methylation PCR Array

Para a triagem do padrão de metilação também se utilizou o *Gastric Cancer DNA Methylation PCR Array* (SABiosciences, USA). Para tal, foram usadas amostras provenientes da cocultura.

Este método baseia-se na detecção de DNA remanescente inicial após a sua restrição com enzimas sensíveis e/ou enzimas resistentes à metilação. Estas

enzimas digerem DNA não metilado e metilado, respectivamente. Após a digestão, o DNA é quantificado por PCR em tempo real em cada reação de restrição individual, utilizando iniciadores que flanqueiam a região promotora do gene de interesse. As frações relativas de DNA hipermetilado, intermediariamente metilado e DNA não metilado são subsequentemente determinadas por comparação de cada digestão com a digestão do *mock* (sem enzimas de restrição).

A primeira etapa do procedimento consiste em preparar as reações de digestão. Foi preparado um mix contendo 1 µg de DNA, tampão de digestão e água livre de RNases e DNases. Este mix foi dividido em quatro tubos de 1,5 mL identificados como Mo, Ms, Md e Msd. No tubo identificado como Mo não foram acrescentadas as enzimas de restrição, este *mock* representa a quantidade total de DNA. No Ms foi acrescentado 1 µL da enzima HpaII (New England Biolabs Inc, USA), enzima sensível a metilação, que digere DNA não metilado e o parcialmente metilado. Ao Ms foi acrescentado 1 µL da enzima MseI (New England Biolabs Inc, USA), dependente de metilação, que preferencialmente digere DNA metilado. E ao tubo Msd foram acrescentados 1µL de ambas enzimas, onde tanto o DNA metilado como o não metilado são digeridos. As reações foram incubadas em banho seco a 37°C durante 6 h. Após a incubação as reações foram detidas inativando as enzimas a 65°C durante 20 min. Concluída a digestão foram montados os mix individuais para PCR para cada um dos quatro tubos (Mo, Md, Ms, Msd). As reações foram feitas usando o *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, USA) seguindo as especificações do fabricante.

Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 97°C por 15 s, anelamento a 72°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 3 min, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o C_t (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do *RQ Study Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As quantidades relativas de DNA de cada fração (metilada, metilada intermediária, e não metilada) foram calculadas usando o método padrão do ΔC_t , normalizando a quantidade de DNA de cada fração em relação a quantidade total de DNA presente na fração *mock*.

2-AVALIAÇÃO EM PACIENTES

2.1 Pacientes

Foram incluídos 239 pacientes, dos quais 50 são crianças com queixas dispépticas, de ambos os sexos com idade variando entre 2 e 18 anos (média de idade=8±4 anos; 47% meninos, 53% meninas), e 189 adultos, dos quais 97 com idades entre 19 e 75 anos tiveram diagnóstico de gastrite crônica (média da idade=35±13 anos; 33% homens, 67% mulheres), e 92 pacientes com idades entre

33-88 anos com câncer gástrico (média da idade=60±12 anos, dos quais 82% foram homens e 18% mulheres).

Foram excluídos pacientes com cirurgia gastroduodenal anterior, que já tinham sido tratados com esquema antimicrobiano para erradicação do *H. pylori*, que tinham feito uso de antiinflamatórios não esteroidais e/ou inibidores de bomba de prótons nos últimos três meses, tabagistas, alcoolistas, usuários de drogas e pacientes que tinham feito uso de drogas terapêuticas nos últimos 30 dias. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

2.2 Biopsias

Para o desenvolvimento deste trabalho foram obtidas biopsias gástricas durante o procedimento endoscópico. Nos pacientes com câncer gástrico uma biopsia adicional foi retirada na região do tumor.

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

2.3 Extração de DNA & análises por PCR

Um fragmento de biopsia de cada paciente foi utilizado para a extração de DNA genômico, que foi realizada de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio

adaptado por Fox et al. (1994). Em resumo, após a coleta do fragmento de biopsia, este foi ressuspenso em 300 µL de solução tampão (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0; tween 0,5%), adicionando 15 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL). As amostras foram incubadas à 37°C por pelo menos 2 horas. Em seguida, o DNA foi purificado por meio de centrifugações com Fenol/Clorofórmio, e precipitado com acetato de sódio 3M.

A detecção molecular do *H. pylori* foi realizada através da amplificação, por PCR, do gene *SSA* (*Species-specific antigen*) usando os iniciadores descritos por Mikula et al. (2003). As sequências dos iniciadores que foram usados estão descritas na Tabela 1.

O gene *SSA* foi amplificado por meio da reação de PCR (Saiki et al., 1989) com 50 µL de volume final contendo 2,5 µL de DNA genômico, 20 pmol de cada iniciador, 200 µM de cada dNTPs (0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dTTP), 1,5% de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase e tampão de reação para a enzima.

Tabela 1 –Iniciadores para o detecção de *H. pylori*.

Gene	Iniciador	Sequência (5'→3')	PCR (pb)	Referência
SSA	SSA-F	TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC	300	Mikula et al., 2003
SSA	SSA-R	CCTGCTGGGCATACTTCACCATG		

2.4 Tratamento com bissulfito de sódio

As biopsias gástricas foram utilizadas para a extração de DNA genômico, a qual foi realizada de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio. As amostras de DNA genômico extraído (1 ng -2 µg) foram tratadas com bissulfito de sódio com o objetivo de converter as citosinas não metiladas em uracila, este procedimento foi realizado com a utilização do *EpiTec bisulfite kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA).

2.5 Análise do padrão de metilação por MSP – PCR

Para a análise do padrão de metilação foi utilizado o método MSP (*methylation-specific PCR*) descrito por Herman e col., 1996. Esta análise compreende a modificação inicial do DNA com bissulfito de sódio, o que converte as citosinas não metiladas em uracila, entretanto as citosinas metiladas (5-metil citosinas) são resistentes a esta modificação, permanecendo como citosinas, seguido da amplificação subsequente com iniciadores específicos para DNA metilado e iniciadores para DNA sem metilar (Tabela 2).

A PCR foi realizada da seguinte maneira, para um volume final de 25 µL, 200 ng de DNA tratado com bissulfito, 2,5 µL 10X Tampão PCR, 1 µmol/L iniciador 1,5-2,0 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase (Invitrogen Life technologies), sendo amplificada por 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos a 58-60°C por 30 segundos e 72 °C por 15 segundos e 72 °C por 1 minuto.

Tabela 2 – Iniciadores para análise de metilação.

Gene		Iniciador sense (5'—3')	Iniciador antisense (5'—3')	Referências
<i>MGMT</i>	M	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTCGC	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	Esteller et al.,2002
	U	TTTGTGTTTTGATGTTTGTGTTGTTAGGTTTTGT	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	
<i>MLH1</i>	M	TATATCGTTCGTAGTATTCGTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	Kang et al.,1999
	U	TTTTGATGTAGATGTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	
<i>THBS1</i>	M	TGCGAGCGTTTTTTTAAATGC	TAACTCGCAAACCAACTCG	Ueki et al.,2000
	U	GTTTGGTTGTTGTTTATTGGTTG	CCTAAACTCACAACCAACTCA	
<i>GATA-4</i>	M	GTATAGTTTCGTAGTTTTCGTTTAGC	AACTCGCGACTCGAATCCCCG	Guo et al., 2004
	U	TTTGTATAGTTTGTAGTTTGTGTTTAGT	CCCAACTCACAACCTCAAATCCCCA	
<i>GATA-5</i>	M	AGTTCGTTTTTAGGTTAGTTTTCGGC	CCAATACAACATAACGAACGAACCG	Guo et al., 2004
	U	TGGAGTTTGTTTTTAGGTTAGTTTTTGGT	CAAACCAATACAACATAACAAACAAACCA	
<i>HIC1</i>	M	TCCGTTTT CGCGTTTGTTCGT	AACCGAAAACATCAAC CCTCG	Dong et al., 2001
	U	TTGGGTT TGGTTTTGTGTTTTG	CACCCTAACACCACC CTAAC	

2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

Um fragmento de biopsia foi destinado à extração de RNA. Para a estabilização e proteção do RNA, após a endoscopia, todas as amostras destinadas a este fim foram armazenadas em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA. Esta foi feita usando-se o *RNeasy® tissue kit* (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração ~100 µg de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.7 Quantificação da expressão por PCR em tempo real

Os genes que apresentaram um padrão de metilação alterado nos métodos descritos anteriormente foram selecionados para a análise de expressão, a qual foi realizada por meio da PCR em tempo real. A Tabela 3 mostra a sequência de iniciadores utilizados na PCR em tempo real. A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o C_t (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do *RQ Study Software* (Applied Biosystems). Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t usada para avaliação da expressão gênica. As amostras foram normalizadas usando-se o controle constitutivo. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabela 3 – Iniciadores Humanos (*Homo sapiens*) para PCR em tempo real.

Gene	Iniciador sense(5'→3')	Iniciador antisense(5'→3')
<i>β-actina</i>	ACACTGGCTCGTGTGACAAGG	CGGCTAATACACACTCCAAGGCG
<i>MGMT</i>	CACCACACTGGACAGCCCTTT	CGAACTTGCCCAGGAGCTTTATTTG
<i>MLH1</i>	CGGTTACTACCAATGCCTCAACG	TTCTCGACTAACAGCATTTCCAA
<i>TFF1</i>	TTGTGGTTTTCTGGTGTCA	GGGACGTCGATGGTATTAGG
<i>THBS1</i>	GACAACAACGTGGTGAATGG	CTGGACAGCTCATCACAGGA
<i>GATA-5</i>	AGAGACTGGGTCTGCTGGAG	CTCACCAGCCTTCTTGCTCT
<i>GATA-4</i>	GTGTGTCAACTGTGGGGCTA	TGCCGTTTCATCTTGTTGGTAG
<i>HIC1</i>	CGAGGAGACCGGTAGCAG	TGCACACGTACAGGTTGTCA

As reações foram feitas usando o SybR Green Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, USA) seguindo as especificações do fabricante. Em resumo, para um volume final de 50 μ L foram adicionados 25 μ L do Platinum®SuperMix, 1 μ L (10 μ M) de cada iniciador e 10 μ L do cDNA (100 ng).

Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 59°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

2.8 Análise da instabilidade de microssatélites

A análise da instabilidade de microssatélites foi realizada por PCR usando os iniciadores específicos para cada um dos marcadores BAT-25, BAT-26, D17S250 e D2S123 (Ping et al., 2005) (Tabela 4).

Tabela 4 – Iniciadores para análise de MSI.

Marcador	Iniciador	Amplicon (pb)
<i>BAT-25</i>	5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'	90
<i>BAT-26</i>	5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3' 5'-AACCATTCAACATTTTAAACC-3'	80-100
<i>D17S250</i>	5'-GGAAGAATCAAATAGACAA-3' 5'-GCTGGCCATATATATTTAAACC-3'	150
<i>D2S123</i>	5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' 5'-GGACTTTCACCTATGGGAC-3'	197-227

A PCR foi realizada da seguinte maneira, para um volume final de 25 µL, 200 ng de DNA, 2,5 µL 10X Tampão PCR, 1 µmol/L iniciador, 1,5-2,0 mmol/L de MgCl₂, 200 µmol/L dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase, sendo amplificada por 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos a 55-58°C por 30 segundos e 72 °C por 15 segundos e 72 °C por 1 minuto.

Após a reação de PCR as amostras foram desnaturadas usando o protocolo de *single strand conformation polymorphism* (SSCP), em resumo, 12 µL do produto de PCR foi misturado com 12 µL de tampão denaturante (Formamida 95 %, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol), denaturado a 97 °C durante 7 minutos, e logo aplicado num gel de poliacrilamida ao 8%. As bandas foram visualizadas depois de coradas pela tintura de prata.

3-ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *H. pylori* NA MODULAÇÃO DE *GATA-5* E *TFF1* *IN VIVO* E *IN VITRO*.

3.1 Análises *in vitro*: bactérias, cocultura e infecção

As linhagens de *H. pylori* B128, B128 ΔcagM foram cultivadas nas mesmas condições citadas anteriormente para linhagem SS1. Para o ensaio de cocultura foi utilizada a linhagem celular epitelial gástrica humana, AGS (AGS: adenocarcinoma gástrico, CRL-1739, ATCC-LGC®). Esta linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina - estreptomicina. As bactérias foram acrescentadas numa multiplicidade de infecção de (MOI) de 200:1 bactéria *per* célula durante 6, 24 e 48 horas.

O RNA isolado destes ensaios foi utilizado para sintetizar cDNA para análise da expressão de *GATA-5* e *TFF1* em diferentes tempos de infecção. Foi realizado também a análise de expressão de *GATA-5 in vivo*, em amostras provenientes de camundongos cronicamente infectados com a linhagem de *H. pylori* SS1, linhagem com a capacidade de colonizar o estômago de camundongos por mais de 12 e 18 meses.

3.2 Análise *in vivo*: modelo animal

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos de seis meses de idade (Charles Rivers, France). Foram divididos em dois grupos de 12 animais cada um e inoculados por gavagem com a suspensão de *H. pylori* SS1 (n = 12; UFC=10⁷) ou caldo de peptona (n=12). Depois de 6 e 12 meses os animais foram sacrificados e os estômagos foram removidos para a análise histológica e isolamento do DNA e RNA (Touati et al., 2003). Todos os experimentos foram realizados de acordo as recomendações do *Central Animal Facility Committee* (Instituto Pasteur) e do *French Ministry of Agriculture*.

3.3 Análise da expressão gênica

O RNA foi isolado das células provenientes da cultura e do estômago dos camundongos utilizando a extração por TRIzol (Life Technologies). Após a extração ~100 µg de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram desenhados iniciadores para *GATA-5* e *GAPDH* (*Homo sapiens* e *Mus musculus*) (Tabela 5) e a

análise quantitativa da expressão gênica foi realizado por PCR em tempo real no equipamento *StepOne* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram realizadas em triplicata e foram calculadas as medias dos Ct (*Threshold cycle*).

A expressão de *GATA-5* foi normalizada com o gene constitutivo *GAPDH*, e a expressão relativa foi calculada de acordo a fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Tabela 5. Iniciadores camundongos (*Mus musculus*) para PCR em tempo real.

Gene	Iniciador sense(5'→3')	Iniciador antisense(5'→3')
<i>mGAPDH</i>	CCAGAACATCATCCCTGCAT	TTCCAGTAGGGTCTCGACTTG
<i>mGATA-5</i>	CTCAGGATCCACAGCAAACA	CCAGACTGGACTCTGCCTTC

4-ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA). Para avaliar a influência da infecção na expressão gênica usamos o teste *t* de *Student*. Em relação ao padrão de metilação, primeiramente avaliamos a influência da infecção na metilação por meio de χ^2 , nos indivíduos infectados avaliamos a influência da metilação na expressão gênica por teste *t* de *Student*. Quanto à instabilidade de microssatélite, realizamos a análise estatística usando o teste χ^2 . As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

VI-RESULTADOS

1-TRIAGEM INICIAL DO PADRÃO DE METILAÇÃO

Com o objetivo de determinar os possíveis genes que apresentam padrão de metilação alterado em relação à infecção por *H. pylori*, foi realizado uma triagem, para o qual foi utilizado um *array* que analisa simultaneamente o estado de metilação de 82 regiões promotoras diferentes (*Promoter methylation Array*, Panomics) e um *array* específico para 24 genes comumente alterados no câncer gástrico (*Gastric cancer DNA Methylation PCR array*, SABiosciences).

1.1 *Promoter methylation array*

Os resultados obtidos mostraram que a mucosa não tumoral adjacente ao tumor e a biopsia oriunda do paciente não infectado apresentavam um padrão similar de metilação do DNA, que correspondeu ao 8,5% (7/82). Além disso, verificou-se que 21% (17/82) dos genes avaliados estavam hipermetilados na amostra oriunda do tecido tumoral, e 13% (11/82) foram considerados hipermetilados na biopsia proveniente do paciente infectado pela bactéria. A análise comparativa indicou que 8,5% (7/82) desses genes encontravam-se hipermetilados tanto na amostra isolada do paciente com câncer gástrico quanto no paciente com gastrite crônica infectado pelo *H. pylori*. Entre esses, os genes metilados foram: *GPC-3* e *RBL1* (ciclo celular), *TFF1* e *MASPIN* (genes supressores tumorais), *GATA-3* (fator de transcrição), *MGMT* e *MLH1* (reparo ao DNA).

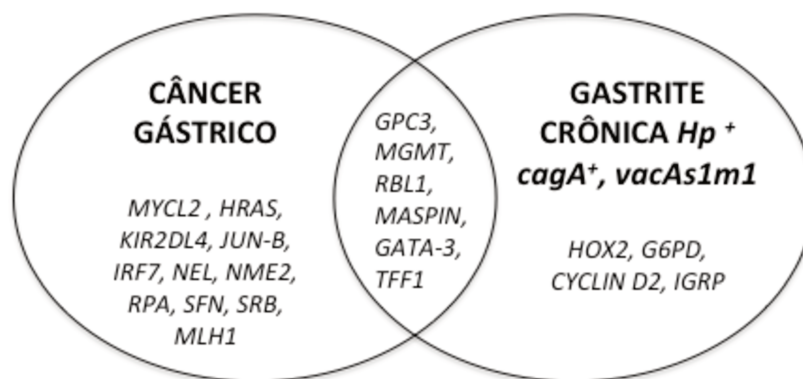


Figura 2. Genes metilados em amostra de câncer gástrico e gastrite crônica infectado com linhagem mais virulenta.

1.2 Gastric cancer DNA methylation PCR array

1.2.1 Análise de amostras provenientes de pacientes

Para a realização da análise de metilação selecionamos 4 pacientes, a saber:

(1) paciente com gastrite crônica *H. pylori* positivo *cagA*⁺, *vacAs1m1* (infectado por linhagens consideradas mais virulentas); (2) paciente com gastrite crônica *H. pylori* positivo *cagA*⁺, *vacAs1m2* (virulência intermediária); (3) paciente com gastrite crônica *H. pylori* positivo *cagA*⁺, *vacAs2m2* (menos virulenta) e (4) *H. pylori* negativo.

A análise comparativa indicou que 12,5% (3/24) dos genes encontravam-se hipermetilados nas amostras 2 e 3. Já a amostra 1, considerada a mais virulenta, apresentou 25,0% (6/24) dos genes hipermetilados. A análise comparativa destas amostras mostrou que os genes hipermetilados nas amostras 2 e 3 (*CDNK1C*, *PTGS2* e *RASSF1*) também estavam hipermetilados na amostra 1. Entretanto, os genes *HIC1*, *MGMT* e *THBS1* estavam hipermetilados somente na amostra 1 (Figura 3).

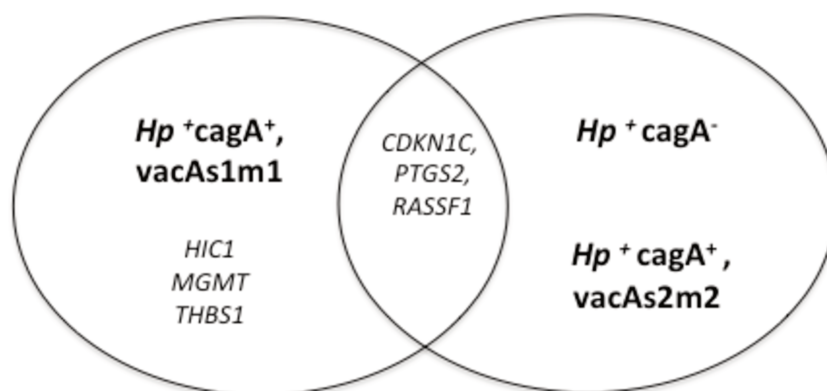


Figura 3. Genes metilados em amostras de gastrite crônica infectadas com linhagens mais e menos virulentas.

1.2.2 Análise de metilação após cocultura celular

Levando em consideração que nas amostras provenientes dos pacientes não é possível descartar a influência dos fatores próprios do hospedeiro e os ambientais aos quais este se encontra exposto realizamos esta avaliação também em amostras provenientes de cocultura. Os resultados obtidos mostraram que após cocultura houve um aumento no padrão de metilação em 12,5% dos genes avaliados após 48 h da infecção. Os genes que apresentaram hipermetilação da região promotora após cocultura foram *THBS1* e *CDH13* (supressor tumoral) e *GSTP1* (envolvido na prevenção do dano ao DNA).

Foram escolhidos os seguintes genes dentre as metodologias utilizadas para serem avaliados nas amostras do banco de DNA da UNIFAG/USF, a saber: *HIC1* e *THBS1* (supressão tumoral), e *MGMT* e *MLH1* (reparo de DNA), e foram incluídos também os fatores de transcrição *GATA-4* e *GATA-5* devido a que estão envolvidos no desenvolvimento e diferenciação gastrointestinal.

2-VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Serão descritos neste item a validação dos dados em relação aos genes *HIC1*, *THBS1*, *GATA-4*, *GATA-5*, *MLH1* e *MGMT*.

A validação dos resultados foi realizada nas amostras provenientes de fragmento de biopsia de mucosa gástrica de 239 pacientes, dos quais 189 são adultos com gastrite crônica ou câncer gástrico, e 50 são crianças com queixa dispéptica. Entre as crianças 22 (44%) foram consideradas *H. pylori* positivas, e 28 (66%) não infectados. Entre os adultos com gastrite crônica 83 (85%) foram considerados infectados com a bactéria e 14 (15%) *H. pylori* negativos. Dentre os 92 pacientes com câncer gástrico todos foram considerados *H. pylori* positivos.

2.1 *HIC1*

As amostras provenientes de crianças, tanto infectadas como as não infectadas não apresentaram metilação da região promotora deste gene. Resultados semelhantes foram observados nos pacientes adultos não infectados pela bactéria. Entretanto, nos pacientes com gastrite crônica *H. pylori* positivos 3,6% (3/83) apresentaram metilação da região promotora. Em relação aos pacientes com câncer gástrico, 5,5% (5/92) das amostras foram metiladas (Tabela 6).

Tabela 6. Padrão de metilação na região promotora de *HIC1* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos negativos e pacientes com câncer gástrico.

Pacientes	<i>HIC1</i>	
	Metilados	Não metilados
Crianças <i>H. pylori</i> neg.	0 (0%)	28 (100%)
Crianças <i>H. pylori</i> pos.	0 (0%)	22 (100%)
Adultos <i>H. pylori</i> neg.	0 (0%)	14(100%)
Adultos <i>H. pylori</i> pos.	3 (3,6%)	80 (96,4%)
Câncer gástrico	5 (5,5%)	87 (94,5%)

Posteriormente, foram determinados os níveis de expressão para este gene. Os resultados desta análise não mostrou diferenças significativas entre os pacientes infectados e não infectados, tanto nas amostras provenientes das crianças como nas provenientes dos adultos. Em relação às amostras dos pacientes com câncer gástrico, observou-se uma repressão significativa, quando comparados às amostras dos pacientes com gastrite crônica (Figura 4).

