

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**Efeito do número de sítios EPIYA C da proteína CagA
de *Helicobacter pylori* na produção *in vitro* de
citocinas associadas à carcinogênese gástrica
e avaliação das vias de sinalização**

Sérgio de Assis Batista

**BELO HORIZONTE
2014**

Sérgio de Assis Batista

Efeito do número de sítios EPIYA C da proteína CagA de *Helicobacter pylori* na produção *in vitro* de citocinas associadas à carcinogênese gástrica e avaliação das vias de sinalização

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Co-orientador: Prof. Gifone Aguiar Rocha

Departamento de Microbiologia/Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia/Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2014

**À VIDA,
À minha mãe
À Regina, Maria Luiza
Aos amigos e companheiros
de LPB; Aos amigos Charles e Alexandre
pela amizade incondicional; Aos amigos
e companheiros da minha turma de Ciências
Biológicas; Aos meus sobrinhos, irmãos e cunhados,
em especial a Maria do Carmo e a Marilda; Ao meu pai e
a todos aqueles que de certa forma contribuíram para cada
etapa desse trabalho. Aos meus companheiros de viagens que
tornaram os dias ainda melhores depois de conhecer vários lugares
incríveis, aventurar por momentos para recompor as energias.**

**De forma especial e sendo a base
de tudo, agradeço a
DEUS,
Meu apoio maior.**

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

(Marthin Luther King)



“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar e a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho, de modo especial:

- À minha orientadora Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz.
- Ao meu co-orientador Prof^o. Gifone Aguiar Rocha.
- À Prof^a. Andreia Maria Camargos Rocha.
- Ao Prof^o. Marcus Vinícius Melo de Andrade.
- Ao Prof^o. Jose Renan da Cunha Melo.
- À Prof^a. Daniele da Glória de Souza.
- Ao Prof^o. Aristóbolo Mendes da Silva.
- À Prof^a. Luciana Diniz.
- À Dr^a. Juliana Becattini Guerra.
- À Prof^a. Silvia Beleza de Moura.
- À Prof^a. Patrícia Silva Cisalpino.
- Ao Fabrício Freire de Melo
- À Fernanda Diniz Prates
- À Maria Luíza, Regina e Marina.
- Ao Charles, Adriana, Rafael e César, colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia/UFMG.
- À Vanuza, alunos e professores do Laboratório professor Lineu Freire.
- À Daniela, alunos e professores do Laboratório de Neurociências da Faculdade de Medicina da UFMG.
- Aos colegas de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia/UFMG.



- Aos amigos Charles, Alexandre, Ricardo, Otávio, Millan, Rogério e Víctor.
- Às amigas Renata, Sílvia e Luciana Gomes,
- Aos funcionários, bolsistas de Apoio Técnico e de Iniciação Científica do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia.
- Ao professor Aristóbolo e seu aluno Brener pela colaboração nos experimentos com as células THP-1.
- Aos médicos Paulo Bittencourt e Simone Diniz e aos funcionários do Serviço de Endoscopia Digestiva Alta do Hospital das Clínicas/UFMG.
- Aos médicos e funcionários do Hospital Luxemburgo e do Hospital Mário Penna.
- Ao corpo docente do Departamento de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.
- Aos funcionários do Departamento de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.
- À minha família e em especial minha irmã Maria do Carmo.
- Aos meus sobrinhos.
- A todos meus amigos.
- Aos pacientes que generosamente aceitaram participar desse estudo.
- À CAPES, CNPq e FAPEMIG.

LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XX
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	01
1.1. Características do <i>H. pylori</i> e doenças associadas à infecção.....	01
1.2. A proteína CagA como fator de virulência do <i>H. pylori</i>	03
1.3. Citocinas e fatores de transcrição.....	08
1.4. Relevância das vias de sinalização na produção de citocinas e na carcinogênese.....	11
1.5. Participação dos sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA de <i>H. pylori</i> nas vias de sinalização.....	14
2. OBJETIVOS	19
3. PACIENTES E MÉTODOS	20
3.1. Doadores voluntários.....	20
3.2. Obtenção e manutenção das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> para os ensaios “ <i>in vitro</i> ”.....	21
3.3. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico.....	24
3.4. Estímulo das células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.....	24
3.4.1. Estímulo das células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> para estudo de vias de sinalização.....	25
3.5. Avaliação das vias de sinalização por “Western blot”.....	27
3.6. Avaliação da presença da proteína CagA fosforilada no citoplasma das células por imunoprecipitação.....	28

3.7.	Obtenção das células epiteliais gástricas (AGS) e THP-1.....	29
3.8.	Estímulo das células AGS e THP-1 com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.....	29
3.8.1.	Estímulo das células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> para estudo de vias de sinalização, imunoprecipitação e observação do fenótipo “Beija-flor”.....	30
3.8.2.	Estímulo das células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> para imunoprecipitação e observação do fenômeno de agregação celular.....	31
3.9.	Estímulo das células mononucleares e AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> na presença de inibidores específicos.....	31
3.10.	Determinação da concentração de citocinas nos cocultivos de <i>H. pylori</i> nas células mononucleares e AGS.....	32
3.11.	Quantificação relativa dos transcritos de mRNA por PCR em tempo real.....	33
3.12.	Análise estatística.....	35
4.	RESULTADOS	36
4.1.	Obtenção das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i>	36
4.2.	Identificação das amostras isogênicas por sequenciamento de genes da governança e por RAPD-PCR.....	37
4.3.	Efeito do número de sítios de fosforilação EPIYA C nas vias de sinalização.....	44
4.3.1.	Ativação das vias de sinalização nas células mononucleares do sangue periférico em resposta ao estímulo com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios EPIYA C.....	44
4.3.2.	Ativação das vias de sinalização nas células AGS em resposta ao estímulo com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios EPIYA C.....	48
4.4.	Produção de citocinas por células mononucleares de indivíduos <i>H. pylori</i> -negativos estimuladas com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com diferentes números de sítios de fosforilação EPIYA C.....	52

4.4.1.	Concentração média de citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios EPIYA C.....	56
4.5.	Concentração média de citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com a amostra <i>cagA</i> -negativa (Tx30A) e a amostra <i>cagA</i> -positiva com um sitio EPIYA C bem como com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios EPIYA C.....	58
4.6.	Concentração de citocinas no sobrenadante dos cocultivos de <i>H. pylori</i> e células mononucleares na presença/ausência de inibidores específicos das vias de sinalização.....	61
4.7.	Concentração de citocinas no sobrenadante dos cocultivos de <i>H. pylori</i> e células AGS na presença/ausência de inibidores específicos das vias de sinalização.....	68
4.8.	Quantificação da expressão relativa dos transcritos de mRNA das referidas citocinas nas células mononucleares na presença/ausência de inibidores específicos.....	72
5.	DISCUSSÃO.....	78
6.	RESUMOS/CONCLUSÕES.....	90
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8.	FIGURAS SUPLEMENTARES.....	107
9.	ANEXOS.....	111

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Iniciadores e condições das reações de PCR, RAPD-PCR e sequenciamento para os genes da governança de <i>H. pylori</i>	22
Tabela 2 -	Ensaio para a amplificação dos transcritos de mRNA das citocinas.....	34
Tabela 3 -	Concentração média (pg/mL) das citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.....	56
Tabela 4 -	Concentração média (pg/mL) das citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.....	59