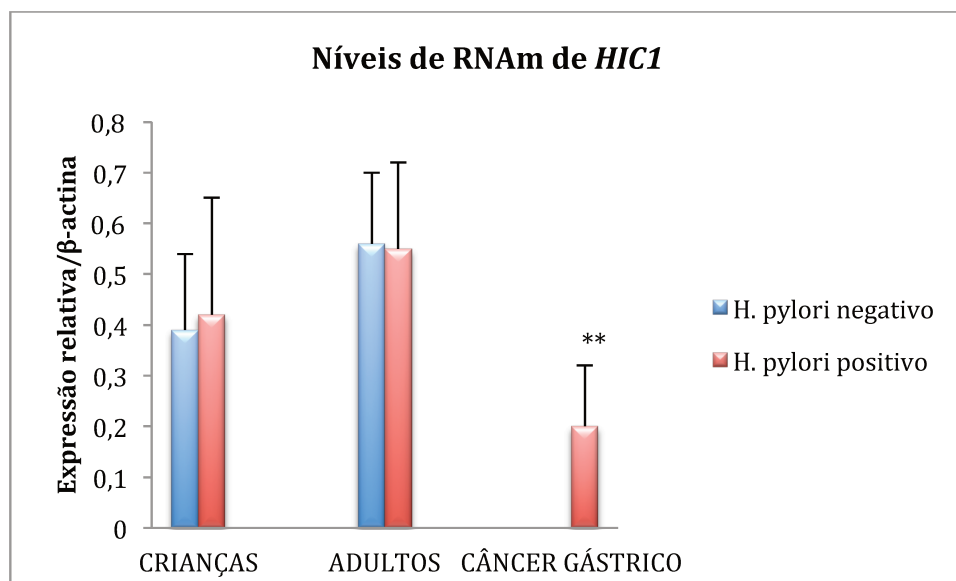


Figura 4. Níveis de RNAm de *HIC1* em biopsias gástricas de pacientes adultos e crianças. Os valores de RNAm estão expressos como média±SD. ** $p < 0.001$ quando comparado aos grupos crianças e adultos *H. pylori* negativo e positivo.

2.2 *THBS1*

A análise do padrão de metilação da região promotora de *THBS1* mostrou que entre as amostras provenientes de crianças infectadas 59,1% (13/22) apresentaram metilação na região promotora deste gene. Por outro lado, nas amostras oriundas de crianças não infectadas 14,3% (4/28) estavam metiladas. Em relação aos pacientes com gastrite crônica infectados pela bactéria, 86,7% (72/83) apresentaram metilação da região promotora, e 7,1% (1/14) entre os *H. pylori* negativos. Das amostras pertencentes aos pacientes com câncer gástrico 48,9% (45/92) foram metiladas (Tabela 7).

Tabela 7. Padrão de metilação na região promotora de *THBS1* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos e negativos e pacientes com câncer gástrico.

Pacientes	<i>THBS1</i>	
	Metilados	Não metilados
Crianças <i>H. pylori</i> neg.	4(14,3%)	24(85,7%)
Crianças <i>H. pylori</i> pos.	13(59,1%)**	9(40,9%)
Adultos <i>H. pylori</i> neg.	1(7,1%)	13(92,9%)
Adultos <i>H. pylori</i> pos.	72 (86,7%)**	11 (13,3%)
Câncer gástrico	45 (48,9%)	47(51,1%)

**p<0.001 comparado aos adultos e crianças *H. pylori* negativos .

Subsequentemente, foram avaliados os níveis de expressão de *THBS1*, e observou-se que entre as amostras metiladas os níveis de expressão foram significativamente mais baixos do que os níveis observados nas amostras não metiladas, tanto para as amostras provenientes de crianças como nos adultos. As amostras provenientes de pacientes com câncer gástrico apresentaram os níveis mais baixos de expressão, e não houve diferenças significativas entre as amostras metiladas e não metiladas neste grupo de pacientes (Figura 5).

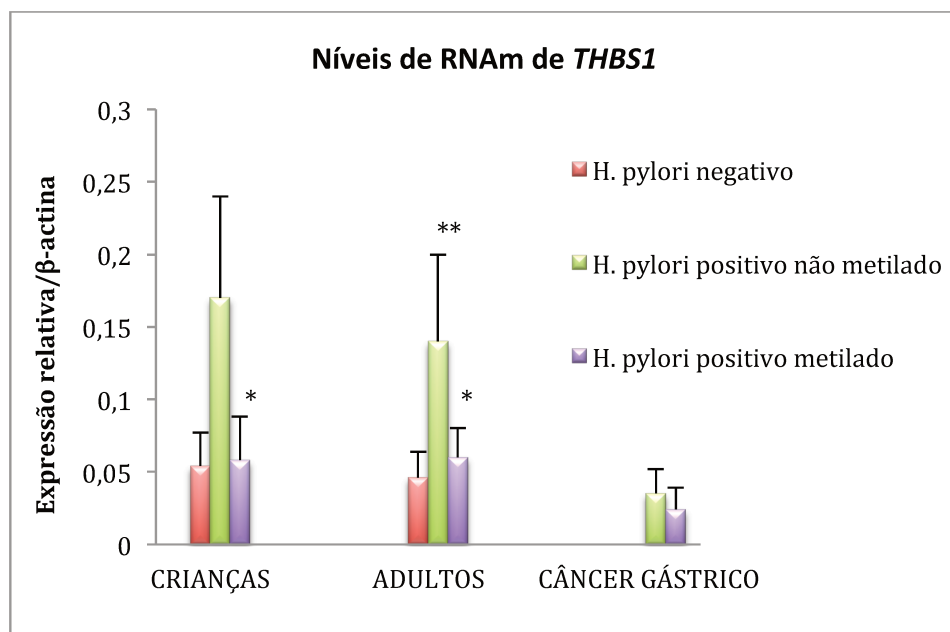


Figura 5. Níveis de RNAm de *THBS1* em biopsias gástricas de pacientes adultos e crianças. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD. * $p < 0.05$ quando comparados aos *H. pylori* positivos não metilados ** $p < 0.001$ quando comparados aos *H. pylori* negativos.

2.3 GATA-4

Os resultados relativos ao padrão de metilação de *GATA-4* mostraram que nas amostras provenientes de crianças infectadas 63,6% (14/22) estavam metiladas, e entre as não infectadas somente 7,1% (2/28) apresentaram metilação na região promotora deste gene. Em relação aos adultos, 80,7% (67/83) das amostras oriundas de pacientes com gastrite crônica infectados pela bactéria foram metiladas, e nenhuma amostra dos pacientes *H. pylori* negativos apresentou metilação para este gene. Nos pacientes com câncer gástrico 32,6% (30/92) das amostras foram metiladas (Tabela 8).

Tabela 8. Padrão de metilação na região promotora de *GATA-4* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos e pacientes com câncer gástrico.

Pacientes	<i>GATA-4</i>	
	Metilados	Não metilados
Crianças <i>H. pylori</i> neg.	2 (7,1%)	26(92,9%)
Crianças <i>H. pylori</i> pos.	14 (63,6%)*	8 (36,4%)
Adultos <i>H. pylori</i> neg.	0 (0%)	14 (100%)
Adultos <i>H. pylori</i> pos.	67(80,7%)**	16 (19,3%)
Câncer gástrico	30 (32,6%)	62(67,4%)

*p<0.05 comparado as crianças *H. pylori* negativos **p<0.001 quando comparado aos adultos *H. pylori* negativos.

Em relação aos níveis de RNAm para *GATA-4* foi observado uma repressão entre as amostras metiladas, tanto nas amostras provenientes de crianças quanto dos pacientes adultos. Os pacientes com câncer gástrico apresentaram os níveis mais baixos de expressão, entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras metiladas e as não metiladas (Figura 6).

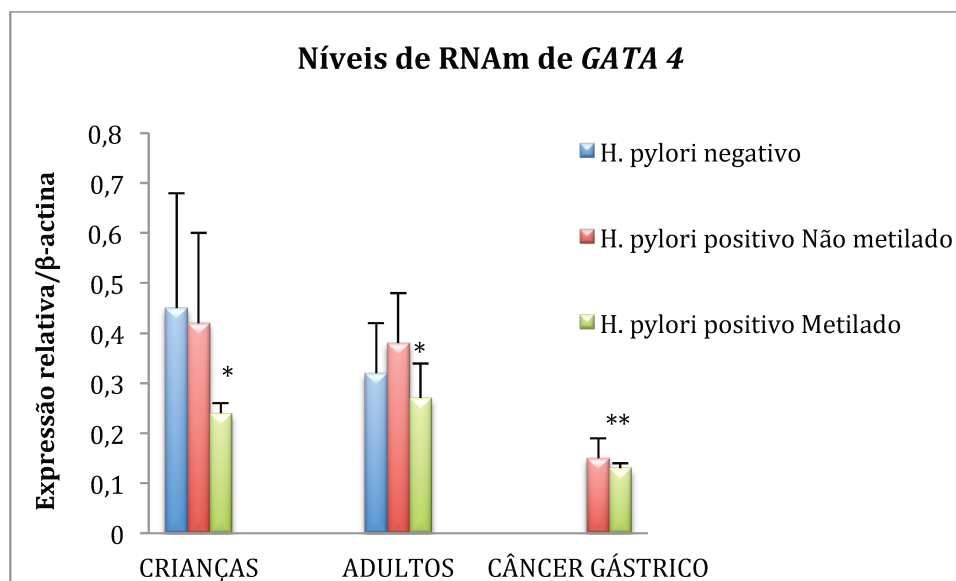


Figura 6. Níveis de RNAm de *GATA-4* em biopsias gástricas de pacientes adultos e crianças. Os valores de RNAm estão expressos como $\text{media} \pm \text{SD}$. * $p < 0.05$ quando comparados aos *H. pylori* positivos não metilados, ** $p < 0.001$ quando comparados aos adultos e crianças *H. pylori* positivos não metilados.

2.4 *GATA-5*

A frequência de metilação da região promotora de *GATA-5* nas amostras provenientes das crianças foi de 45,4% (10/22) entre aquelas considerada *H. pylori* positivas, e de 14,3% (4/28) entre as *H. pylori* negativas. Nas amostras pertencentes ao grupo dos adultos infectados com a bactéria 62,6% (52/83) estavam metilados, e entre os não infectados 7,1% (1/14). Nos pacientes com câncer gástrico 63,0% (58/92) apresentaram metilação na região promotora (Tabela 9).

Tabela 9. Padrão de metilação na região promotora de *GATA-5* em amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos e pacientes com câncer gástrico.

Pacientes	<i>GATA- 5</i>	
	Metilados	Não metilados
Crianças <i>H. pylori</i> neg.	4 (14,3%)	24 (85,7%)
Crianças <i>H. pylori</i> pos.	10 (45,4%)*	12 (54,6%)
Adultos <i>H. pylori</i> neg.	1 (7,1%)	13 (92,9%)
Adultos <i>H. pylori</i> pos.	52 (62,6%)*	31 (37,4%)
Câncer Gástrico	58 (63,0%)**	34 (37,0%)

*p<0.05 quando comparado aos *H. pylori* negativos **p<0.01 quando comparado aos *H. pylori* negativos;

Em relação aos níveis de expressão de RNAm de *GATA-5*, observou-se que entre as amostras metiladas os níveis estavam diminuídos tanto nas amostras provenientes das crianças como nos adultos. Os níveis de expressão nos pacientes com câncer gástrico foram os mais baixos em relação aos outros grupos estudados (Figura 7).

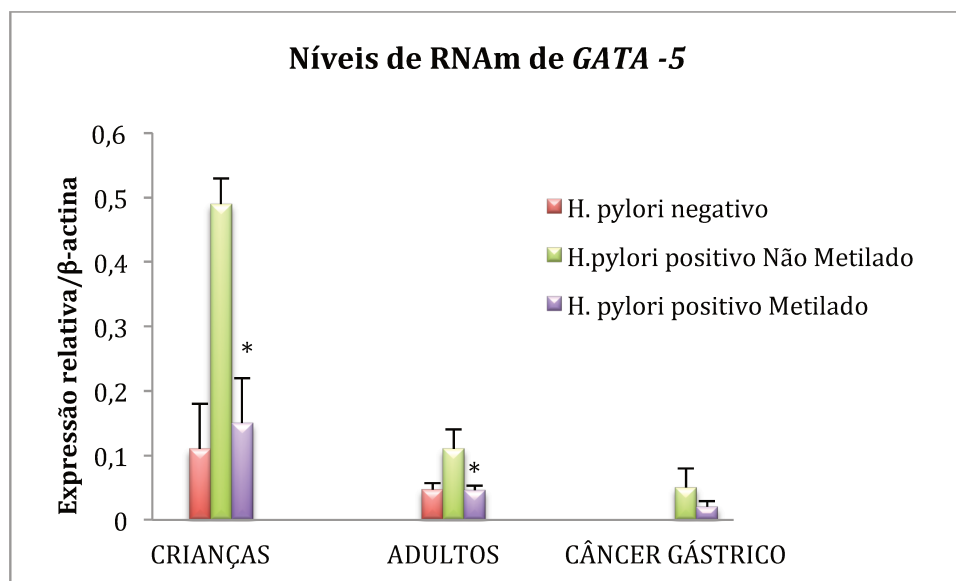


Figura 7. Níveis de expressão de *GATA-5* em biópsias gástricas de pacientes adultos e crianças. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD. * $p < 0.05$ quando comparado aos *H. pylori* positivo não metilado.

2.4.1 Avaliação da influência da infecção na regulação de *GATA-5* e *TFF1* *in vitro* e *in vivo*

2.4.1.1 Análises *in vitro*: cocultura

Com o objetivo de avaliar a influência da infecção por *H. pylori* na regulação de *GATA-5* e *TFF1*, foram realizadas coculturas com as linhagens *H. pylori* B128 e B128 Δ Cag M e a linhagem celular AGS durante 6, 24 e 48 horas.

Os resultados destas análises mostraram que houve um aumento na expressão de *GATA-5* após 6, 24 e 48 h de infecção, quando comparadas às células não infectadas. Entretanto, a expressão de *GATA-5* após 48 h de infecção, mesmo induzida, foi 3 vezes menor quando comparada a seus níveis após 24 h de infecção. Este aumento nos níveis de expressão para *GATA-5* foram independentes da presença de cag PAI (Figura 8). Já, os níveis de *TFF1* aumentaram após 48 h de

infecção e este aumento foi também independente de *cag* PAI (Figura 9).

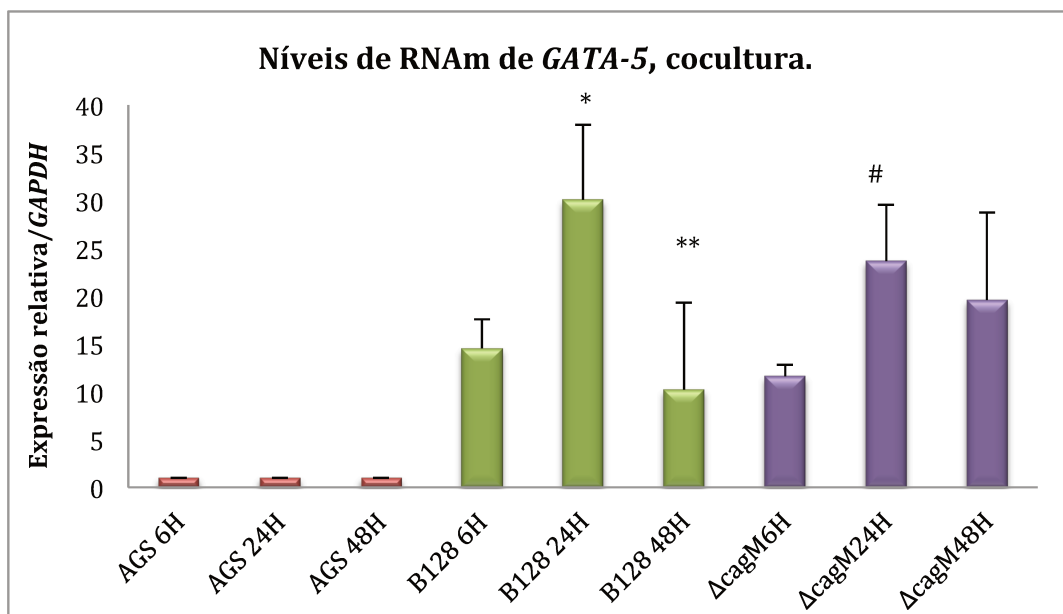


Figura 8. Efeito *in vitro* da infecção por *H. pylori* na expressão de *GATA-5*. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD. * $p < 0,05$ comparado a B128 6h; ** $p < 0,05$ comparado a B128 6h; # $p < 0,05$ comparado a ΔcagM 6h.

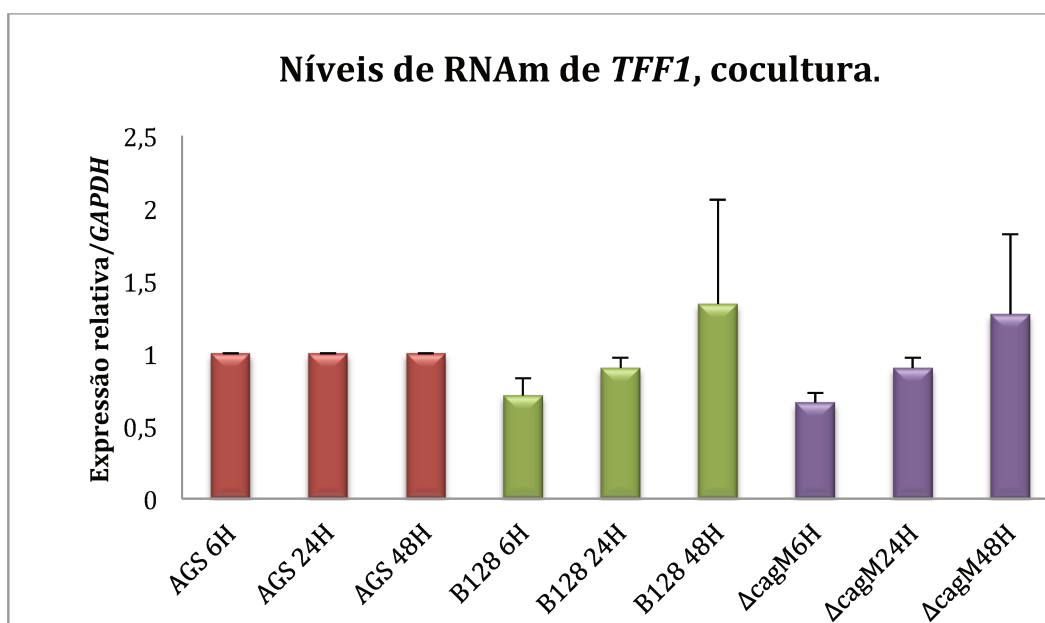


Figura 9. Efeito *in vitro* da infecção por *H. pylori* na expressão de *TFF1*. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD.

2.4.1.2 Análises *in vivo*: modelo animal

Posteriormente, avaliou-se a relevância destes resultados em camundongos cronicamente infectados com a linhagem SS1 durante 6 e 12 meses (Lee et al., 1997). Foi observado um aumento nos níveis de expressão de *GATA-5* após 6 meses de infecção. Após 12 meses não foi observado modulação deste gene pela infecção (Figura 10).

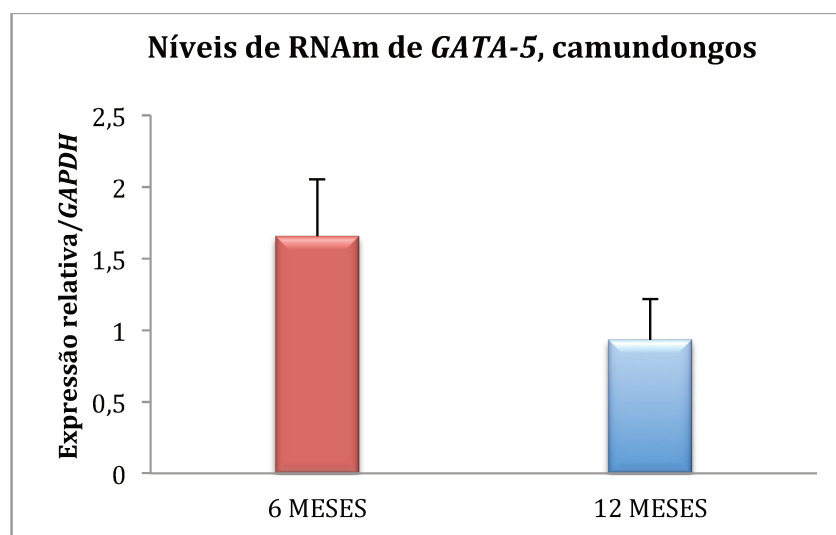


Figura 10. Efeito *in vivo* da infecção por *H. pylori* em camundongos na expressão de *GATA-5*. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD.

2.4.1.3 ANÁLISE *IN VIVO*: AMOSTRAS DE PACIENTES

O análise dos níveis de expressão de *TFF1* nas biopsias gástricas de crianças e adultos mostrou que ambas as amostras apresentavam níveis de expressão similares, independente da infecção por *H. pylori*. Entretanto foi observada uma diminuição entre as biopsias de pacientes com câncer gástrico (Figura 11). A análise de expressão de *TFF1* nas amostras de pacientes pediátricos e adultos, que

apresentavam metilação da região promotora de *GATA-5* revelou que a expressão estava diminuída (Figura 12).

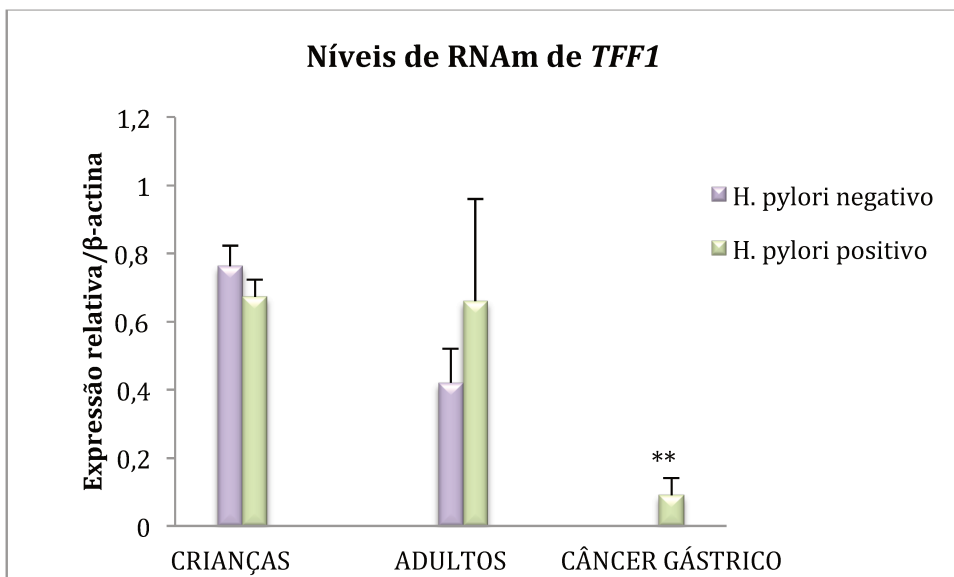


Figura 11. Níveis de expressão de *TFF1* nas biopsias gástricas de crianças e adultos. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD. **p<0.01 quando comparado as crianças e adultos *H. pylori* positivos.

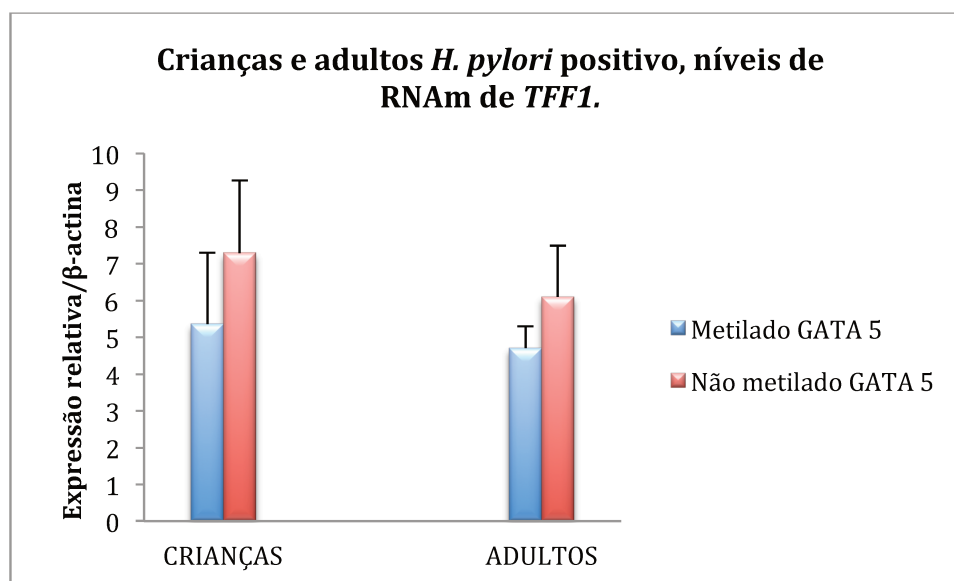


Figura 12. Níveis de expressão de *TFF1* em amostras de pacientes adultos e crianças infectados por *H. pylori* metilados na região promotora de *GATA-5*. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD.

2.5 *MLH1* e *MGMT*

A avaliação do padrão de metilação da região promotora de *MLH1* e *MGMT* nas amostras pediátricas indicou ausência de metilação tanto nas amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos como nas provenientes de pacientes *H. pylori* negativos. Entretanto, nas amostras pertencentes as biopsias extraídas de pacientes adultos com gastrite crônica, observou-se metilação na região promotora de *MLH1* em 13,2% (11/83) das amostras de pacientes infectados com *H. pylori*, e em 7,4% (1/14) das amostra dos pacientes sem infecção (Tabela 10). Os resultados provenientes das amostras de pacientes com câncer gástrico mostram hipermetilação na região promotora em 39,1% (36/92) das amostras (Tabela 10).

Em relação à *MGMT* observou-se que nos pacientes com gastrite crônica *H. pylori* positivos, 50,6% (42/83) das amostras estavam metiladas. Nos pacientes *H. pylori* negativos 21,4% (3/14) foram considerados metilados (Tabela 10). Nos pacientes com câncer gástrico foi observado metilação em 66,3% (61/92).

Tabela 10. Padrão de metilação nas regiões promotoras *MLH1* e *MGMT* em pacientes *H. pylori* positivos e negativos e pacientes com câncer gástrico.

Pacientes	<i>MLH1</i>		<i>MGMT</i>	
	Metilados	Não metilados	Metilados	Não metilados
Crianças <i>H. pylori</i> neg	-	28 (100%)	-	28 (100%)
Crianças <i>H. pylori</i> pos.	-	22 (100%)	-	22 (100%)
Adultos <i>H. pylori</i> neg.	1 (7,1%)	13 (92,9%)	3 (21,4%)	11 (78,6%)
Adultos <i>H. pylori</i> pos.	11 (13,2%)	72 (86,8%)	42 (50,6%)*	41 (49,4%)
Câncer gástrico	36 (39,1%) ^{###}	56 (60,9%)	61 (66,3%) ^{§§§}	31 (33,7%)

#p<0.05 comparado com *H. pylori* negativo ##p<0.001 comparado com *H. pylori* positivo ;*p<0.05 comparado com *H. pylori* negativo; § p<0.05 comparado com *H. pylori* positivo, e §§p<0.01 comparado com *H. pylori* negativo.

Os níveis de expressão de *MLH1* e *MGMT* foram analisados no contexto de metilação da região promotora destes genes, e foi observado que os níveis estavam reduzidos nas amostras metiladas de pacientes com gastrite crônica infectados com *H. pylori*, em comparação às não metiladas, e também em comparação com os pacientes *H. pylori* negativos (Figuras 13 e 14). Nas amostras provenientes de pacientes com câncer gástrico e em crianças observaram-se os menores níveis de expressão destes genes.

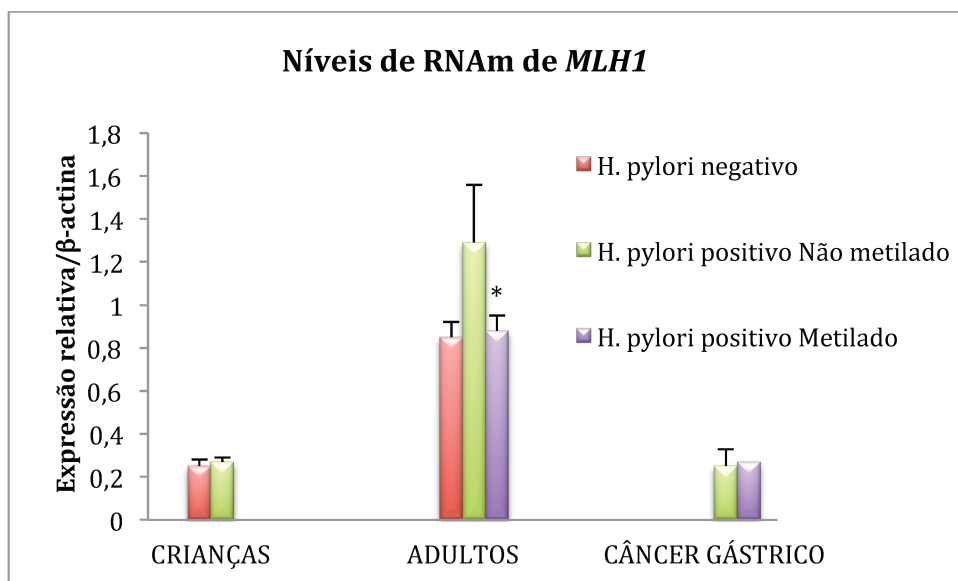


Figura 13. Níveis de expressão de *MLH1* nas biopsias gástricas de crianças e adultos. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD. * $p < 0.01$ quando comparados aos não metilados.

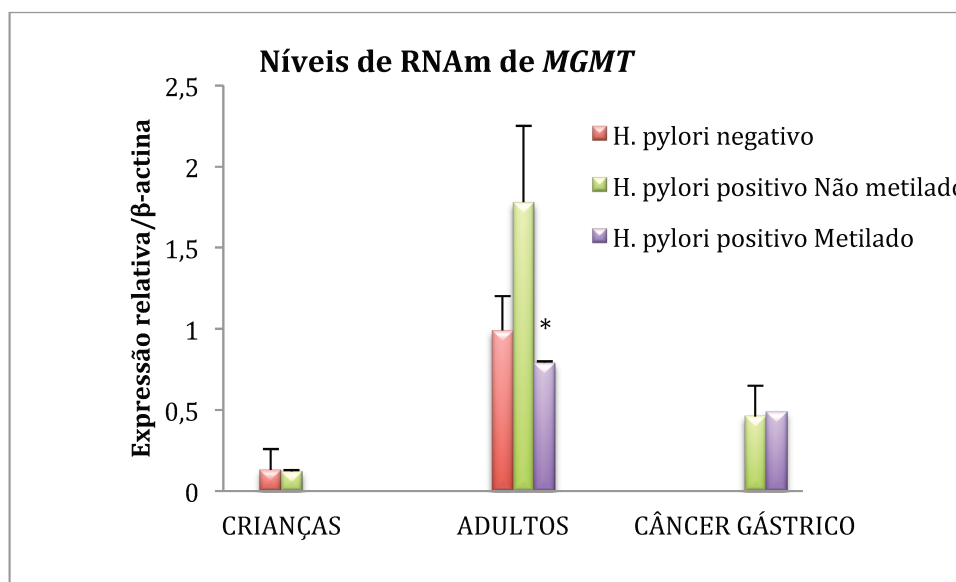


Figura 14. Níveis de expressão de *MGMT* nas biopsias gástricas de crianças e adultos. Os valores de RNAm estão expressos como a média $\pm$ SD. * $p < 0.01$ quando comparados aos não metilados.

3-ANÁLISE DA INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES (MSI)

A instabilidade genética está fortemente associada com a transformação neoplásica e à progressão tumoral. A MSI representa uma forma importante de instabilidade genômica associada com sistema de reparo do DNA defeituoso em tumores, caracterizada pelas expansões ou contrações de uma simples sequência repetida no DNA.

Analizou-se a instabilidade de microssatélites nas amostras provenientes de crianças. Não foi observada instabilidade de microssatélites entre as amostras provenientes de pacientes *H. pylori* positivos, entretanto entre os *H. pylori* negativos observou-se a presença de MSI em 7,1% (2/28) das amostras. Por outro lado, foi observado MSI em 61,4% (51/83) das amostras provenientes de pacientes adultos com gastrite crônica *H. pylori* positivos. Dentre as 51 amostras que apresentaram MSI, 37 apresentaram MSI- L (72,5%) e 14 foram MSI -H (27,5%). Em relação às amostras oriundas de pacientes com gastrite *H. pylori* negativo observou-se MSI em 64,3% (9/14) das amostras, sendo 6 MSI- L (66,6%) e 3 MSI- H (33,3%). Em relação às amostras provenientes de pacientes com câncer gástrico observamos MSI em 68,4% (63/92) das amostras, das quais 38 foram MSI- L (60,3%) e 25 MSI-H (39,6%) (Tabela 11). Ao compararmos os três grupos estudados não observamos diferenças entre o padrão de MSI entre os grupos de pacientes com gastrite crônica, independentemente da infecção por *H. pylori*. Em relação aos pacientes com câncer gástrico, observamos uma diferença significativa em relação aos outros grupos ($p=0,03$).

Tabela 11. Instabilidade de Microsatélites.

Pacientes	Instabilidade de Microsatélites			
	MSI-L	MSI-H	MSI	MSS
Crianças <i>H. pylori</i> negativo.	-	2 (7,1%)	2 (7,1%)	26 (92,9%)
Crianças <i>H. pylori</i> positivo.	-	-	-	22 (100%)
Adultos <i>H. pylori</i> negativo.	6 (66,6%)	3 (33,3%)	9 (64,3%)	5 (35,7%)
Adultos <i>H. pylori</i> positivo.	37 (72,5%)	14 (27,5%)	51 (61,4%)	32 (38,5%)
Câncer gástrico	38 (60,3%)	25 (39,6%)	63 (68,4%)*	29 (31,5%)

MSI-H quando mais de um marcador mostrou instabilidade. MSI-L quando só um marcador mostrou instabilidade. MSS quando nenhum marcador mostrou instabilidade.* $p < 0.05$ quando comparado as amostras *H. pylori* positivo.

Em relação ao marcador *BAT-25* nossos resultados mostraram que nos pacientes não infectados pela bactéria não foi detectada instabilidade, resultados semelhantes foram obtidos nas amostras oriundas de pacientes com gastrite crônica infectados pela bactéria. Por outro lado, ao analisarmos as amostras provenientes de pacientes com câncer gástrico observamos que 30,4% das amostras (28/92) apresentaram instabilidade para este marcador. Os dados referentes ao padrão de estabilidade de todos os marcadores estudados acham-se descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados para os marcadores *BAT-25*, *BAT-26*, *D2S123*, *D17S50*.

AMOSTRAS	MARCADORES			
	<i>BAT-25</i>	<i>BAT-26</i>	<i>D2S123</i>	<i>D17S250</i>
<i>H.pylori</i> negativo (n=14)	0 (0%)	4(26%)	5 (37%)	5(37%)
<i>H.pylori</i> positivo (n =83)	0 (0%)	19 (23%)	18 (22%)	22 (26 %)
Câncer gástrico (n=92)	28 (31%)	15 (16%)	22 (24%)	24 (26%)

VII-DISCUSSÃO

A metilação do DNA é uma das modificações epigenéticas mais importantes nos eucariotos. É essencial para a vida, e alterações no processo de metilação estão associadas, frequentemente, à carcinogênese. Um dos fatores que podem desencadear este mecanismo é a inflamação crônica, o que é uma característica da infecção por *H. pylori*. Levando em consideração que a metilação do DNA está envolvida na regulação da transcrição de genes associados à carcinogênese, foram avaliados os efeitos da infecção por *H. pylori* no padrão de metilação da região promotora de 106 genes. Dentre os genes analisados *THBS1*, *HIC1*, *GATA4*, *GATA5*, *MLH1* e *MGMT* mostraram-se influenciados pela presença da bactéria e foram avaliados em amostras provenientes de crianças e adultos.

A análise de amostras provenientes de crianças é um modelo natural interessante para o estudo da infecção por *H. pylori*, devido ao fato de que as crianças não estão usualmente submetidas a agentes irritantes da mucosa gástrica tais como, álcool, tabaco e drogas antiinflamatórias (Nan et al., 2005; Seitz & Stickel; 2007; Tahara et al., 2009). Outro ponto importante a se levar em consideração é que as mudanças que acontecem na mucosa gástrica das crianças infectadas, devido ao curto espaço de tempo transcorrido entre a aquisição da bactéria e a detecção da mesma, comparados aos adultos infectados, poderiam mostrar as mudanças que acontecem nos primeiros estágios da resposta inflamatória.

Os resultados deste estudo mostram que para os genes *GATA-4*, *GATA-5* e *THBS1* houve uma associação significativa entre a presença da bactéria e a metilação

da região promotora destes genes tanto nos pacientes com gastrite crônica quanto nas amostras provenientes de crianças.

Thrombospondin-1 (*THBS1*) é uma glicoproteína de matriz celular, multifuncional, envolvida em numerosos processos biológicos como adesão celular, angiogênese, metástase, inflamação, aterosclerose, homeostase e trombose (Chen et al., 2000; Adams et al., 2004). O papel desta proteína na progressão do câncer ainda é controverso, apresentando efeitos estimulatórios e inibitórios (Sid et al., 2004). A inibição do crescimento tumoral é geralmente atribuída a sua atividade antiangiogênica (Roberts, 1996).

Em relação a este gene os resultados obtidos são semelhantes aos relatados por Kang e colaboradores (2003), que analisaram amostras de pacientes pediátricos, adultos e adultos idosos que apresentavam gastrite crônica. Estes autores observaram a presença de metilação na região promotora deste gene, e além disso indicaram que a frequência da metilação aumentava conforme aumentava a idade dos pacientes. Por outro lado, não acharam uma associação significativa entre a metilação deste gene nos pacientes com gastrite crônica infectados por *H. pylori*. Provavelmente esta falta de associação pode ser atribuída a falhas na metodologia usada para detecção da bactéria, visto que foi avaliado somente um sítio gástrico e um único método para diagnóstico da infecção, histologia.

Nas amostras provenientes de pacientes com câncer gástrico foi observado hipermetilação na região promotora deste gene, e este evento está associado a uma repressão na expressão deste. Estes resultados concordam com os resultados

obtidos por Oue e colaboradores (2003) que relataram hipermetilação neste gene em 33% dos casos de câncer gástrico analisados, e além disso, a hipermetilação da região promotora também estava associada à diminuição dos níveis de RNAm. Subsequentemente, Guo e colaboradores (2010) descreveram 34,5% de metilação em amostras provenientes de pacientes com adenocarcinoma gástrico, também associada a uma redução nos níveis de RNAm. Além disso, relataram uma concordância significativa entre a hipermetilação e a falta de expressão protéica, o que poderia indicar que o silenciamento epigenético de *THBS1*, via metilação de sua região promotora, poderia ser um dos mecanismos críticos para a inativação deste gene. Por outro lado, embora Miyamoto e col. (2007) tenham reportado que em 44% dos pacientes com câncer gástrico estudados a região promotora deste gene estivesse metilada e associada a uma repressão gênica, estes autores observaram que entre as amostras não metiladas os níveis de RNAm também encontravam-se diminuídos. Nestes casos foi verificado um aumento na expressão de *WT1* (Wilms tumor 1), *in vivo* e *in vitro*, o que mostrou que a regulação deste gene não depende exclusivamente da metilação, mas também de outras proteínas com características oncogênicas que regulam a sua expressão.

Os nossos resultados indicam que a metilação deste gene está associada a infecção pelo *H. pylori* e que a mesma acontece nos estágios precoces da infecção. Embora a frequência de metilação nos pacientes com câncer gástrico sejam menores do que nos pacientes com gastrite crônica os níveis de RNAm encontram-se diminuídos, provavelmente devido a existência de outros mecanismos reguladores. Os níveis de expressão de *THBS1* se encontram geralmente elevados nos processos

inflamatórios, e acredita-se que sua função esteja relacionada à ativação de mecanismos específicos para regular a resposta inflamatória, com o objetivo de proteger os tecidos do dano progressivo e favorecer a homeostase (Lopez Dee et al., 2011). Desta maneira, o silenciamento deste gene poderia contribuir para a permanência do estado inflamatório que é um fator importante na progressão da carcinogênese.

Os fatores de transcrição pertencentes a família dos fatores GATA são reguladores essenciais da especificidade e a diferenciação de numerosos tecidos. Especificamente *GATA-4*, *GATA-5* e *GATA-6* participam no desenvolvimento gastrointestinal (Laverriere et al., 1994), da indução da diferenciação das células progenitoras (Fujikura et al., 2002), intervêm na embriogênese do intestino e guiam a diferenciação celular no adulto (Gao et al., 1998). Os fatores *GATA* podem intervir nas células progenitoras indiferenciadas e ter um papel na sua expansão, ou podem coordenar sua maturação e o ciclo celular nas células diferenciadas. Por isso acredita-se que alterações nestes fatores contribuam no desenvolvimento do câncer.

O silenciamento epigenético de *GATA-4* e *GATA-5* através de metilação nas suas regiões promotoras tem sido relatado em linhagens celulares gástricas e em carcinomas primários de pulmão e de esôfago (Akiyama et al., 2003; Guo et al, 2004; Guo et al., 2006;). Entretanto, seu envolvimento no desenvolvimento do câncer gástrico e sua relação com a infecção por *H. pylori* ainda não foi elucidado. Neste trabalho foram analisados ambos genes em amostras provenientes de crianças e adultos com gastrite crônica infectados ou não por *H. pylori*, e em amostras de pacientes com câncer gástrico. Os resultados obtidos mostraram a presença de

metilação na região promotora de ambos genes tanto em crianças quanto nos adultos infectados com a bactéria. Entre as amostras provenientes de pacientes com câncer gástrico foram observados 33% e 63% de metilação, para *GATA-4* e *GATA-5*, respectivamente. Estes resultados sugerem que a infecção por *H. pylori* poderia contribuir com a inativação epigenética destes genes na mucosa gástrica. Este evento acontece de maneira precoce nos primeiros estágios da doença, contribuindo na progressão da carcinogênese, uma vez que a ausência destes fatores poderia impedir a transcrição de genes supressores tumorais que apresentem em suas regiões promotoras domínios para estes. De modo semelhante Wen e col. (2010) analisaram a metilação na região promotora destes genes em amostras de pacientes com carcinoma gástrico ou displasia gástrica. Os resultados desses autores mostram que a metilação destes genes foi um evento frequente durante a carcinogênese gástrica, e que tal evento estava associado à presença de *H. pylori*.

Visando analisar os efeitos da infecção nas células epiteliais gástricas foram realizados ensaios de cocultura. Estas análises revelaram que a presença da bactéria aumentou os níveis de RNAm de *GATA-5* após 6, 24 e 48 h de infecção, e que houve um aumento nos níveis de RNAm de *TFF1* após 48 h de infecção. Estes resultados sugerem que o aumento nos níveis de RNAm de *GATA-5* e *TFF1* poderiam estar correlacionados com um efeito protetor da mucosa em resposta a infecção, já que entre as funções sugeridas para *TFF1*, destacam-se a de fator de crescimento, inibidor de proteases, e protetor da integridade da mucosa gástrica (Rio et al.,1991), e como sugerido por Akiyama e colaboradores (2003) *GATA-5* estaria envolvido na regulação deste gene. Este aumento na transcrição de *TFF1* concorda com os

relatados anteriormente por Playford e col. (1995). Neste trabalho, os autores reportam que estes peptídeos são altamente expressos nas células epiteliais, promovendo a migração celular em direção a mucosa danificada, e que quando administrados subcutaneamente favorecem a reparação da mucosa (Playford et al., 1995). Similarmente, foi observado que os níveis destes fatores aumentam rapidamente após a indução de dano na mucosa (Wright et al., 1997).

Por outro lado, foi observado no presente trabalho que os níveis de expressão de *TFF1* estavam diminuídos nas amostras provenientes dos pacientes com câncer gástrico, e que tanto nas amostras de crianças como nos adultos infectados com a bactéria, que apresentaram metilação na região promotora de *GATA-5*, foi observada uma diminuição na expressão de *TFF1*. Neste trabalho não foi analisado o padrão de metilação deste gene, mas a diminuição nos níveis de *TFF1*, nos pacientes com câncer gástrico, foram anteriormente descritos na literatura como consequência da hipermetilação da região promotora deste (Ribieras et al., 1998; Wu et al., 1998; Fujimoto et al., 2000). Posteriormente em um estudo realizado por Akiyama e col. (2003), foi analisado o padrão de metilação da região promotora dos genes *GATA-4*, *GATA-5* e *GATA-6* em diversas linhagens celulares coloretais e gástricas, assim como em amostras de carcinomas coloretal e gástrico primários. Neste trabalho os autores observaram que a hipermetilação de *GATA-4* e *GATA-5*, assim como a repressão transcricional destes genes foi um evento frequente. Além disso, os autores analisaram a presença de metilação na região promotora dos genes possivelmente regulados por estes fatores, entre eles *TFF1*, e observaram que o mesmo apresentava silenciamento epigenético independente, ou

seja, que nem sempre que estava metilado *GATA-5* era observado metilação em *TFF1*. Por outro lado, quando os autores superexpressaram *GATA-5* em linhagens celulares, nas quais o gene *TFF1* estava basalmente silenciado, observaram a reativação ao nível de transcrição e a presença de proteína secretada nas culturas celulares. Assim, os resultados observados neste trabalho sugerem que a bactéria induz um aumento da transcrição de *GATA-5*, *in vivo* e *in vitro*, e que o aumento da transcrição de *TFF1*, observado *in vitro*, estaria relacionado com um efeito protetor da mucosa gástrica em resposta a inflamação e a restituição epitelial.