Lista de Figuras

Figura 1 -	Região carboxi-terminal da proteína CagA de amostras ocidentais com os diferentes padrões de EPIYA seguidos de 1, 2 ou 3 sítios EPIYA C e de amostras asiáticas apresentando o sítio EPIYA D em substituição ao sítio EPIYA C.....	06
Figura 2 -	Vias de sinalização SHP-2/MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT3. Proteínas SOCS3 e SHP-2 atuam como mediadoras da homeostasia.....	13
Figura 3 -	Vias de sinalização da glicoproteína gp130 na presença de infecção por amostras de <i>H. pylori</i> cagA-positivas.....	15
Figura 4 -	Gel de agarose dos produtos amplificados da região variável 3' do gene <i>cagA</i> das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i>	36
Figura 5 -	A- Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região <i>efp</i> das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i>	37
	B- Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região <i>yphC</i> das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i>	38
	C- Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região <i>atpA</i> das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i>	39
	D- Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região <i>ureI</i> das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i>	40
	E- Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região <i>mutY</i> das amostras isogênicas de <i>H. pylori</i>	41
Figura 6 -	Gel de agarose dos produtos amplificados por RAPD-PCR.....	42
Figura 7 -	Alinhamento parcial de aminoácidos das regiões i e d da citotoxina vacuolizante VacA das colônias de <i>H. pylori</i> LPB-14, LPB-2 e LPB-6 com um, dois e três sítios de fosforilação EPIYA C, respectivamente.....	43
Figura 8 -	Células AGS e nononucleares estimuladas com amostras de <i>H. pylori</i> por 24 horas para avaliar os fenótipos (A) “Beija-flor” e (B) agregação celular.....	44

Figura 9 - “Imunoblot” demonstrando a presença da proteína CagA de <i>H. pylori</i> com os sítios de tirosina fosforilados nas células mononucleares, células THP1 e células AGS depois de cocultivo por 6 horas com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com diferentes números de sítios EPIYA C.....	45
Figura 10 - Análise quantitativa da ativação das vias de sinalização ERK1/2 (A), p38 (B), STAT3 (C) e NF-kB (D) nos lisados de células mononucleares do sangue periférico depois de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas de estímulo com amostras de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.....	46
Figura 11 - “Blots” representativos da ativação das vias ERK1/2, p38, STAT3 e NF-kB na forma fosforilada e não fosforilada nos tempos de 4 e 6 horas dos lisados de células mononucleares sem estímulo (controle) e estimuladas com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.	47
Figura 12 - Análise quantitativa da ativação das vias de sinalização ERK1/2 (A), p38 (B), STAT3 (C) e NF-kB (D) nos lisados de células AGS depois de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas de estímulo com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.....	49
Figura 13 - Blots representativos da ativação das vias ERK1/2, p38, STAT3 e NF-kB na forma fosforilada e não fosforilada nos tempos de 4 e 6 horas dos lisados de células AGS sem estímulo (controle) e estimuladas com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.....	50
Figura 14 - “Western blot” de lisado celular dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C depois de 6 horas de incubação na presença/ausência de inibidores.....	51
Figura 15 - Concentração das citocinas no sobrenadante dos cocultivos de células mononucleares de cinco indivíduos <i>H. pylori</i> -negativos estimuladas com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um e três sítios EPIYA C nos tempos de 24 e 48 horas para	

	determinação do tempo de incubação.....	52
Figura 16 -	Concentração das citocinas no sobrenadante dos cocultivos de células mononucleares dos cinco doadores <i>H. pylori</i> -negativos e amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios EPIYA C da proteína CagA, amostra padrão <i>cagA</i> -negativa (Tx30A) e sem estímulo.....	54
Figura - 17	“Box plots” representando as concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, IL-23 e TGF- β (pg/mL) 48 horas depois dos estímulos das células mononucleares com amostra <i>cagA</i> -negativa (Tx30A) e <i>cagA</i> -positiva com um sítio de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo.....	55
Figura - 18	“Box plots” representando as concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, IL-17A, IL-23 e TGF- β (pg/mL) 48 horas depois dos estímulos das células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo.....	57
Figura - 19	“Box plots” representando as concentrações (pg/mL) de IL-1 β , IL-8, IL-11 e TGF- β 48 horas depois do estímulo das células AGS amostra <i>cagA</i> -negativa (Tx30A) e <i>cagA</i> -positiva com um sítio de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo.....	58
Figura - 20	“Box plots” representando as concentrações (pg/mL) de IL-1 β , IL-8, IL-11 e TGF- β 48 horas depois do estímulo das células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo.....	60
Figura - 21	Concentração média de IL-1 β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	61
Figura - 22	Concentração média de IL-6 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	62

Figura - 23	Concentração média de IL-8 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	63
Figura - 24	Concentração média de IL-11 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	64
Figura - 25	Concentração média de IL-17A (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.	65
Figura - 26	Concentração média de IL-23 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.	66
Figura - 27	Concentração média de TGF- β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	67
Figura - 28	Concentração média de IL-1- β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	68
Figura - 29	Concentração média de IL-8 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	69
Figura - 30	Concentração média de IL-11 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	70

Figura - 31	Concentração média de TGF- β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo.....	71
Figura - 32	Expressão relativa de mRNA de IL-1 β no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos.....	72
Figura - 33	Expressão relativa de mRNA de IL-6 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos.....	73
Figura - 34	Expressão relativa de mRNA de IL-8 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos.....	74
Figura - 35	Expressão relativa de mRNA de IL-11 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos.....	75
Figura - 36	Expressão relativa de mRNA de IL-23 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos.....	76
Figura - 37	Expressão relativa de mRNA de TGF- β no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de <i>H. pylori</i> com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos.....	77

Lista de Abreviaturas

Abl – Src family kinase (non-receptor tyrosine kinases)
AKT – Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Proteína cinase B
ATCC – American Type Culture Collection
BHM – Belo Horizonte Medium
C – Cytosine
cagA – cytotoxin-associated gene A
CagA – cytotoxin-associated gene A Protein
cag PAI – *cag*-Pathogenicity Island
DNA – Deoxyribonucleic Acid
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
EPIYA – Phosphorylation motifs (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)
ERK1/2 – Extracellular signal-regulated kinases 1/2
G – Guanine
Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala – Glutamic acid, Proline, Isoleucine, Tyrosine and Alanine
gp130 – Glycoprotein 130
IARC – International Agency for Research on Cancer
iceA – Gene induced by contact with the gastric epithelial cells
IL – Interleukin
JAK/STAT3 – Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription Factor 3
JNK – c-Jun NH₂-terminal Kinase
kb – Kilobase
kDa – Kilodalton
MALT – Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase
MOI – Multiplicity of infection
mRNA – Messenger Ribonucleic Acid
NF- κ B – Factor nuclear *kappa B*
p38 – Mitogen Activated Protein Kinase
pb – base pair
PCR – Polymerase Chain Reaction

qRT-PCR – Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA
RNA – Ribonucleic Acid
ROR γ T – Retinoid-Related Orphan Nuclear
SH2 – Src Homology 2 Domain
SHP-2 – Tyrosine phosphatase 2
SOCS3 – Suppressor of cytokine signaling 3
Src – Src family kinase (non-receptor tyrosine kinases)
SST4 – sistema de secreção do tipo IV
T4SS – Type IV secretion system
TGF- β – Transforming growth factor beta
TNF- α – Tumor necrosis factor alpha
Th1 – T helper 1
Th2 – T helper 2
Th17 – T helper 17
vacA – vacuolating cytotoxin gene A
VacA – vacuolating cytotoxin A
VEGF – Vascular endothelial growth factor