O gene *HIC1* (*Hypermethylated in cancer 1*) codifica um repressor transcricional que coopera funcionalmente com p53 para suprimir o desenvolvimento do câncer. Os níveis de metilação observados para este gene foram de 4% e 6% nas amostras de pacientes adultos com gastrite crônica e câncer gástrico, respectivamente. Não foi observada metilação na região promotora deste gene nas amostras provenientes de crianças. Embora tenhamos observado níveis baixos de metilação na região promotora deste gene, há relatos na literatura mostrando que hipermetilação deste é um evento frequente em diversos tipos de cânceres sólidos tais como: câncer de mama, de cérebro, de fígado, de pulmão e câncer gástrico, com uma frequência de 15% a 45% de metilação para este último (Kanai et al., 1998). Os resultados obtidos neste estudo não são concordantes com os mostrados no trabalho de Kanai e colaboradores, pois os autores analisaram a metilação no *locus* D17S5, e não especificamente na região promotora de *HIC1*. Por outro lado, a análise dos níveis de RNAm mostrou que não houve diferenças significativas entre as amostras de crianças e adultos infectados ou não por *H. pylori*,

mas os pacientes com câncer gástrico apresentaram os níveis mais baixos de expressão, indicando que provavelmente outros mecanismo inibidores, além da metilação, possam contribuir na repressão deste gene. Embora em estudos anteriores tenham sido descritos níveis aumentados de metilação deste gene durante a progressão do tecido hepático normal para estágios pré-cancerosos, cirrose e até carcinoma hepático primário, não foi observada uma correlação direta entre esses níveis de metilação e os níveis de expressão de *HIC1*. Tais resultados indicam que baixos níveis de expressão contribuem no desenvolvimento do câncer, mas outros mecanismos, além da metilação, como mutações ou expressão aberrante de inibidores ainda não identificados de *HIC1* (Kanai et al., 1999; Nishida et al., 2000). Nossos resultados em relação a este gene nos permitem sugerir que a metilação dele não é um evento frequente, e que a diminuição nos níveis de transcrição observados podem contribuir na progressão tumoral mediados, provavelmente, por outros mecanismos diferentes da metilação.

A O6-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT) e MLH1 são proteínas envolvidas no reparo ao DNA. MGMT é uma proteína necessária para reparar as O6-metilguaninas, que são produzidas pelos agentes alquilantes do meio ambiente ou por mecanismos endógenos. Durante a replicação do DNA, a O6-metilguanina tende a se parear com a timina, resultando em uma transição de guanina-citosina a adenina-timina. MGMT catalisa a transferência de um grupo metila da O6-metilguanina, prevenindo deste modo as mutações por transição (C:G a A:T) (Olsson et al., 1980; Soejima et al., 2005). *MLH1* é parte do sistema de reparo MMR. Falhas neste sistema estão envolvidas no desenvolvimento da carcinogênese e da

progressão, tumoral tanto nos cânceres esporádicos como nos de tipo hereditário, devido ao fato de alterações neste permitirem o acúmulo de mutações (Eshelman et al., 1996; Kinzler et al., 1996).

Em relação aos genes *MLH1* e *MGMT* não existem relatos na literatura que tenham avaliado o padrão de metilação destes genes em amostras pediátricas. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que não houve metilação na região promotora de *MLH1* e *MGMT*, e que os níveis de RNAm de ambos genes foram similares entre as amostras pediátricas de pacientes infectados ou não infectados. Apesar de nossos resultados para estes genes de reparo ao DNA não mostrarem uma influência da infecção no padrão de metilação nas amostras pediátricas, o estudo dos genes anteriormente expostos (*THBS1*, *GATA-4* e *GATA-5*) mostraram uma relação entre a infecção e a metilação, do mesmo modo como fora relatado por Shin e col. (2011). Neste estudo os autores observaram uma associação entre a infecção e o padrão de metilação de 7 genes em amostras pediátricas. Os níveis de metilação nos *loci* susceptíveis foram mais altos nas amostras provenientes dos adultos, quando comparadas às provenientes das crianças, sugerindo que a alteração nos padrões de metilação poderiam estar relacionadas ao tempo de exposição à bactéria (Shin et al., 2011). Em concordância, os resultados obtidos neste trabalho também mostraram que as frequências de metilação foram significativamente mais altas nos pacientes adultos com gastrite crônica do que nos pediátricos.

Recentemente, Toller e col. (2011) mostraram que a infecção bacteriana prolongada leva a uma saturação na capacidade de reparo ao DNA das células do hospedeiro. Acredita-se que o dano que o *H. pylori* induz na mucosa gástrica seja

progressivo desde o início da infecção na infância até chegar ao adulto (Drumm, 1993; 2004). Levando isto em consideração, os resultados obtidos permitem sugerir que a indução de metilação por *H. pylori* nos adultos não depende somente dos níveis de resposta inflamatória, mas também da persistência e a duração da infecção.

Em relação ao padrão de metilação da região promotora de *MGMT*, nossos resultados mostraram altos níveis de metilação entre os pacientes com gastrite crônica *H. pylori* positivos quando comparados aos pacientes *H. pylori* negativos, indicando que a metilação da região promotora de *MGMT* está significativamente associada com a infecção por *H. pylori*. Estudos prévios reportaram que a metilação de *MGMT* é mais frequente e apresenta altos níveis de metilação em pacientes infectados com *H. pylori* do que nos não infectados (Sepulveda et al., 2010). Adicionalmente, foi sugerido que a metilação da região promotora de *MGMT*, em pacientes infectados com *H. pylori*, está relacionada com a progressão tumoral (Zou et al., 2009; Schneider et al., 2010).

Em relação ao padrão de metilação da região promotora de *MLH1*, nossos resultados não apresentaram diferenças entre os pacientes com gastrite crônica *H. pylori* positivos e *H. pylori* negativos. Entretanto, os níveis de metilação foram maiores nos pacientes com câncer gástrico, quando comparados aos adultos com gastrite crônicas. De modo similar, foi reportado que a metilação da região promotora de *MLH1* acontece tardiamente durante o desenvolvimento da metaplasia intestinal (Perri et al., 2007). Como um todo, nossos dados sugerem que

a metilação no gene *MLH1* acontece tardiamente na progressão do carcinoma gástrico e que a metilação depende em parte na persistência da infecção.

Os dados apresentados mostraram que a metilação da região promotora diminuiu significativamente os níveis de RNAm de ambos genes nos pacientes com gastrite crônica infectados ou não por *H. pylori*. Por outro lado, não se observaram diferenças nos níveis de RNAm entre os pacientes com câncer gástrico em relação ao status de metilação, provavelmente como consequência de outros mecanismos genéticos e epigenéticos. Estudos recentes mostraram que a infecção por *H. pylori*, em pacientes com gastrite crônica, está associada com a hipermetilação de *MGMT* e com níveis reduzidos de RNAm no epitélio gástrico (Sepulveda et al., 2010). Resultados similares foram reportados para *MLH1* em amostras de câncer gástrico (Kim et al., 2004). Entretanto, é possível que a hipermetilação da região promotora de *MLH1* leve a uma redução em nível protéico. Este fenômeno permite a acumulação de mutações devido a falta de reparo como consequência da deficiência neste sistema. O processo deficiente de reparo ao DNA pode ser detectado pela aparição de instabilidade de microssatélites (Kolodner et al., 1999).

Em relação o estado de MSI, verificamos que a instabilidade é um evento raro entre os pacientes pediátricos. Nossos dados mostram que a MSI não está associada com a infecção por *H. pylori* nos pacientes com gastrite crônica. A incidência de MSI nos pacientes com câncer gástrico foi de 68%, frequências consistente com os resultados apresentados por outros grupos de pesquisa, que relataram incidências variando de 58% a 76% (Leung et al., 2000; Ping et al., 2005). Adicionalmente, diversos estudos tem reportado a presença de MSI em pacientes com metaplasia

intestinal e câncer gástrico, sugerindo que o desenvolvimento da MSI poderia ser um evento precoce na progressão da carcinogênese gástrica (Semba et al., 1996; Ottini et al., 1997).

Diversos autores observaram que a presença de MSI-H em carcinomas gástricos esporádicos está associada significativamente com a perda de expressão de *MLH1* (Edmoston et al., 2000; Umar et al., 2004). Este fenômeno foi associado com a hipermetilação da região promotora de *MLH1*, mecanismo que causa MSI nos adenomas gástricos e no câncer gástrico (Baek et al., 2001; Fleischer et al., 2001). É conhecido que a infecção por *H. pylori* provoca um aumento no processo de renovação celular na mucosa gástrica, sobrecarregando o sistema de reparo. Este processo permitiria o acúmulo de mutações como consequência da infecção e outros fatores ambientais (Gologan et al., 2005).

Nossos resultados mostraram que a infecção leva a uma diminuição da expressão de *MLH1* nos pacientes com câncer gástrico. Este resultado está correlacionado com os altos níveis de MSI detectados nestas amostras, já que a diminuição de *MLH1* leva a falhas no sistema de reparo. Quando comparamos o padrão de metilação, os níveis de expressão de *MLH1* e os níveis de MSI nas amostras dos pacientes com câncer gástrico, observamos frequências de metilação altas, e conseqüentemente uma diminuição nas amostras caracterizadas como MSI-H quando comparadas com as MSI-L. Similarmente, Mizoshita e col. (2005) identificaram uma forte associação entre o fenótipo MSI e a perda de expressão de *MLH1* nos cânceres gástricos avançados.

Não foi observada associação entre a metilação da região promotora de *MGMT* e a MSI. Foi observado que a metilação da região promotora de ambos genes é um evento frequente nos pacientes com câncer gástrico. De maneira similar, Zou e col. (2009) relataram um aumento no padrão de metilação de *MGMT* na progressão de metaplasia intestinal e carcinoma gástrico.

A infecção por *H. pylori* é geralmente adquirida na infância e se a mesma não for tratada pode persistir indefinidamente. A infecção leva a inflamação crônica, que é um dos fatores associados às alterações epigenéticas, e possivelmente com o desenvolvimento do câncer gástrico. Os resultados apresentados neste estudo indicam que a hipermetilação da região promotora de genes vulneráveis acontece na infância em associação com a infecção por *H. pylori*, e que a frequência de metilação desses genes aumenta a medida que aumenta o tempo de exposição ao *H. pylori*. Entretanto, a metilação dos genes de reparo *MLH1* e *MGMT* parece ser um evento dependente do tempo de infecção, possivelmente porque tais genes estão associados a mecanismos críticos nas células, e poderiam apresentar maior resistência a sua inativação por mecanismos epigenéticos.

Em relação a associação entre o escore histológico de inflamação e o padrão de metilação, não observamos correlação entre estas duas variáveis nas amostras estudadas (resultados não mostrados). Entretanto, resultados anteriores de nosso grupo mostraram que, entre as amostras infectadas foram detectadas níveis aumentados de IL-8, IL-1 β e COX-2 (Bartchewsky et al., 2008), sugerindo que, de maneira geral, a inflamação causada pela infecção poderia estar relacionada com aumento nos níveis de metilação.

VIII-CONCLUSÕES

- ✓ Foi observada uma associação entre a infecção por *H. pylori* e a metilação da região promotora de *THBS1*, *GATA-4*, *GATA-5* tanto nos pacientes pediátricos quanto nos adultos com gastrite crônica e câncer gástrico;
- ✓ Embora não tenha sido observada associação entre a metilação de *HIC1* e as variáveis estudadas, observou-se níveis diminuídos de RNAm de *HIC1* nas amostras de pacientes com câncer gástrico;
- ✓ Para *MLH1* e *MGMT* não foi observado metilação na região promotora nas amostras pediátricas infectadas ou não com *H. pylori* e não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão destes genes;
- ✓ Houve associação entre a metilação de *MGMT* e a presença de *H. pylori* nas amostras provenientes de adultos com gastrite crônica e câncer gástrico;
- ✓ Foi verificada uma associação entre a metilação de *MLH1* e o desenvolvimento de câncer gástrico;
- ✓ Observou-se que nos pacientes com câncer gástrico a repressão em *MLH1*, o padrão de metilação da região promotora deste gene e o aumento na instabilidade de microssatélites foram eventos relacionados;

- ✓ Foi observado que a infecção por *H. pylori* induz um aumento nos níveis de transcrição de *GATA 5* (*in vitro* e *in vivo*) e *TFF1* (somente *in vitro*), e que este aumento, nos ensaios de cocultura, foi independente da presença de cag PAI;
- ✓ Nos pacientes com câncer gástrico observou-se uma diminuição nos níveis de RNAm de *TFF1*;
- ✓ Foi observado uma diminuição nos níveis de RNAm de *TFF1* nos pacientes pediátricos e adultos infectados com *H. pylori* que apresentaram metilação na região promotora de *GATA- 5*, sugerindo que a transcrição deste gene poderia ser regulada por *GATA-5*;
- ✓ Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a hipermetilação da região promotora dos genes estudados acontece precocemente na mucosa gástrica das amostras pediátricas e está associada à infecção por *H. pylori*. Entretanto, para alguns loci como *MGMT* e *MLH1* este evento parece ser dependente do tempo de duração da infecção;
- ✓ Observou-se maiores níveis de metilação nas amostras provenientes dos adultos comparadas com as amostras provenientes das crianças sugerindo que o maior tempo de exposição ao *H. pylori* poderia estar relacionada aos maiores níveis de metilação achados nas amostras da mucosa gástrica dos adultos.

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams J & Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:961-968.

Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol.* 2003;23:8429-39.

Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2002;10:677-90

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23:185-188.

Andersen LP, Wadström T.

In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 4

Antequera F, Bird a. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11995-11999.

Appelmek BJ, Martin SL, Monteiro MA, Clayton CA, McColm AA, Zheng P, Verboom T, Maaskant JJ, van den Eijnden DH, Hokke CH, Perry MB, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Phase variation in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide due to changes in the lengths of poly(C) tracts in alpha3-fucosyltransferase gene. *Infect Immun.* 1999;10:5361-6. Erratum in: *Infect Immun* 1999;12:6715.

Arents NL, van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, van Slochteren KR, Degener JE, Kleibeuker JH, van Doorn LJ. The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:2603-8.

Asaka M, Sepulveda A, Sugiyama and Graham D. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001

Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* : Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995; 270:17771-7.

Atherton JC, Peek RM JR, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1997;112:92-9.

Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, Gonzalez-Valencia G, Peek RM Jr, Thompson SA, Hawkey CJ, Blaser MJ. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol*. 1999;39:211-8,

Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vikström S, Sjöström R, Lindén S, Bäckström A, Lundberg C, Arnqvist A, Mahdavi J, Nilsson UJ, Velapatiño B, Gilman RH, Gerhard M, Alarcon T, López-Brea M, Nakazawa T, Fox JG, Correa P, Dominguez-Bello MG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Normark S, Carlstedt I, Oscarson S, Teneberg S, Berg DE, Borén T. Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science*. 2004; 305:519-22.

Axon AT. Is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Aliment Pharmacol Ther*. 1995;6:585-8. Review

Azevedo NF, Huntington J, Goodman KJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. *Helicobacter*. 2009; 14 Suppl 1:1-7. Review. Erratum in: *Helicobacter*. 2010;15:78

Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S, Fukuta K, Ohtani M, Ito Y, Dojo M, Yamazaki Y, Kuriyama M. Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis*. 2002; 186:1621-30.

Baek MJ, Kang H, Kim SE, Park JH, Lee JS, Paik YK, Kim H. Expression of *hMLH1* is inactivated in the gastric adenomas with enhanced microsatellite instability. *Br J Cancer*. 2001; 85:1147-52

Bakker, J., Lin, X., and Nelson, W.G. Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated p1class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2002;277: 22573–22580.

Balk S, Youn H, Chung M, Lee W, Cho M, KO G, Park C, Kasai H and Rhee K. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*- infected human gastric mucosa. *Cancer Res*. 1996; 56:1279-1282.

Bartchewsky W, Martini M, Squassoni A, Masiero M, Alvarez M, Ladeira M, Salvatore M *et al*. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1 β and COX2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *Scand J Gastroenterology*. 2009;44:153-61.

Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M, Plebani M, Atherton JC. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2008;135:91-9.

Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res*. 2011; 1:9-17.

Baylin SB, Höppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res*. 1986; 46:2917-22.

Baylin SB. Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycled and cancer. *Science*. 1997; 277:1948-1949.

Baylin SB. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2002; 5:331-7. Review.

Baylin S, Bestor TH. Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer Cell*. 2002; 4:299-305. Review

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2395-402.

Bird AP. CpG rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1996; 321:209-213.

Bird AP, Wolffe AP. Methylation induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell*. 1999;99:451-4.

Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 1985;40:91-9.

Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*. 1995;55:2111-15.

Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 1993; 262:1892-5.

Bruce MG, Maaroos HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2008;13 Suppl 1:1-6. Review

Bürgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller KA, Lehn N, Schmalz G, Ruhl S. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. Eur J Oral Sci. 2008;116:297-304.

Cavalcante MQ, Silva CI, Braga-Neto MB, Fialho AB, Nunes Fialho A, Barbosa AM, Cruz FW, Rocha GA, Queiroz DM, Braga LL. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:561-3

Cassaro M, Rugge M, Gutierrez O, Leandro G, Graham DY, Genta RM. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. Am J Gastroenterol 2000;95:1431-8

Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:14648-53.

Cellini L, Allocatti N, Angelucci D, Iezzi T, Di Camoli E, Marzio L, Dainelli B. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice. Microbiol Immunol. 1994;38 :843-850.

Chen H, Herndon E and Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. Matrix Biology. 2000;7: 597-614.

Choi IJ, Fujimoto S, Yamauchi K, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* environmental interactions: effect of acidic conditions on *H. pylori*-induced gastric mucosal interleukin-8 production. Cell Microbiol. 2007;10:2457-69.

Cole SP, Cirilo D, Kagnoff MF, Guiney DG, Eckmann L. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. Infect. Immun. 1997;65:843-6.

Con SA, Takeuchi H, Valerín AL, Con-wong R, Con-chin GR, Con-Chin VG, Nishioka M, Mena F, Brenes F, Yasuda N, Araki K, Sugiura T. Diversity of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genes in Costa Rica: its relationship with atrophic gastritis and gastric cancer. Helicobacter. 2007; 12:547-52.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multi factorial process. First american Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention Cancer Res 1992; 52:6735-40.

Correa P, Malcom G, Schmidt B et al. Antioxidant micronutrients and gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 1998;12 (Suppl 1):73-82.

- Correa P & Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2007; 133:659-672.
- Costello JF, Plass C. Methylation matters. J Med Genet. 2001; 38:285-303.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science. 1999; 284:1328-33. Review.
- Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem. 1992;267:10570-10575.
- Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J Biol Chem. 1994;269:10566-73.
- Crabtree JE, Wyatt JJ, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, Ramsay N, Primrose JN, Lindley IJ. Interleukin 8 expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. J Clin Pathol. 1994;47:61-6.
- Das J & Paul N. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. Indian Journal of Pediatrics. 2007;74: 287-290.
- De S, Vasquez L, Velasco J, Parlapiano D. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa, dental plaque and saliva in a population from the Venezuelan Andes. Investigacion Clinica. 2006;47:109-116.
- Dhasarathy A, Wade PA. The MBD protein family: reading an epigenetic mark? Mutat Res. 2008;647:39-43.
- De Bernard M, Arico B, Papini E, Rizzuto R, Grandi G, Rappuoli R, Montecucco C. *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. Mol Microbiol. 1997;4:665-74.
- Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetics mechanism in gastric carcinogenesis. Future Oncol. 2010;6:851-862.
- Dixon M. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. In: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. 2001;38:459-469.
- Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. Clin Cancer Res. 2001;7:1982-6.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997; 4:720-41. Review
- Drumm B. *Helicobacter pylori* in the pediatric patient. Gastroenterol Clin N Am. 1993; 22:169-182

Drumm B, Day AS, Gold B, Gottrand F, Kato S, Kawakami E, Madrazo A, Snyder J, Thomas J. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer. Working group report of the second World congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2004;39:S626-S631.

Eaton KA, Krakowka S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. Infect Immun. 1994;9:3604-7.

Eaton KA, Krakowka S. Avirulent, urease-deficient *Helicobacter pylori* colonizes gastric epithelial explants ex vivo. Scand J Gastroenterol. 1995;5:434-7.

Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, Beck S. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. Nat Genet. 2006;38:1378-1385.

Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, Barusevicius A, Rose D, Kovatich AJ, Boman B, Fry R, Fishel R, Palazzo JP. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. Hum Pathol. 2000;31:1506-14.

Elango N, Yi SV. DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. Mol Biol Evol. 2008;25:1602-8.

Engelbergs J, Thomale J, Rajewsky MF. Role of DNA repair in carcinogen-induced ras mutation. Mut Res. 2000; 450:139-53

Erllich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. Oncogene. 2002; 21:5400-5413.

Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. Helicobacter. 2006; 11:574-80.

Eshelman j, Markowitz S. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. Hum Mol Genet. 1996; 5:1489-94.

Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene. 2002;21: 5427-40

Esteller M. CpG island methylation and histone modifications: biology and significance. Ernst Schering Res Found Workshop. 2006;115-26.

Fallone CA, Barkun AN, Friedman G, Mayrand S, Loo V, Beech R, Best L, Joseph L. Is *Helicobacter pylori* eradication associated with gastroesophageal reflux disease? Am J Gastroenterol. 2000; 95:914-20.

Farinatti F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Mario F, Bonvincini P, and Naccaratto R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. Gut. 1998; 42:351-356.

Feimberg A, volgestein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature. 1983;301:89-92

Ferguson DA Jr, Li C, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. J Clin Microbiol. 1993;10:2802-4.

Figura N & Orderda G. Reflections on the first description of the presence of *Helicobacter species* in the stomach of mammals. Helicobacter. 1996;1:4-5.

Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. Oncogene. 2001;20:329-35

Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. Infect Immun. 1998;66:3088-94.

Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Shames B, Murphy JC. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. J Clin Microbiol. 1994;5:1229-37.

Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, Wroblewski LE, Piazuolo MB, Correa P, Peek RM Jr. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. Cancer Res. 2008;68:379-87

Fu S, Ramanujam K, Wong A Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, Meltzer SJ, Wilson KT. Increased expressional and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase2 in *Helicobacter pylori* gastritis. Gastroenterology. 1999;116:1319-29

Fujikura J, Yamamoto E, Yonemura S Hosoda K, Masui S , Nakao K, Miyazaki J and Niwa H. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. Gene Dev. 2002;16:784-789.

Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, kudo Y, Yokozaki H, Tahara E. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stages of stomach carcinogenesis. Cancer Lett. 2000;149:125-144.

- Fujimoto Y, Furusyo N, Toyoda K, Takeoka H, Sawayama Y, Hayashi J. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* among the population of endemic areas in Japan. *Helicobacter*. 2007;2:170-6.
- Fujimoto S, Olaniyi Ojo O, Arnqvist A, Wu JY, Odenbreit S, Haas R, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;1:49-58.
- Futscher, B.W., Oshiro, M.M., Wozniak, R.J., Holtan, N., Hanigan, C.L, Duan, H., and Domann, F.E. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat. Genet*. 2002;31:175–179.
- Galal G, Wharburton V, West A, Mapstone N, Axon A, Hawkey P, Moayyedi P. Isolation of *H. pylori* from gastric juice. *Gut*. 1997;41:A40-A41.
- Garcia JT, Ferraccl F, Jackson MW, Joseph SS, Pattis I, PLANO LR, Fischer W, Plano GV. Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun*. 2006;74:5645-57.
- Gao X, Sedgwick T, Shi Band Evans T. Distinct functions are implicated for the GATA -4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 1998;18:2901-2911.
- Gerhard, M.; Lehn, N.; Neumayer, N.; Boren, T.; Rad, R.; Schepp, W.; et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12778-83.
- Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L, Miranda MDE C, Mendonça S, Pedrazzoli J JR. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol*. 2003;3:20.
- Guillemin K, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ;99:15136-41.
- Gologan A, Graham D, Sepulveda A. Molecular markers in *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Clin Lab Med*. 2005; 25:197-222
- Goodwin C, Armstrong J, Chilvers T, Peters M, Collins M, Sly L, McConnel W, Harper W. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Sys Bacteriol*. 1989;39:397-405.
- Graff JR, Herman JG, Myohanen S, Baylin SB, Vertino PM. Mapping patterns of CpG island. Methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem* 1997;272:22322-9.

Graham DY. Pathogenic mechanisms leading to *Helicobacter pylori* – induced inflammation. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1992; 4 (Suppl.2):9-16.

Graham DY. *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer. J Gastroenterol. 2000;35(Suppl 12):90-7.

Grisham M, Jourdain D, Wink D. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism-implications in DNA damage and mutagenesis. Aliment Pharmacol Ther. 2000;14(Suppl1):3-9

Gunn MC, Stephens JC, Stewart JA, Rathbone BJ, West KP. The significance of cagA and vacA subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. J Clin Pathol. 1998;51:761-4.

Guo M, Akiyama Y, House M, Hooker C, Heath E, Gabrielson E, Yang S, Han Y, Baylin S, Herman J, Brock M. Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. Clin Cancer Res. 2004;10:7917-7924.

Guo M, House M, Akiyama Y, Qi Y, Capagna D, Harmon J, Baylin S, Brock M, Herman J. Hypermethylation of the GATA gene Family in esophageal cancer. Int J Cancer. 2006;119:2078-2083.

Guo W, Dong K, He M, Guo Y, Guo J, Chen Z, Yang Z, Kuang G. Aberrant methylation of Thrombospondin-1 and its association with reduced expression. In gastric Cardia Adenocarcinoma. J Biomed Biotech. 2010;doi 10.1155/2010/721485.

Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, Moon-Tasson L, Mahoney MR, Sargent DJ, O'Connell MJ, Witzig TE, Farr GH Jr, Goldberg RM, Thibodeau SN. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. J Natl Cancer Inst. 1999;91:1295-303

Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanani A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Fléjou JF, Duval A. Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. Bull Cancer. 2008 ;95:121-32. Review.

Harris A. Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori*. Br Med Bull. 1998;54:195-205.

Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nat Rev Cancer. 2004;9:688-94. Review.

Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol. 2009;44:239–248.

Heatley RV. The *Helicobacter pylori* handbook. 1 ed. Osney Mead. Blackwell Science, 1995.

Hermann A, Gower H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:2571-87.

Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ;99:14428-33.

Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2005 ;280:23130-7.

Hoffmann, M and Shulz, W. Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol*. 2005;83:296-321.

Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori* induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998;58:4255-9.

Hoshi T, Sasano H, Kata K, Ohara S, Shimosegawa T, Toyota T, and Nagura H. Cell damage and proliferation in human gastric mucosa infected by *Helicobacter pylori* - a comparison before and after *H. pylori* eradication in non atrophic gastritis. *Hum Pathol*. 1999;30:1412-1417.

Huang X, Zhang Z, Liu H, Ye H, Chuang SS, Wang J, Lin S, Gao Z, Du MQ. T(11;18)(q21;q21) in gastric MALT lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma of Chinese patients. *Hematol J*. 2003;4:342-5.

Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, Evans DG, Engstrand L, Graham DY, El-Zaatari FA. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1996;110:1031-5.

IARC Working Group. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 61:1-241.

INCA, Instituto Nacional do Cancer, 2012. www.inca.com.br

Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, Wingo PA, Howe HL, Anderson RN, Edwards BK. A annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*. 2004;101:3-27.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61:69-90. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011; 61:134

Jenuwein, T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J*. 2006; 273:3121-3135.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 1998; 19:187–191.

Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* 1999; 15:34–37.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3: 415–428.

Jönsson K, Guo BP, Monstein HJ, Mekalanos JJ, Kronvall G. Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ;101:1852-7.

Kanai Y, Hiu A, Sun L, Ushijima S, Sakamoto m, Tsuda H, Hirohashi S. DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression. Are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 1999; 29:703-9.

Kane MF, Loda M, Gaida GM et al., Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumours and mismatch repair defective human tumor cell lines. *Cancer Research.* 1997; 57:808-11.

Kang GH, Shim YH, Ro JY. Correlation of methylation of the hMLH1 promoter with lack of expression of hMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest.* 1999; 79:903-9.

Kang G, Lee H, Hwang K, Lee S, Kim J, Kim J. Aberrant CpG island. hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia and chronic inflammation. *Am J Pathol.* 2003;163:1551-1556.

Kang G, Lee S, Kim J and Jung HY. Profile of aberrant CpG island. Methylation along multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest.* 2003;83:635-641.

Kang G, Lee S, Cho N, Gandamihardja T, Long T, Weisenberger Campan M, Laird PW. DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis. *Lab Invest.* 2008;88:161-170.

Kavermann H, Burns BP, Angermuller K, Odenbreit S, Fischer W, Melchers K, Haas R. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* 2003;197:813– 822.

Keates S, Hitti YS, Upton M and Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates nf-kappa b in gastric epithelial cells. *Gastroenterology.* 1997;113:1099-1109.

Keates S, Keates AC, Warny M, Peek RM Jr, Murray PG, Kelly CP. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag a+* and *cag a-* *Helicobacter pylori*. J Immunol. 1999;163:5552-9.

Kelly SM, Pitcher MC, Farmery SM, Gibson GR. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. Gastroenterology. 1994;107:1671-4.

Khamri W, Moran AP, Worku ML, Karim QN, Walker MM, Annuk H, Ferris JA, Appelmek BJ, Eggleton P, Reid KB, Thursz MR. Variations in *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein D. Infect Immun. 2005;73:7677-86.

Kim T, Jong Y, Jung T, Kang G, and Bang J. DNA hypermethylation in gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 2004;20:131-142.

Kinzler K, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell. 1996 ;87:159-70.

Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet. 1991;337:1503-6

Kolodner K, Marsischky G. Eukaryotic DNA mismatch repair. Curr Opin Genet Dev. 1999;9:89-96.

Kwok T, Backert S, Schwarz H, Berger J, Meyer TF. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. Infect Immun. 2002;70:2108-20

Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19:449-490.

Laird PW. Oncogenic mechanism mediated by DNA methylation. Mol Med Today 1997;3:223-229.

Laird PW. The power and the promise of DNA markers. Nat Rev Cancer. 2003; 3:253-266.

Langton SR, Cesario SD. *Helicobacter pylori* associated phospholipase A2 activity: a factor in peptic ulcer production? J Clin Pathol. 1992;45:221-4

Laverriere A, MacNeill C, Mueller C, Poelmann E, Burch J, and Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in the developing heart and gut. J Biol Chem. 1994;269:23177-23184.

- Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology*. 1997;112:1386-97. Erratum in: *Gastroenterology*. 1997;113:732.
- Lehours P, Yilmaz O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2007;12(Suppl1):1-3.
- Leying H, Suerbaum S, Geis G, Haas R. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol*. 1992;19:2863-74
- Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. *hMLH1* promoter methylation and lack of *hMLH1* expression in sporadic gastric carcinomas with high frequency microsatellite instability. *Cancer Res*. 1999; 59:159:64
- Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol*. 2000;56:537-543.
- Leung WK, Man EP, Yu J, Go MY, To KF, Yamaoka Y, Cheng VY, Ng EK, Sung JJ. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on methylation status of E-cadherin gene in noncancerous stomach. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3216-21.
- Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 1988;2:93-9.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 2002; 22:480-91.
- Lieberman HB. DNA damage repair and response proteins as targets for cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2008;15:360-7. Review
- Lopez-Dee Z, Pidcock K and Gutierrez L. Thrombospondin-1: Multiple paths to inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2011 296069. doi: 10.1155/2011/296069
- Luman W, Alkout AM, Blackwell CC, Weir DM, Plamer KR. *Helicobacter pylori* in the mouth--negative isolation from dental plaque and saliva. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996;8:11-4.
- McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:3927-37.

Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, , Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. E-cadherin gene (cdh1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene*. 2001;20:1525-8.

Mac Gowan CC, Cover T, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric acid:biological and therapeutic implications. *Gastroenterology*. 1996; 110:926-38.

Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M Ariei K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2006;12:989-995.

Marshall B and Goodwin C. Revised nomenclature of *C. Pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol*. 1987; 37:68.

Marshall DG, Coleman DC, Sullivan DJ, Xia H, O'Moráin CA, Smyth CJ. Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* using short oligonucleotide probes containing repetitive sequences. *J Appl Bacteriol*. 1996 ;81:509-17.

Martínez Sánchez G, Seseras J, Biendicho P, Rezzonico M, Piqué JM. Gastric ulcer and intestinal occlusion: which came first - *Helicobacter pylori* infection or the bezoars. *Gastroenterol Hepatol*. 2001; 24:368-9.

McColl KE. *Helicobacter pylori* 1988-1998. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 ;11:13-6. Review

Mégraud F, Broutet N. Have we found the source of *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther*. 2000; Suppl 3:7-12. Review

Meyer -ter- Vehn T, Covacci A, Kist M and Pahl H. *Helicobacter pylori* activates mitogen protein activated protein kinase cascades and induces expression of protooncogenes c-fos and c-jun. *J. Biol. Chem* 2000;275:16064-72.

Mikula M, Dzwonek, Jagusztyn- Krynicka K, Ostrowsky J. Quantitative detection for low levels of *Helicobacter pylori* infection in experimentally infected mice by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2003; 55: 351-359.

Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett*. 2007;254:42-53.

Mizoshita T, Tsukamoto T, Cao X, Otsuka T, Ito S, Takahashi E, Nakamura S, Nakamura T, Yamamura Y, Tatematsu M. Microsatellite instability is linked to loss of

hMLH1 expression in advanced gastric cancers : lack of relationship with the histological type and phenotype. *Gastric Cancer*. 2005;8:164-172

Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001

Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N and Czinn J. Murine CD4 T- cell response to *Helicobacter* infection; th1 cells enhance gastritis and Th2 cells reduced bacterial load. *Gastroenterology*. 1997;113:1848-1857.

Montecucco C, Papini E, De Bernard M, Zoratti M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. *FEBS Lett*. 1999;452:16-21. Review.

Monteiro MA, Chan KH, Rasko DA, Taylor DE, Zheng PY, Appelmelk BJ, Wirth HP, Yang M, Blaser MJ, Hynes SO, Moran AP, Perry MB. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J Biol Chem*. 1998;273:11533-43.

Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, Gonzalez-Valencia G, Ponce De León S, Cravioto A, Atherton JC, López-Vidal Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3001-4.

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

Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*. 2006;130:1181-90.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 1998; 393: 386–389.

Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS, Kim H. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2005;11:3834-41

Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland C R, Goel A. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47:908-18.

Notarnicola M, Linsalata M, Caruso MG, Cavallini A, Di Leo A Low density lipoprotein receptors and polyamine levels in human colorectal adenocarcinoma. J Gastroenterol. 1995;30:705-9.

Nouraie M, Latifi-Navid S, rezvan H, radmard AR, Maghsudlu M, Zaer-Rezaii H, Amini S, Siavoshi F, Malekzadesh R. Childhood hygienic practice and Family education status determine the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Iran. Helicobacter 2009;14:40-46.

Obst B, Wagner K, Sewing F and Beil W. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. Carcinogenesis. 2000;21:1111-15.

Odembreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W and Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* *cag a* into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science 2000;287:1497-500.

Ohno T, Sugimoto M, Nagashima A, Ogiwara H, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, Yamaoka Y. Relationship between *Helicobacter pylori* hopQ genotype and clinical outcome in Asian and Western populations. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24:462-8

Okano M, Xie S, Li E. Clonning and characterizatio of a Family of novel mammalian DNA (Cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet. 1998;19:219-20.

Oliveira AM, Queiroz DM, Rocha GA, Mendes EN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. Am J Gastroenterol. 1994;89:2201-2204.

Oliveira AM; Rocha GA; Queiroz, DM; Mendes, EN; De Carvalho, AS; Ferrari TC; Nogueira, AM. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1999;28:157-61.

Olsson M, Lindahl T. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. J Biol Chem. 1980;255:10569-71.

Ottini L, Palli D Falchetti M, D'Amico C, Amorosi A, Saieva C, Calzolari A, Cimoli F, Tatarelli C, De Marchis L, Masala G, Mariani-Costantini R, Cama A . Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. Cancer Res. 1997;57:4523-9

Oohara, T, Tohma, H, Aono, S, Ukawa S and Kondo Y. Intestinal metaplasia of the regenerative epithelia in 549 gastric ulcers. Human Pathol. 1983; 14:1066-1071.

Oue N, Matsumura S, Nakayama H. Reduced expression of the TPS1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Oncology*. 2003; 64:423-429.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N and Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325: 1127-31.

Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*. 1999;282:2240-5.

Peterson WL, Graham DY. *Helicobacter pylori*. In : gastrointestinal and Liver disease, p.604-619, 6th ed.,1998, WB Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Peek RM Jr, van Doorn LJ, Donahue JP, Tham KT, Figueiredo C, Blaser MJ, Miller GG. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression in vivo and relationship to gastric pathology. *Infect Immun*. 2000;68:5488-95.

Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2004;9(Suppl1):1-6.

Perri F, Cotugno R, Piepoli A, Merla A, Quitadamo M, Gentile A, , Pilotto A, Annese V, Andriulli A. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of H. pylori infected patients and effect of eradication. *Am J Gastroenterol*. 2007;102: 1361-1371.

Perry S, de la Luz Sanchez M, Yang S, Haggerty TD, Hurst P, Perez-Perez G, Parsonnet J. Gastroenteritis and transmission of *Helicobacter pylori* infection in households. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1701-8

Ping L, Xiao-Yong Z, Yun S, Dao- Fu Z. Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol*. 2005;11:4904-4907.

Playford R, Marchbank T, Chinery R, Evison R, Pignatelli M, Boulton R, Thim L, Hanby A. *Gastroenterology*. 1995;108-116.

Pohl MA, Romero-Gallo J, Guruge JL, Tse DB, Gordon JI, Blaser MJ. Host-dependent Lewis (Le) antigen expression in *Helicobacter pylori* cells recovered from Leb-transgenic mice. *J Exp Med*. 2009;206:3061-72.

Polenghi A, Bossi F, Fischetti F, Durigutto P, Cabrelle A, Tamassia N, Cassatella MA, Montecucco C, Tedesco F, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. *J Immunol*. 2007;178:1312-20.

Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependant transcriptional repressor. *Genes Dev* 2001;15:1613-8.

Pruitt, K., Zinn, R.L., Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Kang, S.H., Watkins, D.N., Herman, J.G., and Baylin, S.B. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet.* 2006;2:e40.

Queiroz DM, Carneiro JG, Braga-Neto MB, Fialho AB, Fialho AM, Goncalves MH, Rocha GA, Rocha AM, Braga LL. Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: eight-year follow-up cohort study in an urban community in northeast of Brazil. *Helicobacter.* 2012;17:23-9.

Quigley EM, Turnberg LA. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa *in vivo*. Studies in control subjects and in duodenal ulcer patients. *Gastroenterology.* 1987;92:1876-84.

Ramsahoye BH, Biniszkiewicz D, Lyko F, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferases 3^a. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:5237-5242.

Raschle M, Marra G, Nystrom -Lahti M, Jiricny J. Identification of hMutL β , a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem.* 1999;274:32368-32375.

Razin A, Shemer R. DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1751-1755.

Ribeiro ML, Godoy AP, Benvengo YH, Mendonça S, Pedrazzoli J JR. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;36:181-5

Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC, The pS2/TFF1 trefoil factor from basic research to clinical applications. *Biochem Biophys Acta.* 1998;1378:F61-F77.

Rio M, Chenard M, Wolf C, Marcellin L, Tomasetto C, Lathe R, Bellocq J, Chambon P, Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of digestive tract. *Gastroenterology.* 1991;100:375-379.

Roa JC S, García P, Melo A, Tapia E, Villaseca M, Araya JC, Guzmán G P. Gene methylation patterns in digestive tumors. *Rev Méd Chile.* 2008;136:451-458

Roberts D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin1. *FASEB J.* 1996;10:1183-1191.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6:597-610. Review.

Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:944-48.

Schneider BG, Peng DF, Camargo MC, Piazzuelo MB, Sicinschi LA, Mera R, Romero-Gallo J, Delgado AG, Bravo LE, Wilson KT, Peek RM Jr, Correa P, El-Rifai W. Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer.* 2010;11:2588-97

Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:5024-9.

Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:599-612. Review.

Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun.* 2001;69:4034-40.

Spiegelhalder C, Gerstenecker B, Kersten A, Schiltz E, Kist M. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun.* 1993;61:5315-25.

Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, Yasui W and Tahara E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer.* 1996;77:1620-7

Sepulveda AR, Tao H, Carloni E, Sepulveda J, Graham DY, Peterson LE. Screening of gene expression profiles in gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* using microarray analysis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(Suppl 2):145-57.

Sepulveda A, Yao Y, Yan W, Park D, Kim J, Gooding W, Abudayyeh S, Graham DY. CpG methylation and reduced expression of O⁶-Methylguanine DNA methyltransferase is associated with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 2010;138:1836-1844

Shimada T, Watanabe N, Hiraishi H. Redox regulation of interleukin 8 expression in MKN28 cells. *Dig. Dis Sci.* 1999;44:266-73

Shin SH, Park SY, Ko JS, Kim N, and Kang GH. Aberrant CpG Island hypermethylation in pediatric gastric mucosa in association with *Helicobacter pylori* infection. Arch Pathol Lab Med. 2011;135:759-765.

Sid B, sartelet H, Bellon G. Thrombospondin1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. Crit Rev Oncol/ Hematol. 2004;49:245-258.

Singal R, Wang SZ, Sargent T et al. Methylation of promoter proximal-transcribed sequences of an embryonic globin gene inhibits transcription in primary erythroid cells and promotes formation of a cell type-specific methyl cytosine binding complex. J Biol Chem. 2002;277:1897-1905.

Sipponen P, Marshall BJ. Gastritis and gastric cancer. Western countries. Gastroenterol Clin North Am. 2000;29:579-92.

Smith M, Hold G, Tahara E and El-Omar E. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006;12:2979-2990.

Sobala, G M, Crabtree, M, Dixon C, Schorach, J, Taylor, B , Rathbone B, Heatley R and Axon A. Acute *Helicobacter pylori* infection? Clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology and gastric juice ascorbic acid concentrations. Gut 1991;32: 1415-1418.

Soejima H, Zhao W, Mukai T. Epigenetic silencing of the *MGMT* gene in cancer. Biochem Cell Biol. 2005;83:429-37. Review.

Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, Syvanen M. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;17;101:2106-11.

Souto FJ, Fontes CJ, Rocha GA, de Oliveira AM, Mendes EN, Queiroz DM. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:171-4.

Souto R, Colombo AP. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. J Periodontol. 2008 ;79:97-103.

Schwarz S, Morelli G, Kusecek B, Manica A, Balloux F, Owen RJ, Graham DY, van der Merwe S, Achtman M, Suerbaum S. Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. PLoS Pathog. 2008;4:e1000180.

Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae flaB* flagellin genes and construction

of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J Bacteriol. 1993;175:3278-88.

Sykora J, Pazdiora P, Varvarovska J, Pomahacova R, Stozicky F, Siala K, Current epidemiological and clinical issues regarding *Helicobacter pylori* infection in childhood. Epidemiol Mikrob Immunol. 2006;55:3-16.

Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. Int J Mol Med. 2009;24:563-9

Takai D, Jones P. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci. USA. 2002; 99:3740-3745.

Talley NJ, Ormand JE, Frie CA, Zinsmeister AR. Stability of pH gradients in vivo across the stomach in *Helicobacter pylori* gastritis, dyspepsia, and health. Am J Gastroenterol. 1992;87:590-4

Tao R, Fang PC, Liu HY, Jiang YS, Chen J. A new subtype of 3' region of *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from Zhejiang Province in China. World J Gastroenterol. 2004;10:3284-8

Teh BT, Larsson C, Nordenskjold M (1999). Tumor suppressor genes (TSG). Anticancer research. 1999;19:4715-28

Terres AM, Pajares JM, O' Toole D, Ahern S, Kelleher D. *H. pylori* infection is associated with downregulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell adhesion and proliferation control. J Clin Pathol 1998;51:410-2

Thomaz J, Gibson G, Darboe M, Dale A, Meaver L. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet. 1992;340:1194-5

Thomas JE & Petrolani S. Epidemiology of infection in the year of *Helicobacter pylori* 1994. The European *Helicobacter pylori* Study group. 1994:6-11.

Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, Hartung ML, Hottiger MO, Stucki M, Kalali B, Gerhard M, Sartori AA, Lopes M, Müller A. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. Proc Nat Acad Sc U S A. 2011;108:14944-14949.

- Touati E, Michel V, Thiberge JM, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology*. 2003;124:1408-19.
- Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993;61:1799-809.
- Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2000;60:1835-9
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:261-86
- Ushijima T and Hattori N. Molecular Pathways: Involvement of *Helicobacter pylori*-Triggered inflammation in the formation of an eoigenetic field defect., and its usefulness as Cancer risk and exposure markers. *Clin Cancer Res*. 2012;18:923-929.
- Van Doorn, L.J.; Figueiredo, C.; Sanna, R.; Plaisier, A.; Schneeberger, P.M.; Boer, W.; Quint, W. Clinical Relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1998;115:58-66.
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Blaser MJ, Quint WG. Distinct variants of *Helicobacter pylori cagA* are associated with *vacA* subtypes. *J. Clin Microbiol* 1999;37:2306-11.
- Vertino Pm, Yen RW, Gao J, Baylin SB. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)- methyltransferase. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4555-65.
- Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*. 1997;113:1836-47.
- Wajed S, laird P, and Demeester T. DNA methylation: An alternative pathway to cancer. *Annals of Surgery*. 2001;1 :10-20.
- Wales M, Biel M, el Deiry W, Nelkin B, Issa J, Cavenee W, Kuerbitz SJ, Baylin SB. P53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med*. 1995;1:570-7.

Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;1: 1273-5.

Watanabe T, Tada M, Nagai H, , Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*. 1998;115:642-8.

Weeks DL, Eskandari S, Scott DR and Sachs G. A. H⁺-gated urea Channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*. 2000;287:482-485.

Wen X, Akiyama Y, Pan K, liu Z, Lu Z, Zhou J, Gu L, Dong C, Zhu B, Ji J, You W, Deng D. Methylation of GATA-4 and GATA-5 and development of sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2010;16:1201-1208.

Wright N, Hoffmann W, Otto W, Rio M, Thim L. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and câncer. *FEBS Lett*. 1997; 408:121-123.

Wu M, Lee C, Shun C, Wang H, Lee W, Sheu J, Lin J. Clinicopathological significance of altered loci of replications erro and microssatelite instability-associated mutations in gastric cancer. *Cancer Res*. 1998;58:1494-1497.

Yamagata H, Kiyohara Y, Aoyagi K, Kato I, Iwamoto H, Nakayama K, Shimizu H, Tanizaki Y, Arima H, Shinohara N, Kondo H, Matsumoto T, Fujishima M. Impact of *Helicobacter pylori* infection on gastric cancer incidence in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Arch Intern Med*. 2000;160:1962-8.

Yamaoka Y, kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K and Imanishi J. Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*. 1995;30:1153-9.

Yamaoka Y, Graham DY. CagA status and gastric cancer unreliable serological tests produce unreliable data. *Gastroenterology*. 1999; 117:745.

Yamaoka Y, Kato, M, Asaka M. Geografic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Interm. Med*. 2008;47:1077-83.

Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the Nurd subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*. 1999;13:1924-1935.

Zhu Y, Zhong X, Zheng S, Du Q, Xu W. Transformed immortalized gastric epithelial cells by virulence factor CagA of *Helicobacter pylori* through Erk mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*. 2005;24:3886-95.

Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, Liu WJ. Promoter hypermethylation of multiples genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Human Pathology*. 2009;40:1534-1542.

X- ANEXOS

1. Parecer do comitê de ética em pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 05 de Março de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: EFEITOS DA INFECÇÃO POR HELICOBACTER PYLORI NO PADRÃO DE METILAÇÃO E NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE REPARO AO DNA.

Curso: MEDICINA
Grupo: III

Autor(es): MARCELO LIMA RIBEIRO

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo CAAE: 0007.0.142.000-09 (Citar este número nas correspondências referentes a este projeto)

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

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

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Atenciosamente,

JOSÉ PEDRAZZOLI JUNIOR
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – USF
Universidade São Francisco

2. Artigo submetido ao World Journal of Gastroenterology

Effects of *Helicobacter pylori* infection on *MGMT* and *MLH1* promoter methylation status and microsatellite instability in paediatric and adult patients.

Marisa C. Alvarez^{1,2}, Juliana C. Santos¹, Nathália Maniezzo¹, Marcelo S. Ladeira³, Artur L. C. da Silva⁴, Isabel C. A. Scaletsky⁵, José Pedrazzoli Jr¹, Marcelo L. Ribeiro^{1,2*}.

¹Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil; ² Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ³ Departamento de Clínica Médica, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; ⁴Departamento de Genética, UFPA, Belém-PA, Brazil; ⁵Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP, SP, Brazil.

*Correspondence to: Marcelo Lima Ribeiro. Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia. Universidade São Francisco. Av. São Francisco de Assis, 218. Jd. São José. Bragança Paulista – SP – Brazil. Fone (55-11) 4034-8135. FAX (55-11) 40341825. E-mail: marcelo.ribeiro@usf.edu.br.

Authors contributions: Ribeiro ML, designed the research; Alvarez MC, performed the research; Santos JC and Maniezzo N contributed in new reagents/ analytical tools; Alvarez MC and Ribeiro ML analyzed the data. Alvarez MC wrote the manuscript; da Silva A performed the MSI analysis and sequencing; Ladeira MS, Scaletsky I CA and Pedrazzoli Jr. J provided specimens

ABSTRACT

This study analyses the effect of *H. pylori* infection on the methylation status of the promoter regions of *MLH1* and *MGMT* and the relationship between this methylation and microsatellite instability (MSI). Biopsy samples from children and adults with chronic gastritis and adults with gastric cancer, infected or uninfected with *H. pylori*, were included in the study. Methylation was not detected in the promoter regions of *MLH1* and *MGMT* in pediatric samples. In chronic gastritis adult patients, methylation of the *MGMT* promoter was associated with *H. pylori* infection. The levels of *MLH1* and *MGMT* mRNA were significantly reduced in chronic gastritis samples that were also hyper-methylated. We observed methylation of the *MHL1* promoter, as well as an increase in the level of MSI, in samples from gastric cancer patients when comparing them to samples from the adult chronic gastritis patients with *H. pylori* infection. Our study indicates that the methylation of the promoter regions of *MGMT* and *MLH1* might be considered an event that is dependent on the duration of infection because such alterations in methylation were not observed in children. Moreover, in gastric cancer patients, the mRNA levels of *MLH1*, the hyper-methylation of the promoter region of *MLH1* and the increase in the frequency of MSI are all related events.

Key words: *H. pylori*, MSI, promoter methylation, *MLH1*, *MGMT*, gastric cancer

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is an important human pathogen of the stomach. Natural acquisition of *H. pylori* infection occurs, for the most part, in childhood. Once established within the gastric mucosa, the bacterium persists for life if left untreated. The epidemiological evidence and the rare occurrence of peptic ulcers or gastric atrophy in children ^[1, 2] suggest that the gastric mucosal damage resulting from *H. pylori* infection might be progressive through childhood into adulthood. *H. pylori* infection elicits a host inflammatory response that includes the infiltration of the mucosa by polymorphonuclear leukocytes, macrophages, and T and B lymphocytes. The inflammatory response has a slow onset and persists for a long period of time, becoming chronic. Although the symptoms are not as severe as acute inflammation, the condition is persistent ^[3]. The activated inflammatory cells release reactive oxygen and nitrogen species that can induce DNA injury and cellular apoptosis ^[4]. The chronic colonisation of the stomach with *H. pylori* causes inflammation within the gastric mucosa and activates multiple oncogenic pathways ^[5].

The interaction of the bacterium with the surface mucosa results in the increased release of pro-inflammatory cytokines ^[6], which exacerbate the inflammatory response. The persistence of this immune response leads to chronic inflammation, one of the factors associated with DNA methylation. DNA methylation is one of the most important epigenetic modifications and primarily occurs on cytosine residues of CpG dinucleotides, which are frequently clustered into CpG islands located in the promoter regions of certain genes ^[7]. DNA methylation in

these promoter regions inhibits transcription through changes in the chromatin structure that are mediated by the interaction of the methyl-cytosines with protein complexes that recruit histone-modifying enzymes ^[8, 9] .

Gastric cancer is the fourth most common type of cancer and the second leading cause of death in the world. In fact, 930,000 new cases of gastric cancer are expected per year. Korea, Japan and Eastern Asia have the highest incidence of gastric cancer, followed by Eastern Europe and Latin America ^[10] . Since the discovery of *H. pylori* by Warren and Marshall in 1982 ^[11] , many studies have demonstrated a strong association between *H. pylori* infection and the development of gastric cancer ^[12, 13] . Moreover, in 1994 the International Agency for Research on Cancer recognised *H. pylori* as a definitive carcinogenic agent based on several epidemiological reports ^[14] . The primary mechanism by which *H. pylori* induces gastric cancer is thought to include the up-regulation of several genes, including cytokines, oncogenes and growth factors, and the down-regulation of tumour suppressor genes. These alterations in gene expression are believed to be the result of mutations and microsatellite instability ^[15] . In addition, several studies have demonstrated a close association between *H. pylori* infection and aberrant methylation of CpG islands ^[16, 17, 18] .

Many critical genes are silenced by DNA methylation during cancer development. Recent studies have shown that the silencing of certain DNA repair genes by DNA methylation might be related to the occurrence of tumourigenic mutations. *MLH1* is a mismatch repair gene that frequently exhibits altered expression levels in gastric cancer, and changes in *MLH1* expression can promote

tumour development ^[19] . In addition, O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (*MGMT*) is a protein required for the repair of alkylated guanines in DNA that arise from the exposure to environmental alkylation mutagens or from endogenous mechanisms. It has been reported that the loss of *MGMT* expression may increase the occurrence of genetic mutations and could lead to gastric cancer development ^[20] . Additionally, Kitajima *et al.* (2003) ^[21] reported that the loss of *MGMT*, as well as mismatch repair (MMR) proteins, in gastric cancer patients is an important event in tumour progression.

Microsatellite instability (MSI) is one hallmark of DNA MMR deficiency that is observed in gastric carcinogenesis. Microsatellites are short repeats of DNA sequence that are scattered throughout the human genome. Errors that occur in the DNA MMR mechanisms of tumour cells can result in the expansion or contraction of these repeated sequences, generating MSI ^[22] . MSI occurs in nearly every case of gastric cancer that is associated with germ line mutations of the MMR genes.

The inactivation of the MMR genes *MSH2* and *MLH1*, either through a mutation or an epigenetic mechanism, is responsible for the development of MSI in gastric cancer. The aberrant loss of the protein expression of either *MLH1* or *MSH2* has been observed in patients exhibiting gastric cancer with MSI. In particular, the altered expression of *MLH1* is associated with its own gene inactivation through hyper-methylation of its promoter regions ^[23, 24] .

It is well established that *H. pylori* infection leads to chronic inflammation in the gastric mucosa, which is associated with DNA methylation. Because this

epigenetic alteration plays an important role in the regulation of gene expression and maintenance of DNA integrity and stability, the aim of this study was to analyse the effect of *H. pylori* infection on the methylation status of *MLH1* and *MGMT* and the relationship between this methylation and microsatellite instability in children infected or uninfected by the bacterium and in adults with chronic gastritis or gastric cancer, both with and without *H. pylori* infection.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study was approved by the following: the Ethical Committee of the Paulista Medical School, State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil; the Sao Francisco University, Braganca Paulista, SP, Brazil; School of Medicine of the São Paulo University, SP, Brazil; and by the National Committee of Ethics in Research, Brasília, DF, Brazil. Informed consent to participate in the study was obtained from all patients.

This study included 239 patients, of which 50 were children suffering from dyspepsia between the ages of 2 to 18 years old (average age = 8 ± 4 years, 47% male, 53% female), 97 suffered from chronic gastritis (average age = 35 ± 13 years, 33% male, 67% female) and 92 suffered from gastric cancer (average age = 60 ± 12 years, 82% male, 18% female). All of the patients were non-smokers, did not abuse alcohol and were not using prescription or recreational drugs.

Biopsy collections

Biopsies of the patients with gastric complaints were obtained during endoscopies from the lesser curvature of the antrum (the distal region of the stomach) within 2 cm of the pyloric ring. For those patients with gastric cancer, biopsies were obtained during gastric surgeries (to remove gastric carcinoma). One biopsy was used for a rapid urease test ^[25]. Two biopsies were used for histopathological evaluation. One biopsy sample was used for bacterial genotyping by PCR. *H. pylori* infection was considered to be present when positive results were obtained for all of the following tests: rapid urease

test, histological analysis and gastric biopsy PCR. The patients were considered uninfected when negative results were obtained for all tests.

Histopathology

The samples from the gastric mucosa were fixed in 10% formalin for 24 h, dehydrated in alcohol and xylene, and embedded in paraffin. Sequential 3-5 µm sections were cut and stained with haematoxylin-eosin for routine histology. Gastritis was classified according to Sydney's system ^[26], and the presence of *H. pylori* was determined by carbolfuchsin staining of the sections.

Bisulphite treatment and methylation-specific PCR

Bisulphite treatment was performed on 1 µg of DNA using the EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA). Methylation-specific PCR (MSP) was performed with a primer set specific to the methylated or un-methylated sequence (M or U sets, respectively) ^[27]. The PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl containing approximately 200 ng of sodium bisulphite-treated DNA and 25 pmol of each primer. The PCR amplifications were performed for 40 cycles and consisted of a denaturation step of 95°C for 5 min, a primer-annealing step of 58°C for 35 sec and an extension step at 72°C for 40 sec, with a single final extension step of 72°C for 7 min. The reaction products were separated by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels and visualised by silver staining.

RNA extraction and real-time PCR

The gastric biopsies were collected, snap frozen, and stored at -80°C in RNAlater® (Qiagen, Valencia, Calif., USA). Total RNA was isolated using the RNeasy tissue kit® (Qiagen). The gastric cancer biopsies were microdissected prior to RNA extraction. The PixCell® IIe Laser Capture Microdissection (LCM) System (Arcturus Engineering, Mountain View, Calif., USA) was used to obtain laser captures using an amplitude of 50 mW, a duration of 800 ms and a 7.5 mm beam. RNA from the capture lids (Arcturus) containing the microdissected tissue was extracted using the PicoPure RNA isolation kit (Arcturus). Single-stranded cDNA was synthesised from the RNA using the high capacity cDNA archive kit® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's protocol.

Quantitative PCR was performed on a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) using the threshold cycle numbers as determined by the RQ Study software (Applied Biosystems). The reactions were run in triplicate, and the threshold cycle numbers were averaged. The 50-µl reaction mixture was prepared as follows: 25 µl Sybr Green® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, USA), 10 mM of each primer (Table 1) and 10 µl cDNA (100 ng). The reaction was cycled with a preliminary UDG treatment for 2 min at 50°C and denaturation for 2 min at 95°C, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 15 s, and primer extension at 72°C for 15 s. This was followed by a melting-point analysis of the double-stranded amplicons consisting of 40 cycles of 1°C decrement (15 s each) beginning at 95°C. The first derivative of this plot, dF/dT , is the rate of change of fluorescence in the reaction. A

significant change in fluorescence occurs at the melting point of the double-stranded PCR products. A plot of dF/dT versus temperature displays these changes as distinct peaks.

MLH1 and *MGMT* expression was measured and normalised to a constitutive gene (β -actin). The relative expression was calculated according to the formula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ [28] and the results are expressed as average gene expression $\pm$ SD.

Microsatellite instability (MSI) analysis

All samples were analysed using four markers (BAT-25, BAT-26, D17S250 and D2S123), as recommended by the America National Cancer Institute (NCI) workshop on MSI [29].

PCR was performed in a final volume of 25 μ l consisting of approximately 200 ng of template genomic DNA and 25 pmol of each primer. PCR amplification was performed for 35 cycles consisting of a denaturation step of 95°C for 30 sec, a primer-annealing step of 55-58°C for 30 sec and an extension step at 72°C for 30 min, followed by a final single extension step of 72°C for 10 min.

Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was performed for each sample. Briefly, 12 μ l of each PCR product was mixed with 12 μ l of denaturing buffer (95% Formamide, 0.05% Bromophenol blue, and 0.05% xylenocianol), denatured at 95 °C for 5 min and separated by electrophoresis on a non-denaturing 7% polyacrylamide gel for 3 h at room temperature. The single strands of the PCR products were visualised as bands in the gel by silver staining.

MSI was defined as a shift in the mobility of the DNA band from either allele or by the appearance of a new band. The MSI status was also confirmed by direct sequencing (data not shown). High-level instability (MSI-H) was defined by the presence of greater than one marker displaying instability. Low-level instability (MSI-L) was defined as only one marker displaying instability. Finally, if none of the markers showed instability, the sample was classified as displaying microsatellite stability (MSS) [29] .

Statistical analysis

The association between microsatellite instability and methylation pattern was evaluated using either the χ^2 test with Yates continuity correction or Fisher's exact test. Statistical significance for expression analysis was assessed by an unpaired Student's *t*-test. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

H. pylori infection was analysed in the biopsy specimens from 50 paediatric patients and in 189 adult patients who underwent endoscopies. Infection was detected in 22 of the 50 (44%) children, in 83 of the 97 (86%) adults with chronic gastritis and in 92 out of 92 (100%) the samples from the gastric cancer patients.

Methylation was not detected in the promoter region of *MLH1* and *MGMT* in the paediatric samples. The samples from the chronic gastritis patients showed hypermethylation in the promoter region of the *MHL1 gene* in 11 of the 83 (13%) samples from the *H. pylori* infected subjects, and in 1 of the 14 (11%) samples from the uninfected subjects ($p>0.05$) (Table 2). In samples from the gastric cancer patients, methylation of the *MHL1* promoter region was observed in 36 of the 92 cases (39%). The differences observed in the percentages of samples with methylation are statistically significant when comparing the gastric cancer patients to the chronic gastritis, either with or without *H. pylori* infection ($p<0.001$, $p<0.05$, respectively. Table 2).

In patients with chronic gastritis, biopsies from 42 of 83 (51%) *H. pylori* positive patients and 3 of 14 (21%) *H. pylori* negative patients were methylated at the promoter region of *MGMT* (Table 2), and this difference was statistically significant ($p<0.05$). Regarding the gastric cancer patients, biopsies from 61 of 92 (66%) patients were methylated at the promoter region of *MGMT*. The difference in the percentage of samples methylated at the promoter region of *MGMT* for the gastric cancer patients and the non-infected chronic gastritis patients was statistically significant ($p<0.01$). There was also a statistically significant difference

between the percentage of methylated samples from gastric cancer patients and *H. pylori* infected chronic gastritis patients ($p < 0.05$). Furthermore, it was found that the frequency of promoter methylation for both genes was higher in gastric cancer samples than in *H. pylori* positive chronic gastritis samples, and the difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Gene expression levels of *MLH1* and *MGMT* were measured and evaluated in the context of the promoter methylation. The levels of both *MLH1* and *MGMT* mRNA were significantly reduced in the methylated samples when compared to the unmethylated samples in the *H. pylori* positive and the uninfected adult chronic gastritis samples (Table 3). Overall, gastric cancer patients and paediatric patients showed low levels of *MLH1* and *MGMT* mRNA expression.

Biopsy samples from children with chronic gastritis were relatively stable for the microsatellite markers tested. Only 2 samples (both *H. pylori* negative) scored as MSI-H, and the remaining paediatric samples scored as MSS (stable) (Table 4). In the adult samples, MSI was present in 51 of the 83 (61%) chronic gastritis, *H. pylori* positive samples. Of these, 37 (73%) samples scored MSI-L and 14 (27%) samples scored MSI-H. MSI was observed in 9 of the 14 (64%) patients with gastritis but without *H. pylori* infection, with 6 (67%) scoring MSI-L and 3 (33%) exhibiting MSI-H. MSI was observed in 63 of the 92 (68%) gastric cancer patients, with a distribution of 38 (60%) having MSI-L and 25 (40%) having MSI-H. No significant association was found between *H. pylori* infection and MSI in the samples from chronic gastritis adult patients. However, there was a significant difference ($p = 0.03$)

in the percentage of samples with MSI for the gastric cancer patients compared to the *H. pylori* infected subjects with chronic gastritis.

Various authors have postulated that the methylation of the promoter region of *MHL1* leads to the down-regulation of the expression of the *MHL1* gene, an effect that is strongly associated with MSI [23, 24, 30]. Therefore, we evaluated whether there was any association between *MLH1* methylation status and MSI in our study population. The data presented in this study shows a strong association between *MLH1* methylation and MSI in patients with gastric cancer ($p < 0.01$). However, we did not find any significant association between *MLH1* methylation and MSI in the samples from the chronic gastritis adult patients, either with or without *H. pylori* infection.

DISCUSSION

The methylation of genomic DNA is one of the most important epigenetic modifications in eukaryotes. It is essential for life, and alteration of the process of methylation is often associated with carcinogenesis related to chronic inflammation or persistent infection with viruses or other pathogenic microorganisms. In this setting, we evaluated the effects of *H. pylori* infection on the methylation pattern of the promoter regions of *MLH1* and *MGMT* and on the MSI status of paediatric and adult patients.

Children may be regarded as an interesting natural model for the study of *H. pylori* infection, not only because they are not usually submitted to gastric mucosal irritants, such as alcohol, tobacco, and anti-inflammatory medication, but also because the gastric mucosal changes in children may represent an earlier stage of the inflammatory response compared to the adult host due to the shorter duration of *H. pylori* infection in children. To our knowledge, this is the first study to evaluate the methylation pattern of DNA repair genes in paediatric samples. Our data showed that there was no methylation in the promoter region of *MLH1* and *MGMT*, and the mRNA levels of both genes were similar amongst infected and uninfected children. Although our data showed no effect of *H. pylori* infection on the methylation pattern of two DNA repair genes, a recent study reported an association between *H. pylori* infection and methylation patterns of 7 genes in paediatric samples, however none of these were involved with DNA repair [31]. The methylation levels in these susceptible loci were increased in the adult samples compared to the paediatric samples, suggesting that the alteration of the methylation pattern may be related to

the duration of *H. pylori* exposure ^[31] . Accordingly, our data showed that the methylation rates were significantly higher among the adult samples with chronic gastritis when compared to the paediatric samples with chronic gastritis.

Recently, it has been shown that prolonged bacterial infection leads to the saturation of the repair capabilities of the host cells, leading to an ineffective and mutagenic DNA repair system ^[32] . Accordingly, it is believed that the gastric mucosal damage resulting from *H. pylori* infection might be progressive through childhood and into adulthood ^[1, 2] . Taking this into account, our data suggest that the induction of methylation due to *H. pylori* infection in adults may depend not only on the level of the inflammatory response but also on the persistence and duration of the infection.

Concerning the methylation pattern of the promoter region of *MGMT*, our data showed high levels of methylation among patients with *H. pylori* positive chronic gastritis when compared to *H. pylori* negative chronic gastritis, indicating that the methylation of the *MGMT* promoter is significantly associated with *H. pylori* infection in the setting of chronic gastritis. Previous studies reported that *MGMT* CpG methylation is more frequent and shows higher methylation levels in patients infected with *H. pylori* than in *H. pylori* negative patients ^[33] . Additionally, it has been suggested that the promoter methylation of *MGMT* in patients infected with *H. pylori* is related to tumour progression ^[34, 35] .