Helicobacter pylori coloniza a mucosa gástrica de seres humanos e a infecção por amostras *cagA*-positivas aumenta o risco de doenças graves como adenocarcinoma gástrico. O *cagA* codifica uma proteína denominada CagA, que é injetada no interior das células epiteliais gástricas através de um sistema de secreção do tipo IV. No citoplasma, a proteína CagA é fosforilada por cinases do hospedeiro nos sítios EPIYA C e interage com a fosfatase SHP-2. O complexo CagA/SHP-2 desencadeia diversos eventos intracelulares, principalmente ligados às vias de sinalização SHP-2/MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT3. Desequilíbrios nessas vias de sinalização, como podem ocorrer na infecção pelo *H. pylori*, têm sido considerados relevantes na carcinogênese, visto que participam no controle de atividades e funções celulares vitais, como apoptose, proliferação, morfogênese e motilidade celular. Entretanto, não há estudos avaliando o efeito do número de sítios EPIYA C na produção de citocinas também consideradas relevantes na carcinogênese gástrica. Portanto, nesse estudo, foi avaliado o efeito do número de sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA na produção de citocinas representativas da resposta Th17 (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23 e TGF- β), bem como de IL-8 e IL-11 em células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis *H. pylori*-negativos (qRT-PCR e ELISA) e células AGS (ELISA) estimuladas por amostras isogênicas de *H. pylori* com diferentes números de sítios de fosforilação EPIYA C. As vias de sinalização envolvidas foram avaliadas por “imunoblot” e os resultados confirmados com inibidores específicos das vias. Os resultados foram analisados com o programa estatístico SPSS e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Foi

demonstrado que a proteína CagA é injetada, clivada e fosforilada no citoplasma das células mononucleares do sangue periférico. A proteína CagA fosforilada, especialmente as amostras com dois e três sítios de fosforilação EPIYA C, interagiram com a fosfatase SHP-2 induzindo a ativação da via MAPK/ERK1/2. Por outro lado, a via JAK/STAT3 foi ativada principalmente pela amostra contendo um sítio EPIYA C. Em decorrência da ativação dessas vias de sinalização foi observado aumento na secreção das citocinas IL-6, IL-11, IL-17A, IL-23 e TGF- β por células mononucleares do sangue periférico e IL-11 por células AGS estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori*, proporcionalmente ao número de sítios de fosforilação EPIYA C da amostra. Por outro lado, foi visto que a secreção de IL-1 β e IL-8 pelas células mononucleares e de IL-1 β , IL-8 e TGF- β pelas células AGS não depende do número de sítios de fosforilação EPIYA C das amostras usadas como estímulo “*in vitro*”. Concluindo, demonstrou-se pela primeira vez que a proteína CagA de *H. pylori* com diferentes números de sítios de fosforilação EPIYA C foi injetada no citoplasma de células da resposta imunológica, clivada e fosforilada ativando as vias de sinalização SHP-2/MAPK/ERK1/2. A via JAK/STAT3 também foi ativada, mas de forma inversamente proporcional ao número de sítios de fosforilação EPIYA C. O resultado final foi o aumento de produção de citocinas associadas à carcinogênese.

Subjects infected with *cagA*-positive *H. pylori* strains are at increased risk for gastric carcinoma. *cagA* (*cytotoxin associated gene A*) encodes the CagA protein that is injected into host gastric epithelial cells via a type 4 secretion system (T4SS) where it undergoes tyrosine phosphorylation by Src family protein kinases and binds SHP-2 (*Src Homology 2 Domain-Containing Tyrosine Phosphatase-2*) phosphatase at several repeated sites in the C-terminal region containing EPIYA C motifs. The complex CagA/SHP-2 leads to sustained activation of several intracellular events, mainly linked to the signalling pathways, SHP-2/MAPK/ERK1/2 and JAK/STAT3, which alters host cell activities and functions including apoptosis, proliferation, morphogenesis and motility, considered relevant in the carcinogenesis. However, up to now there are no studies evaluating the effect of the number of CagA EPIYA C motifs on the production of cytokines, also considered relevant in carcinogenesis. Therefore, in the present study, we evaluated the effect of the number of CagA EPIYA C motifs on the production of cytokines related to Th17 cell commitment (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23 and TGF- β), as well as IL-8 and IL-11, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy *H. pylori*-negative subjects (qRT-PCR and ELISA) and AGS cells (ELISA) stimulated by isogenic *H. pylori* strains with different number of EPIYA C motifs. Signalling pathways involved in CagA interaction were evaluated by immunoblot and the results were confirmed by using specific inhibitors of each pathway. Statistical analyses were performed by using SPSS and the differences were considered significant when p values were ≤ 0.05 . We