Regarding the methylation pattern of the promoter region of *MLH1*, our data showed no differences among patients with *H. pylori* positive chronic gastritis and *H. pylori* negative chronic gastritis. However, the methylation levels were higher

among the patients suffering from gastric cancer when compared to the adults with chronic gastritis. Similarly, it has been reported that *MLH1* promoter methylation occurs late in the development of intestinal metaplasia ^[36]. Taken together, our data might suggest that the methylation of *MLH1* occurs late in the progression of gastric carcinoma and that methylation depends, in part, on the persistence of *H. pylori* infection.

The data presented here also showed that the methylation of the promoter regions significantly reduced the mRNA levels of both *MGMT* and *MLH1* in patients with chronic gastritis, with or without *H. pylori* infection. On the other hand, no differences in the mRNA levels were found among gastric cancer samples, regardless of methylation status, likely as a consequence of other epigenetic and genetic mechanisms. Recently, it was shown that *H. pylori* infection in patients suffering from gastritis is associated with hyper-methylation of *MGMT* and reduced levels of *MGMT* mRNA in the gastric epithelium ^[33]. Similar results were reported for *MLH1* in gastric carcinoma samples ^[19]. Therefore, it is possible that hyper-methylation of the promoter region of *MLH1* leads to reduced expression of its protein product. This phenomenon allows the accumulation of mutations because of the lack of surveillance and repair as a consequence of this deficiency in the DNA repair system. Ultimately, the deficient DNA repair process can be detected by the appearance of microsatellite instability ^[37].

In this study, we screened a group of paediatric patients infected and uninfected by *H. pylori* and a group of adult patients divided as follows: (1) chronic gastritis patients infected with *H. pylori*, (2) chronic gastritis patients without *H.*

pylori infection and (3) gastric cancer patients (all of whom were infected with *H. pylori*). Regarding the MSI status, instability is a very rare event in the paediatric population. Our data showed that *H. pylori* infection is not associated with MSI among patients with chronic gastritis. The incidence of MSI in gastric cancer patients was 64%, which is consistent with the results reported by others (incidences ranging from 58% to 76% [38, 39] . Additionally, several studies have reported the presence of MSI in patients with intestinal metaplasia and gastric cancer, suggesting that the development of MSI may be an early event in the multi-step progression of gastric carcinogenesis [40, 41] .

It has been observed that the presence of MSI-H in sporadic carcinomas is significantly associated with the loss of *MLH1* expression [42, 43] . This phenomenon was associated with hyper-methylation of the *MLH1* promoter, the underlying mechanism that causes MSI in gastric adenomas and early gastric cancer [24, 44] . It is well known that *H. pylori* infection causes an increase in the rate of cell turnover in the gastric mucosa, overwhelming the DNA repair system. This process might allow for the accumulation of mutations as a consequence of *H. pylori* infection and other environmental risk factors [45] .

We previously reported that *H. pylori* infection leads to a decrease in the expression of *MLH1* in patients with gastric cancer [46] . This result is correlated with the high levels of MSI that were detected in these samples because the down-regulation of *MLH1* leads to a failure in the DNA repair system. Moreover, in comparing the methylation pattern, the expression levels of *MLH1* and the levels of MSI in gastric cancer samples, we found higher methylation and, consequently, a

down regulation of *MLH1* in samples characterised as MSI-H compared to MSI-L samples ($p < 0.03$). Similarly, Mizoshita *et al.* (2005) ^[47] identified a strong association between the MSI phenotype and the loss of *MLH1* expression in advanced gastric cancers.

We did not find an association between the methylation of the promoter region of *MGMT* and MSI status. Furthermore, it was observed that the promoter methylation of both genes, *MLH1* and *MGMT*, is a frequent event in gastric cancer patients. Similarly, Zou *et al.* (2009) ^[34] reported an increase in methylation of *MGMT* in the progression from intestinal metaplasia to early gastric carcinoma.

Infection with *H. pylori* is generally acquired during childhood and, if left untreated, will persist indefinitely. Infection leads to chronic inflammation, one of the factors associated with epigenetic alterations and possibly with the development of gastric cancer. The results presented in this study indicate that the methylation of the promoter regions of *MGMT* and *MLH1* might be considered an event that is dependent on the duration of infection because such methylation had not been observed in children. Moreover, it was shown in gastric cancer patients that the expression levels of *MLH1*, the hyper-methylation pattern of the promoter region of this gene and the consequent increase in the frequency of MSI are all related events.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (2009/01813-0 and 2008/02678-6) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (471088/2007-2) for financial support.

REFERENCES

- 1- **Drumm, B.** (1993). *Helicobacter pylori* in the pediatric patient. *Gastroenterol Clin N Am* **22**:169-182.
- 2- **Drumm B**, Day AS, Gold B, Gottrand F, Kato S, Kawakami E *et al.* (2004). *Helicobacter pylori* and peptic ulcer. Working group report of the second World congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **39**:S626-S631.
- 3- **Bayarsaihan D.** (2011). Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res* **1**:9-17.
- 4- **Shimada T**, Watanabe N, Hiraishi H. (1999). Redox regulation of interleukin 8 expression in mkn28 cells *Dig. Dis Sci* **44**:266-73.
- 5- **Ding SZ**, Goldberg JB, Hatekeyama M. (2010). *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetics mechanism in gastric carcinogenesis. *Future Oncol* **6**:851-862.
- 6- **Yamaoka Y**, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K and Imanishi J (1995). Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* **30**:1153-9.
- 7- **Roa JC S**, García P, Melo A, Tapia E, Villaseca M, Araya JC *et al.* (2008). Gene methylation patterns in digestive tumors. *Rev Méd Chile* **136**: 451-458.
- 8- **Esteller M.** (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**: 5427-40.
- 9- **Esteller M.** (2006). CpG island methylation and histone modifications: biology and significance. *Ernst Schering Res Found Workshop* 115-26.
- 10- **Hatakeyama M.** (2009) *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol.* **44**:239-248.
- 11- **Warren JR**, Marshall B (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**: 1273-5.
- 12- **Parsonnet J**, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N *et al.* (1991). *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med* **325**: 1127-31.

-
- 13- **Yamagata H**, Kiyohara Y, Aoyagi K, Kato I, Iwamoto H, Nakajima K et al. (2000). Impact of *Helicobacter pylori* infection on gastric cancer incidence in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Arch Intern Med* **160**:1962–8.
- 14- **IARC Working Group**. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, 7–14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. **61**:1–241.
- 15- **Teh BT**, Larsson C, Nordenskjold M (1999). Tumor suppressor genes (TSG). *Anticancer research* **19**:4715–28.
- 16- **Chan AO**, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH et al. (2003). Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut* **52**:502–506.
- 17- **Maekita T**, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M et al. (2006). High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*. **12**:989–995.
- 18- **Nakajima T**, Yamashita S, Maekita T, Niwa T, Nakazama K and Ushijima T. (2009). The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter* infection in human gastric mucosae. *Int. J. Cancer*. **124**: 905–910.
- 19- **Kim T**, Jong Y, Jung T, Kang G, and Bang J. (2004). DNA hypermethylation in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* **20** : 131–142.
- 20- **Engelbergs J**, Thomale J, Rajewsky MF. (2000). Role of DNA repair in carcinogen-induced ras mutation. *Mut Res* **450**:139–53.
- 21- **Kitajima Y**, Miyazaki K, Matsukura S, Tanaka M and Sekiguchi M. (2003). Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, MLH1 and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer* **6**:86–95.
- 22- **Smith M**, Hold G, Tahara E and El-Omar E. (2006). Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. **12**:2979–2990.
- 23- **Leung SY**, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. (1999). *hMLH1* promoter methylation and lack of *hMLH1* expression in sporadic gastric carcinomas with high frequency microsatellite instability. *Cancer Res* **59**:159:64.

- 24- **Baek MJ**, Kang H, Kim SE, Park JH, Lee JS, Paik YK *et al.* (2001). Expression of *hMLH1* is inactivated in the gastric adenomas with enhanced microsatellite instability. *Br J Cancer* **85**:1147-52.
- 25- **Coelho LGV**, Barros CA, Lima DCA *et al.* (1996). National consensus on “*H. pylori*”. *GED* **15**: 53-58.
- 26- **Dixon M**, Genta RM, Yardley JH and Correa P. (1996). Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* **20**: 1161-1181.
- 27- **Kang GH**, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. (2001). CpG island methylation in pre- malignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* **61**:2847-2851.
- 28- Livak KJ and Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)). *Method. Methods* **25**:402-8.
- 29- **Boland CR**, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshelman Jr, Burt RW *et al.* (1998). A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**:5248-5257.
- 30- **Kang G**, Lee S, Cho N, Gandamihardja T, Long T, Weisenberger *et al.* (2008). DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis. *Lab Invest* **88**:161-170.
- 31- **Shin SH**, Park SY, Ko JS, Kim N, and Kang GH. (2011). Aberrant CpG Island hypermethylation in pediatric gastric mucosa in association with *Helicobacter pylori* infection. *Arch Pathol Lab Med* **135**:759-765.
- 32- **Toller IM**, Neelsen KJ, Steger M, Hartung ML, Hottiger MO, Stucki M *et al.* (2011). Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *PNAS* **108**: 14944-14949.
- 33- **Sepulveda A**, Yao Y, Yan W, Park D, Kim J, Gooding W *et al.* (2010). CpG methylation and reduced expression of O⁶- Methylguanine DNA methyltransferase is associated with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* **138**:1836-1844.

-
- 34- **Zou XP**, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, and Liu WJ (2009). Promoter hypermethylation of multiples genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Human Pathology* **40**:1534-1542.
- 35- **Schneider BG**, Peng DF, Camargo MC, Piazzuelo MB, Sicinski LA, Mera R *et al.* (2010). Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer* **11**:2588-97.
- 36- **Perri F**, Cotugno R, Piepoli A, Merla A, Quitadamo M, Gentile A *et al.* (2007) Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of H. pylori infected patients and effect of eradication. *Am J Gastroenterol* **102**: 1361-1371.
- 37- **Kolodner RD**, Marsischky GT. (1999). Eukariotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev*, **9**:89-96.
- 38- **Leung WK**, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. (2000). Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* **56**: 537-543.
- 39- **Ping L**, Xiao-Yong Z, Yun S, Dao- Fu Z. (2005). Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol*. **11**:4904-4907.
- 40- **Semba S**, Yokozaki H, Yamamoto S, Yasui W and Tahara E. (1996). Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* **77**:1620-7.
- 41- **Ottini L**, Palli D Falchetti M, D'Amico C, Amorosi A, Saieva C *et al.* (1997). Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. *Cancer Res* **57**:4523-9.
- 42- **Edmonston TB**, Cuesta KH, Burkholder S Barusevicius A, Rose D, Kovatich AJ, et al. (2000). Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* **31**:1506-14.
- 43- **Umar A**, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J *et al.* (2004). Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposiscolorectal cancer (lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* **96**:261-86.
- 44- **Fleisher AS**, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J *et al.* (2001). Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* **20**:329-35.
- 45- **Gologan A**, Graham D, Sepulveda A. (2005). Molecular markers in *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Clin Lab Med* 197-222.

-
- 46- **Bartchewsky W**, Martini M, Squassoni A, Alvarez M, Ladeira M, Salvatore M *et al.* (2009). Influence of *Helicobacter pylori* expression of *MLH1* and *MGMT* in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* **28**:591-597.
- 47- **Mizoshita T**, Tsukamoto T, Cao X, Otsuka T, Ito S, Takahashi E *et al.* (2005). Microsatellite instability is linked to loss of *hMLH1* expression in advanced gastric cancers : lack of relationship with the histological type and phenotype. *Gastric Cancer* **8**:164-172.

Table 1 Primers used in real time PCR

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
β -actin	Sense	ACACTGGCTCGTGTGACAAGG
	Antisense	CGGCTAATACACACTCCAAGGC
<i>MGMT</i>	Sense	CACCACACTGGACAGCCCTTT
	Antisense	CGAACTTGCCCAGGAGCTTTATTT
<i>MLH1</i>	Sense	CGGTAACTACCCAATGCCTCAAC
	Antisense	TTCTCGACTAACAGCATTTCCAA

Table 2 Frequency of hyper-methylation at the promoter regions of *MLH1* and *MGMT* in chronic gastritis and gastric cancer patients.

Subjects	MLH1		MGMT	
	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated
Chronic Gastritis				
Child <i>H. pylori</i> negative	-	28 (100%)	-	28 (100%)
Child <i>H. pylori</i> positive	-	22 (100%)	-	22 (100%)
Adults <i>H. pylori</i> negative	1 (11%)	13 (89%)	3 (21%)	11 (79%)
Adults <i>H. pylori</i> positive	11 (13%)	72 (87%)	42 (51%)*	41 (49%)
Gastric Cancer	36 (39%) [#]	56 (61%)	61 (66%) ^{§ §§}	31 (34%)
	##			

#p<0.05 when compared to *H. pylori* negative ##p<0.01 when compared to *H. pylori* positive chronic gastritis; *p<0.05 when compared to *H. pylori* negative; § p<0.05 when compared to *H. pylori* positive chronic gastritis, and §§ p<0.01 when compared to the *H. pylori* negative chronic gastritis group.

Table 3 Relative mRNA expression levels of *MLH1* and *MGMT*.

Subjects	MLH1		MGMT	
	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated
Chronic Gastritis				
Child <i>H. pylori</i> negative	-	0.25±0.03	-	0.13±0.08
Child <i>H. pylori</i> positive	-	0.27±0.02	-	0.12±0.01
Adults <i>H. pylori</i> negative	0.35±0.01**	0.85±0.07	0.40±0.16**	0.99±0.21
Adults <i>H. pylori</i> positive	0.88±0.10**	1.29±0.27	0.79±0.19**	1.78±0.47
Gastric Cancer	0.27±0.07	0.25±0.08	0.49±0.10	0.46±0.10

MLH1 and *MGMT* mRNA values are expressed as mean ± SD. **p<0.01 compared to unmethylated samples in the same subject category.

Table 4 Microsatellite instability status

Subjects	Microsatellite instability status			
	MSI-L	MSI-H	MSI	MSS
Chronic Gastritis				
Child <i>H. pylori</i> negative.	-	2 (7%)	2 (7%)	26 (93%)
Child <i>H. pylori</i> positive.	-	-	-	22 (100%)
Adults <i>H. pylori</i> negative.	6 (67%)	3 (33%)	9 (64%)	5 (36%)
Adults <i>H. pylori</i> positive.	37 (73%)	14 (27%)	51 (61%)	32 (39%)
Gastric Cancer	38 (60%)	25 (40%)	63 (68%)*	29 (32%)

MSI-H when more than one marker displayed instability. MSI-L when only one marker displayed instability. MSS when none of the markers showed instability.*p<0.05 compared to *H. pylori* positive chronic gastritis samples.

3. Artigo submetido ao Digestive Diseases and Sciences Journal

Methylation pattern of *THBS1*, *GATA-4* and *HIC1* in paediatric and in adult patients infected with *Helicobacter pylori*.

Marisa Claudia Alvarez^{1,2}, Marcelo Sady Placido Ladeira³, Isabel Cristina Affonso Scaletsky⁴, José Pedrazzoli Jr¹, Marcelo Lima Ribeiro^{1,2*}.

¹Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil; ²Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ³Departamento de Clínica Médica, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; ⁴Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP, SP, Brazil.

*Correspondence to: Marcelo Lima Ribeiro. Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia. Universidade São Francisco. Av. São Francisco de Assis, 218. Jd. São José. Bragança Paulista – SP – Brazil. Fone (55-11) 4034-8135. FAX (55-11) 40341825. E-mail: marcelo.ribeiro@usf.edu.br.

ABSTRACT

Background and aim: *Helicobacter pylori* infection is usually acquired in childhood and persists into adulthood if untreated. The bacterium induces a chronic inflammatory response, which is associated with epigenetic alterations in oncogenes, tumour-suppressor genes, cell-cycle regulators, and cell-adhesion molecules. The aim of this study was to analyse the effect of *H. pylori* infection on the methylation status of *Thrombospondin-1* (*THBS1*), *Hypermethylated in cancer 1* (*HIC1*) and *Gata binding protein-4* (*GATA-4*) in gastric biopsy samples from children and adults infected or uninfected with the bacterium and in samples obtained from gastric cancer patients. **Methods:** The methylation pattern was analysed with methylation-specific PCR (MSP-PCR). **Results:** Our results showed that *H. pylori* infection was associated with methylation of the promoter regions of the *THBS1* and *GATA-4* genes in paediatric and adult samples ($p < 0.001$). *HIC1* showed the lowest level of methylation, which was not an early event during gastric carcinogenesis. **Conclusion:** The results from this study indicate that methylation of *THBS1* and *GATA-4* occurs in the early stages of chronic gastritis and gastric cancer in association with *H. pylori* infection; however, in gastric cancer samples, other mechanisms cooperate with the down-regulation of these genes. Methylation of *HIC1* may not be the principal mechanism implicated in its down-regulation in gastric cancer samples.

Keywords; chronic gastritis, gastric cancer, methylation, *Helicobacter pylori*

INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is the main aetiological agent of gastrointestinal infections in adults and children. The bacterium has been implicated in the pathogenesis of active chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma. Natural acquisition of *H. pylori* infection occurs, for the most part, in childhood. Once established within the gastric mucosa, the bacterium persists for life if left untreated (1, 2). The presence of the bacterium leads to a pathological progression that starts with chronic gastritis and progresses through atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and, eventually, gastric cancer (3). The epidemiological evidence and the rare occurrence of peptic ulcers or gastric atrophy in children suggest that the gastric mucosal damage resulting from *H. pylori* infection progresses through childhood into adulthood (1, 2). *H. pylori* elicits a host inflammatory response that includes the infiltration of the mucosa by polymorphonuclear leukocytes, macrophages, and T- and B-lymphocytes. The inflammatory response has a slow onset and persists for a long period of time, thus becoming chronic. Although the symptoms are not as severe as acute inflammation, the condition is persistent (4). The activated inflammatory cells release reactive oxygen and nitrogen species that can induce DNA injury and cellular apoptosis (5). The chronic colonisation of the stomach with *H. pylori* causes inflammation within the gastric mucosa and activates multiple oncogenic pathways (6).

Chronic inflammation is one of the factors associated with DNA methylation (7), is one of the most important epigenetic modifications that lead to

alterations in oncogenes and in tumour-suppressor genes. DNA methylation occurs on cytosine residues of CpG nucleotides, which are frequently clustered into CpG islands located in the promoter regions of certain genes (8). Methylation of these CpG nucleotides recruits methyl CpG-binding proteins that further recruit histone deacetylases, histone methyltransferases and heterochromatin proteins (9). The changes in chromatin structure block access of the transcription complex to the DNA and repress transcription.

The stomach is one of the organs that exhibits frequent methylation of CpG islands of genes in non-neoplastic epithelial cells (10, 11), and several studies have demonstrated a close association between *H. pylori* infection and aberrant methylation of CpG islands (12, 13, 14). Tumour progression is a multistep process that requires the acquisition of the ability by tumor cells to evade apoptosis, self-sufficiency in growth signals, sustained angiogenesis and the ability to invade and metastasise. In this process, angiogenesis is a key step that facilitates the transfer of nutrients to tumour cells and provides a transport system through which tumour cells metastasise to distant organs (15). *THBS1* is a known angiogenesis inhibitor, the altered expression of which is associated with neovascularisation in human cancers (16). Hypermethylation of the *THBS1* promoter and an associated decrease of *THBS1* expression are observed in several carcinoma cell lines and primary brain tumours (17).

HIC1 was originally isolated as a new candidate suppressor gene located at 17p13.3, a region frequently hypermethylated or deleted in many types of human cancers. Epigenetic silencing of *HIC1* occurs in prostate cancers, non-

small cell lung cancers, breast cancers, gastric and liver cancers and oesophageal cancers (18). One of the targets of *HIC1* is a deacetylase *SIRT1* involved in regulating cellular senescence and longevity. Enhanced *SIRT1* expression has been found in different human cancers. The tumour suppressor p53 is an important non-histone substrate for *SIRT1*, and the deacetylation of p53 attenuates its ability to activate downstream targets involved in regulation of apoptosis and/or proliferation (19). Furthermore, the inactivation of *HIC1* in tumour cells increases angiogenesis and/or proliferation (19).

GATA-4 is part of the family of GATA factors, proteins that promote cellular specification and differentiation of numerous tissues. Impaired function or reduced expression contributes to malignant transformation due to failure of the affected cells to mature and exit the cell cycle (20). GATA factors function in undifferentiated progenitor cells and play a role in their expansion, or they can direct the coordinated maturation and cell-cycle withdrawal in a terminally differentiating cell. Thus, alterations of GATA factors contribute to the development of cancer in human patients (20). *GATA-4*, as well as *GATA-5* and *GATA-6*, guide development and differentiation in endoderm specific organs and specification of proper gut embryogenesis (21). The endoderm forms the lining epithelium of the gastrointestinal tract. Loss of *GATA-4* and *GATA-5* affect gastrointestinal epithelial cell differentiation, leading to tumourigenesis of these cells (22). Moreover, the loss of these proteins is related to malignancies in primary oesophageal, colorectal, gastric and pulmonary cancers (23, 24, 25).

The methylation pattern of these genes has been studied in gastric cancer samples; however, to the best of our knowledge, these patterns have not been studied in chronic gastritis samples from paediatric patients infected with *H. pylori*. Thus, the aim of this study was to analyse the effect of *H. pylori* infection on the methylation status of *THBS1*, *HIC1* and *GATA-4* in samples from children and adults infected or uninfected with the bacterium and in samples from gastric cancer patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study was approved by the following: the Ethical Committee of the Paulista Medical School, State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil; the Sao Francisco University, Braganca Paulista, SP, Brazil; School of Medicine of the São Paulo University, SP, Brazil; and by the National Committee of Ethics in Research, Brasília, DF, Brazil. Informed consent to participate in the study was obtained from all patients.

This study included 239 patients, of whom 50 were children suffering from dyspepsia (average age = 8 ± 4 years, range 2-18, 47% male, 53% female), 97 suffered from chronic gastritis (average age = 35 ± 13 years, range 19-75, 33% male, 67% female) and 92 suffered from gastric cancer (average age = 60 ± 12 years, range 33-88, 82% male, 18% female). All of the patients were non-smokers, did not abuse alcohol and were not using prescription or recreational drugs.

Biopsy collections

Biopsies of the patients with gastric complaints were obtained during endoscopies from the lesser curvature of the antrum (the distal region of the stomach) within 2 cm of the pyloric ring. For those patients with gastric cancer, biopsies were obtained during gastric surgeries (to remove gastric carcinoma). One biopsy was used for a rapid urease test (26). Two biopsies were used for histopathological evaluations. One biopsy sample was used for bacterial

genotyping by PCR. *H. pylori* infection was considered to be present when positive results were obtained for all of the following tests: rapid urease test, histological analysis and gastric biopsy PCR.