demonstrated that CagA protein is injected, broken down and phosphorylated in the cytosol of PBMC after stimulation. CagA, most prominently the strain with two and three EPIYA C motifs, bound to SHP-2 leading to activation of MAPK/ERK1/2 signalling pathway. Otherwise, JAK/STAT3 signalling pathway was mainly activated by *cagA*-positive strain with one EPIYA C motif. As consequence of the activation of these signalling pathways, an increased secretion of IL-6, IL-11, IL-17A, IL-23 and TGF- β by PBMC and IL-11 by AGS cell was observed. Cytokine secretion was proportional to the number of EPIYA C. By contrast, the IL-1 β and IL-8 secretion by PBMC and AGS cells was independent of the number of EPIYA C motifs. In conclusion, we demonstrated, for the first time, that *H. pylori* CagA strains with different number of EPIYA C motifs were injected into cytosol of the immune response cells, where it was broken down and phosphorylated leading to activation of SHP-2/MAPK/ERK1/2 signalling pathway. JAK/STAT3 signalling pathway was also activated, but inversely proportional to the number of EPIYA C motifs. Altogether the alterations resulted in heightened production of cytokine related to carcinogenesis.

1. Introdução e Justificativa

O isolamento do *Helicobacter pylori* a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite e úlcera duodenal por dois pesquisadores australianos, Barry James Marshall e John Robin Warren (Marshall & Warren, 1983), foi considerado um marco na Medicina. A confirmação de que a úlcera péptica é causada pela bactéria melhorou consideravelmente as possibilidades de tratamento e cura da doença. Devido à relevância da descoberta, no ano de 2005, os dois pesquisadores foram agraciados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina.

1.1. Características do *H. pylori* e doenças associadas à infecção

Helicobacter pylori é um microrganismo Gram-negativo, espiralado, não esporulado (Marshall & Warren, 1983) que coloniza cronicamente a mucosa gástrica de seres humanos. Quando cultivada em meio sólido, a bactéria assume forma semelhante a bastonete, sendo menos frequentes as formas espiraladas (Goodwin & Armstrong, 1990). Formas cocóides podem se tornar predominantes em culturas velhas, tanto em meio sólido como líquido (Dunn *et al.*, 1997). É móvel, apresenta superfície lisa e mede aproximadamente 0,5 μm de largura e 2,0 a 3,0 μm de comprimento (Goodwin *et al.*, 1985). Apresenta um número variável de 4 a 6 flagelos uni ou bipolares embainhados e com bulbos terminais nas extremidades distais (Taylor *et al.*, 1995). Os flagelos e a morfologia em espiral conferem motilidade à bactéria, permitindo que penetre na camada viscosa de muco gástrico e se localize

junto às células epiteliais do estômago (Taylor *et al.*, 1995; Covacci *et al.*, 1999; Ferrero, 2005).

A bactéria coloniza a mucosa gástrica dos seres humanos, sendo considerada, atualmente, o principal agente etiológico de gastrite crônica (Wotherspoon *et al.*, 1991; Cover & Blaser, 1996), um fator essencial na patogênese da úlcera péptica (Marshall & Warren, 1983; Graham, 1989), do carcinoma gástrico e do linfoma gástrico do tipo MALT (tecido linfóide associado à mucosa) (Wotherspoon *et al.*, 1991; Wotherspoon & Path, 1998; Higashi *et al.*, 2002a; Franco *et al.*, 2008). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a bactéria é um carcinógeno do tipo 1 (IARC/OMS, 1994) com base em evidências epidemiológicas e plausibilidade biológica (Parsonnet *et al.*, 1991; Wotherspoon & Path, 1998; Fujioka *et al.*, 2000; Suerbaum *et al.*, 2002). A infecção por *H. pylori* é considerada um dos principais problemas mundiais de saúde, pela associação com doenças graves e letais e pelo fato de ser muito prevalente, especialmente nos países em desenvolvimento, onde 60% a 90% (Cunha *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005a) da população estão infectados, ao contrário dos países desenvolvidos onde a infecção atinge 25% a 50% da população (Hamilton-Miller, 2003). No Brasil, a prevalência gira em torno de 60% nos estados do sul e sudeste atingindo quase 100% em algumas áreas, como no norte de Minas Gerais e regiões norte e nordeste do Brasil (Oliveira *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005b; Braga *et al.*, 2007; Motta *et al.*, 2008).