Histopathology

The samples from the gastric mucosa were fixed in 10% formalin for 24 h, dehydrated in alcohol and xylene, and embedded in paraffin. Sequential 3 5- μ m sections were cut and stained with haematoxylin-eosin for routine histology. Gastritis was classified according to Sydney's system (27), and the presence of *H. pylori* was determined by carbolfuchsin staining of the sections.

Bisulphite treatment and methylation-specific PCR

Bisulphite treatment was performed on 1 μ g of DNA using the EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA). Methylation-specific PCR (MSP) was performed with a primer set specific to the methylated or unmethylated sequence (M or U sets, respectively; Table1). The PCR reactions were performed in a final volume of 25 μ L containing approximately 200 ng of sodium bisulphite-treated DNA and 25 pmol of each primer. The PCR amplifications were performed for 40 cycles and consisted of a denaturation step of 95°C for 5 min, a primer-annealing step of 58°C for 35 s and an extension step at 72°C for 40 s with a single final extension step of 72°C for 7 min. The reaction products were separated by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels and visualised by silver staining.

RNA extraction and real-time PCR

The gastric biopsies were collected, snap frozen, and stored at -80°C in RNAlater® (Qiagen, Valencia, Calif., USA). Total RNA was isolated using the RNeasy tissue kit® (Qiagen). The gastric cancer biopsies were microdissected prior to RNA extraction. The PixCell® Ite Laser Capture Microdissection (LCM) System (Arcturus Engineering, Mountain View, Calif., USA) was used to obtain laser captures using an amplitude of 50 mW, a duration of 800 ms and a 7.5-mm beam. RNA from the capture lids (Arcturus) containing the microdissected tissue was extracted using the PicoPure RNA isolation kit (Arcturus). Single-stranded cDNA was synthesised from the RNA using the high capacity cDNA archive kit® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's protocol.

Quantitative PCR was performed on a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems) using threshold cycle numbers as determined by the RQ Study software (Applied Biosystems). The reactions were run in triplicate, and the threshold cycle numbers were averaged. The 50-µL reaction mixture was prepared as follows: 25 µL Sybr Green® Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, USA), 10 mM of each primer (Table 2) and 1 µL of cDNA (100 ng). The reaction was cycled with a preliminary UDG treatment for 2 min at 50°C and denaturation for 2 min at 95°C followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 15 s, and primer extension at 72°C for 15 s. This step was followed by a melting-point analysis of the double-stranded amplicons consisting of 40 cycles of 1°C decrements (15 s

each) beginning at 95°C. The first derivative of this plot, dF/dT, is the rate of change of fluorescence in the reaction. A significant change in fluorescence occurs at the melting point of the double-stranded PCR products. A plot of dF/dT versus temperature displays these changes as distinct peaks.

THBS1, *HIC1* and *GATA-4* expression was measured and normalised to a constitutive gene (β -actin). The relative expression was calculated according to the formula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (28) and the results are expressed as average gene expression $\pm$ SD.

Statistical analysis

The association between microsatellite instability and methylation pattern was evaluated using either the χ^2 test with Yates continuity correction or Fisher's exact test. Statistical significance for expression analysis was assessed by an unpaired Student's *t*-test. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

H. pylori infection was analysed in the biopsy specimens from 50 paediatric patients and in 189 adult patients who underwent endoscopies. Infection was detected in 22 of the 50 (44%) children, in 83 of the 97 (86%) adults with chronic gastritis and in 92 out of 92 (100%) of the samples from the gastric cancer patients.

The analysis of the *HIC1* gene showed no methylation in the promoter region of the paediatric samples infected or uninfected with the bacterium. Similar results were found in uninfected adult samples. The samples from the chronic gastritis-infected patients showed hypermethylation in 3 of the 83 (4%) samples. In samples from the gastric cancer patients, methylation of the *HIC1* promoter region was observed in 5 of the 92 (6%; Table 3).

Analysis of expression levels of *HIC1* showed no differences among infected or uninfected patients in both paediatric and adult samples. The analyses of mRNA levels in gastric cancer samples showed reduced levels compared to chronic gastritis samples ($p < 0.001$; Table 4).

For the *THBS1* gene, analysis of the methylation status of the promoter region showed 13 of 22 (59%) samples methylated from infected children, and 4 of 28 (14%) were methylated among uninfected patients. In samples from adults with chronic gastritis, methylation was observed in 72 of the 83 (87%) infected patients and in 1 of the 14 (7%) of the *H. pylori*-negative patients. The differences observed in the percentages of methylated samples in children and adults among infected patients were statistically significant when compared to the uninfected

patients ($p < 0.001$; Table 3). In gastric cancer samples, 45 of the 92 (49%) were methylated (Table 3).

The mRNA levels of *THBS1* were measured, and it was up-regulated in samples from infected paediatric and adult patients ($p < 0.001$). The levels of *THBS1* mRNA were significantly reduced in methylated samples when compared to unmethylated *H. pylori*-positive samples ($p < 0.05$; Table 4). The gastric cancer samples exhibited lower levels of *THBS1* mRNA, and there were no significant differences between methylated and unmethylated samples.

Promoter methylation of *GATA-4* was observed in 14 of 22 (64%) samples from children infected with *H. pylori* and in 2 of 28 (7%) samples of uninfected children. Compared to adult samples, 67 of 83 (81%) samples from infected chronic gastritis were methylated, and no methylation was observed among uninfected samples. The differences between the percentage of methylated samples among infected and uninfected samples in children and adult samples were statistically significant ($p < 0.05$, $p < 0.001$, respectively). In gastric cancer samples, 30 of 92 (33%) were methylated (Table 3).

The mRNA levels of *GATA-4* were measured, and expression in methylated samples from children and adult patients was reduced. The gastric cancer patients showed the lowest levels of mRNA expression; however, there were no differences between methylated and unmethylated samples (Table 4).

DISCUSSION

Alteration of DNA methylation has been recognised as an important and, in many cases, essential component of cancer development (29). Among the factors associated with DNA methylation are persistent viral infection or other pathogenic microorganisms, tobacco smoke, aging and chronic inflammation. Because *H. pylori* infection leads to a chronic inflammation, we evaluated the effects of infection on the methylation pattern of the promoter regions of *THBS1*, *HIC1* and *GATA-4* in paediatric and adult patients.

The study of methylation patterns among paediatric samples is of great interest because infection in these individuals has a short duration compared to adult patients, and in this manner, the changes observed in the gastric mucosa represent the earlier stages of the inflammatory response. Furthermore, children are not submitted to gastric mucosal irritants, such as alcohol, tobacco and anti-inflammatory medication that can act as confounding factors (30, 31, 32).

The results of this study show that the methylation of the promoter regions of *THBS1* and *GATA-4* was associated with *H. pylori* infection in paediatric as well as in adult samples.

THBS1 is a matricellular, multifunctional glycoprotein and is involved in numerous biological processes, such as cellular adhesion, angiogenesis, metastasis, inflammation, atherosclerosis, homeostasis and thrombosis (33, 34). However, the function of this protein in cancer progression is controversial, showing stimulatory and inhibitory effects (35). Inhibition of tumour growth is generally attributed to its anti-antigenic activity (36).

Our data showed that the methylation of the promoter region was associated with *H. pylori* infection in children and in adult samples. Similarly, Kang et al. (37), analysed samples from paediatric and adult patients suffering from chronic gastritis, and these researchers observed methylation in the promoter region of this gene; however, the authors did not find a significant association between methylation and *H. pylori* infection. Most likely, this lack of association resulted from methodology problems because it analysed only one gastric site.

In gastric cancer samples, hypermethylation in the promoter region of *THBS1* was associated with a repression of its mRNA levels. These results coincide with the study by Oue et al. (38) in which they found 33% methylation and an inverse relationship in mRNA levels in gastric cancer samples. Furthermore, Guo et al. (39) reported 34.5 % methylation in samples from gastric adenocarcinoma, which was associated with an inverse relationship in mRNA levels. The authors also observed a lack of protein expression, which could be explained by epigenetic alterations through methylation. Conversely, although Miyamoto et al. (40) reported that 44% methylation in cancer gastric patients is associated with repression of this gene, they observed that mRNA levels were reduced in unmethylated samples. In these cases, *WT1* (*Wilms tumor1*) increased *in vivo* and *in vitro*, indicating that the regulation of this gene does not depend exclusively on promoter methylation but also on other oncogenic proteins. Our data show that the methylation of the promoter region of this gene is associated with *H. pylori* infection, and this alteration occurs in the early stages

of the infection. Although the methylation frequency of gastric patients was lower than chronic gastritis patients, the mRNA levels in gastric cancer samples were reduced, most likely due to other regulatory mechanisms.

THBS1 is secreted in response to inflammation, promoting the resolution of the inflammatory process and facilitating phagocytosis of damaged cells. Thus, enhanced production of THBS1 could be a compensatory mechanism for controlling the immune response and protecting tissues from excessive damage (41). In this setting, the reduced level of this gene might contribute to the permanence of the inflammatory status, an important factor associated with cancer progression.

GATA factors are a family of transcription regulatory proteins that participates in gastrointestinal development. GATA-4, GATA-5 and GATA-6 guide development and differentiation in endoderm-derived organs, including induction of differentiation of embryonic stem cells, specification of proper gut embryogenesis, and guidance of epithelial cell differentiation in adults (21). Down-regulation of GATA-4 and GATA-5 has been reported in serous ovarian cancers and gastric cancer (42).

Epigenetic silencing of *GATA-4* and *GATA-5* through the methylation of its promoter regions occurs in gastric epithelial cells and in lung and oesophageal primary carcinomas (23, 24, 25). However, the relationship of this methylation-mediated silencing with gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection remains unknown.

In this study, the methylation pattern of *GATA-4* was analysed in samples from children and adults infected with the bacterium and in samples from gastric cancer patients. The results showed that the methylation of its promoter region was associated with infection in children and in adult samples. In cancer samples, the gene was also 33% methylated. These methylation frequencies were down-regulated compared to chronic gastritis patients, which can partially be explained by the fact that the chromosome region for *GATA-4* is a frequently deleted in cancer (42). These results suggest that infection with *H. pylori* might synergise with epigenetic silencing in gastric mucosa in earlier stages of the disease and participate in cancer progression by preventing transcription of other tumour-suppressor genes. Similarly, methylation in the promoter region of this gene in samples from gastric cancer patients and gastric dysplasia from *H. pylori* infection has been reported (22).

The *HIC1* gene encodes a transcriptional repressor, and its identified targets are genes involved in proliferation, tumour growth and angiogenesis (19). Our results for this gene showed lower levels of methylation in chronic gastric samples, as well as in gastric cancer samples, and no methylation in paediatric samples. However, *HIC1* promoter hypermethylation was found in a wide variety of solid cancers, such as breast, brain, liver, colorectal, cervical, and lung, and at a frequency of 15 to 45 % in gastric cancer (19, 43). Our results do not show these frequencies in samples from gastric cancer patients, and this finding could be attributed to our analysis of the methylation pattern in the promoter region of *HIC1*, while the other authors analysed the methylation in locus D17S5, not

specifically in the promoter region of *HIC1*. The mRNA levels in gastric cancer samples were reduced, indicating that other mechanisms inhibit the transcription of this gene. In line with our findings, two studies found an increase in *HIC1* promoter hypermethylation from normal liver tissue to precancerous liver tissue showing chronic hepatitis or cirrhosis to primary hepatocellular carcinoma, but hypermethylation did not correlate significantly with *HIC1* expression levels, indicating than a *HIC1* inhibitory mechanism other than hypermethylation contributed to low *HIC1* expression (44, 45). Furthermore, a recent study in samples from hyperparathyroid tumours showed that perturbed expression of *HIC1* are due to repressive histone modification of H3K27me2/3, rather than DNA methylation (46). Our results suggest that methylation of this gene in gastric cancer is not a frequent event, and the reduced levels contribute to cancer development through other mechanisms different from methylation.

H. pylori infection is mainly acquired during childhood, and once acquired, the infection is usually lifelong unless treated. Infection leads to chronic inflammation, which is one of the factors associated with aberrant DNA methylation and possibly with the progression of gastric carcinogenesis. In conclusion, the results in this study indicate that methylation of the promoter regions of *THBS1* and *GATA-4* is an event associated with *H. pylori* infection, and this methylation occurs in the early stages of the disease, while *HIC1* methylation is not a frequent event in chronic gastritis and gastric cancer related to *H. pylori* infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (2008/02678-6) for providing financial support.

POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

- (1) Drumm B. *Helicobacter pylori* in the pediatric patient. *Gastroenterol Clin N Am.* 22:169-182,1993.
- (2) Drumm B, Day AS, Gold B, Gottrand F, Kato S, Kawakami E, Madrazo A, Snyder J, Thomas J. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer. Working group report of the second World congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39:S626-S631,2004.
- (3) Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multi factorial process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention *Cancer Res.* 52:6735-40,1992.
- (4) Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res* 1:9-17,2011.
- (5) Shimada T, Watanabe N & Hiraishi H. Redox regulation of interleukin 8 expression in mkn28 cells. *Dig. Dis Sci.* 44:266-73,1999.
- (6) Ding SZ, Goldberg JB & Hatekeyama M. *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetics mechanism in gastric carcinogenesis. *Future Oncol.* 6:851-862,2010.
- (7) Ushijima T & Takada E. Aberrant methylations in cancer cells: Where do they come from? *Cancer Sci.* 96:206-11,2005.
- (8) Roa S JC, García M P, Melo A A, Tapia E O, Villaseca H M, Araya O JC, Guzmán G P. Gene methylation patterns in digestive tumors. *Rev Méd Chile* 136: 451-458,2008.

-
- (9) Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T, Nakao M. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Mol Biol.* 278:24132-8,2003.
- (10) Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY & Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 61:2847-51,2001.
- (11) Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S & Motoyama T. Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol.* 161:399-403,2002.
- (12) Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, Hui WM, Rashid A, Kwong. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut* 52:502–506,2003.
- (13) Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arai K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 12:989–995,2006.
- (14) Nakajima T, Yamashita S, Maekita T, Niwa T, Nakazawa K & Ushijima T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter* infection in human gastric mucosae. *Int. J. Cancer* 124: 905-910,2009.

-
- (15) Kazerounian S, Yee KO & Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol Life Sci* 65: 700–712,2008.
- (16) Roberts D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J* 10: 1183–1191,1996.
- (17) Li Q, Ahuja N, Burger P & Issa JP. Methylation and silencing of the thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 18: 3284–3289,1999.
- (18) Fleuriel C, Touka M, Boulay G, Guérardel C, Rood BR & Leprince D. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 41:26–33,2009.
- (19) Jenal M, Britschgi C, Fey MF & Tschan MP. Inactivation of the hypermethylated in cancer 1 tumour suppressor-not just a question of promoter hypermethylation? *Swiss Med Wkly* 140:w13106,2010.
- (20) Zheng R & Blobel GA. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer* 12:1178-88,2010.
- (21) Laverriere A, MacNeill C, Mueller C, Poelmann E, Burch J & Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in the developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177-23184,1994.
- (22) Wen XZ, Akiyama Y, Pan KF, Liu ZJ, Lu ZM, Zhou J, Gu LK, Dong CX, Zhu BD, Ji JF, You WC, Deng DJ. Methylation of GATA-4 and GATA-5 and development of sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 16:1201-1208,2010.
- (23) Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair KW, van Engeland M, Esteller M, Sakai H, Ren CY, Yuasa Y, Herman JG, Baylin SB. GATA-4 and GATA-5

transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol.* 23:8429-39,2003.

(24) Guo M, Akiyama Y, House MG, Hooker CM, Heath E, Gabrielson E, Yang SC, Han Y, Baylin SB, Herman JG, Brock MV. Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:7917-7924,2004.

(25) Guo M, House MG, Akiyama Y, Qi Y, Capagna D, Harmon J, Baylin SB, Brock MV, Herman JG. Hypermethylation of the GATA gene Family in esophageal cancer. *Int J Cancer* 119:2078-2083,2006.

(26) Coelho LGV, Barros CA, Lima DCA, Barbosa AJA, Magalhães AFN, Queiroz DMM et al. National consensus on “*H. pylori*”. *GED* 15: 53-58,1996.

(27) Dixon M, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 20: 1161-1181,1996.

(28) Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402-8,2001.

(29) Jones P & Bayling S. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428,2002.

(30) Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS & Kim H. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 11:25:3834-41,2005.

-
- (31) Seitz HK & Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 8:599-612,2007. Review.
- (32) Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. *Int J Mol Med* 24:563-9,2009.
- (33) Adams J & Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:961-968,2004.
- (34) Chen H, Herndon E & Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. 2000. *Matrix Biology* 19: 597-614,2000.
- (35) Sid B, Sartelet H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N, Haye B, Martiny L. Thrombospondin1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol/ Hematol* 49:245-258,2004.
- (36) Roberts D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin1. *FASEB J* 10:1183-1191,1996.
- (37) Kang G, Lee H, Hwang K, Lee S, Kim JH & Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia and chronic inflammation. *Am J Pathol* 163:1551-1556,2003.
- (38) Oue N, Matsumura S, Nakayama H, Kitadai Y, Taniyama K, Matsusaki K, Yasui W. Reduced expression of the TPS1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Oncology* 64:423-429,2003

-
- (39) Guo W, Dong Z, He M, Guo Y, Guo J, Chen Z, Yang Z, Kuang G. Aberrant methylation of Thrombospondin-1 and its association with reduced expression in gastric cardia adenocarcinoma. *J of Biomed Biotech* doi 10.1155/2010/721485,2010.
- (40) Miyamoto N, Yamamoto H, Taniguchi H, Miyamoto C, Oki M, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y. Differential expression of angiogenesis-related genes in human gastric cancers with and those without high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett* 254:42-53,2007.
- (41) Lopez-Dee Z, Pidcock K & Gutierrez L. Thrombospondin-1: Multiple paths to inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2011:296069,2011.
- (42) Lassus H, Laitinen MP, Anttonen M, Heikinheimo M, Aaltonen LA, Ritvos O, Butzow R. Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4. *Lab Invest* 81:517-26,2001.
- (43) Kanai Y, Ushijima S, Ochiai A, Eguchi K, Hui A, Hirohashi S. DNA hypermethylation at the D17S5 locus is associated with gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 122:135-41,1998.
- (44) Kanai Y, Hui AM, Sun L, Ushijima S, Sakamoto M, Tsuda H, Hirohashi S. DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 29:703-709,1999.
- (45) Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR & Goel A. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47:908-18,2008.

-
- (46) Svedlund J, Koskinen Edblom S, Marquez VE, Åkerström G, Björklund P & Westin G. Hypermethylated in cancer 1 (HIC1), a tumor suppressor gene epigenetically deregulated in hyperparathyroid tumors by histone H3 lysine modification. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1307-15,2012.
- (47) Dong SM, Kim HS, Rha SH & Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 7:1982-6,2001.
- (48) Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 60:1835-9,2000.

Table 1. Primers used for MSP-PCR

Gene		Primer sense (5'—3')	Primer antisense (5'—3')	Ref
<i>THBS1</i>	M	TGCGAGCGTTTTTTTAAATGC	TAACTCGCAAACCAACTCG	(48)
	U	GTTTGGTTGTTGTTTATTGGTTG	CCTAAACTCACAAACCAACTCA	
<i>GATA4</i>	M	GTATAGTTTCGTAGTTTGCGTTTAGC	AACTCGCGACTCGAATCCCCG	(24)
	U	TTTGTATAGTTTTGTAGTTTGTGTTTAGT	CCCAACTCACAACCTCAAATCCCCA	
<i>HIC1</i>	U	TGGAGTTTGTTTTTAGGTTAGTTTTTGGT	CAAACCAATACAATAAACAACAAACCA	(47)
	M	TCGGTTTTCGCGTTTTGTTCGT	AACCGAAAACCTATCAAC CCTCG	
	U	TTGGGTTTGTTTTGTGTTTTG	CACCCTAACACCACC CTAAC	

M – for methylated sequences, U- for unmethylated sequences

Table 2. Primers used for Real-Time PCR

Gene	Primer sense(5'→3')	Primer antisense(5'→3')
<i>β-actin</i>	ACACTGGCTCGTGTGACAAGG	CGGCTAATACACACTCCAAGGCG
<i>THBS1</i>	GACAACAACGTGGTGAATGG	CTGGACAGCTCATCACAGGA
<i>GATA-4</i>	GTGTGTCAACTGTGGGGCTA	TGCCGTTTCATCTTGTGGTAG
<i>HIC1</i>	CGAGGAGACCGGTAGCAG	TGCACACGTACAGGTTGTCA

Table 3. Promoter methylation frequencies of *THBS1*, *GATA-4*, and *HIC1* in chronic gastritis and gastric cancer patients.

Subjects	<i>THBS1</i>		<i>GATA-4</i>		<i>HIC1</i>	
	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated
Chronic Gastritis						
Child <i>H. pylori</i> neg.	4 (14%)	24 (86%)	2 (7%)	26 (93%)	0 (0%)	28 (100%)
Child <i>H. pylori</i> pos.	13 (59%)**	9(41%)	14 (64%) [#]	8 (36%)	0 (0%)	22 (100%)
Adult <i>H. pylori</i> neg.	1(7%)	13 (93%)	0 (0%)	14 (100%)	0 (0%)	14 (100%)
Adult <i>H. pylori</i> pos.	72 (87%)**	11 (13%)	67 (81%) ^{##}	16 (19%)	3(4%)	80(96%)
Gastric Cancer	45 (49%)	47 (51%)	30 (33%)	62(67%)	5 (5,5%)	87(94,5%)

**p<0.001 compared to adult and child *H. pylori* neg. ^{##} p<0.01 compared to adult *H. pylori* neg. [#] p<0.05 compared to child *H. pylori* neg.

Table 4. Relative mRNA expression levels of *THBS1*, *GATA-4* and *HIC1* in chronic gastritis and gastric cancer patients.

Subjects	<i>THBS1</i>		<i>GATA4</i>		<i>HIC1</i>	
	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated
Chronic Gastritis						
Child <i>H. pylori</i> neg.	-	0.054±0.023	-	0.45±0.23	-	0.39±0.15
Child <i>H. pylori</i> pos.	0.058±0.03*	0.17±0.07	0.24±0.02*	0.42±0.18	-	0.42±0.23
Adult <i>H. pylori</i> neg.	-	0.046±0.018	-	0.32±0.1	-	0.56±0.14
Adult <i>H. pylori</i> pos.	0.06±0.02*	0.14±0.06**	0.27±0.07*	0.38±0.1	-	0.55±0.17
Gastric Cancer	0.024±0.015	0.035±0.017	0.13±0.01	0.15±0.04	-	0.20±0.12 [#]

The mRNA levels are expressed as the mean ± SD. *p<0.05 compared to unmethylated samples in the same subject category.

**p<0.01 compared to child and adult *H. pylori* neg. [#]p<0.05 compared to child and adult *H. pylori* pos. and neg.