H. pylori é capaz de se estabelecer no estômago humano permanecendo para o resto da vida dos indivíduos, já que casos de cura espontânea são raros (Ilver *et al.*, 1998). A gastrite induzida pelo microrganismo, na maioria das vezes, não leva a consequências adversas (Dunn *et al.*, 1997). Entretanto, cerca de 15% a 20% dos indivíduos *H. pylori*-positivos irão desenvolver doenças graves, o que corresponde a

aproximadamente 7 milhões de casos novos de úlcera péptica e carcinoma gástrico a cada ano ao redor do mundo (Parsonnet *et al.*, 1991; Wotherspoon & Path, 1998; Ilver *et al.*, 1998; Parkin *et al.*, 2005).

Houve aproximadamente um milhão de casos novos de câncer de estômago com 720.000 mortes no ano de 2012 (IARC, 2014). No Brasil foram registradas, no mesmo ano, 22.035 mortes relacionadas ao câncer gástrico. Estimam-se em 2014, 12.870 casos novos da doença entre homens e 7.520 casos novos entre as mulheres, o que corresponde a um risco estimado de 13,19 casos novos para cada 100.000 homens e 7,41 casos novos para cada 100.00 mulheres/ano (INCA, 2014).

1.2. A proteína CagA como fator de virulência do *H. pylori*

Como a presença da infecção simplesmente não é suficiente para explicar porque apenas uma pequena porcentagem dos indivíduos infectados irá desenvolver doenças mais graves, a influência de fatores genéticos do hospedeiro, ambientais e de virulência bacteriana tem sido investigada. Identificar que fatores determinam ou influenciam os eventos que irão culminar no aparecimento dessas doenças graves é de crucial importância para a sua prevenção.

Dentre os fatores de virulência que merecem destaque, o que tem sido um dos mais estudados, o gene *cagA*, codifica uma proteína denominada CagA de 120 a 145 kDa, considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma gástrico (Segal *et al.*, 1999; Odenbreit *et al.*, 2000; Higashi *et al.*, 2002a; Naito *et al.*, 2006). O gene *cagA* é marcador da presença da ilha de patogenicidade *cag* (PAI) que compreende um fragmento de DNA de 40 kb contendo cerca de 28 genes (Covacci *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2001). O conteúdo de G + C (35%) da *cag*

PAI difere do conteúdo de G + C do restante do genoma da bactéria (39%), sugerindo que *cag* PAI foi adquirida horizontalmente e integrada ao cromossomo de *H. pylori* (Tomb *et al.*, 1997; Covacci *et al.*, 1999). Alguns genes da ilha codificam proteínas que formam um sistema de secreção do tipo IV (SST4) (Censini *et al.*, 1996; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000) responsável pela translocação da proteína CagA, para o citosol das células epiteliais gástricas.

Há na região carboxi-terminal da proteína CagA sítios de fosforilação denominados de sequências EPIYA, constituídos por cinco aminoácidos (Ácido Glutâmico, Prolina, Isoleucina, Tirosina e Alanina). Depois da proteína CagA ser translocada para o interior das células epiteliais gástricas pelo SST4, os sítios EPIYA são fosforilados no aminoácido tirosina por cinases da família Src ou por cinase Abl das células do hospedeiro (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007; Poppe *et al.*, 2007; Backert *et al.*, 2010a; Tegtmeyer *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2012). Uma vez fosforilada, a proteína CagA é recrutada na membrana celular onde interage com proteínas da família tirosina fosfatase SHP-2 (*Src Homology 2 Domain-Containing Tyrosine Phosphatase-2*) que apresentam dois domínios SH2. Essa interação da CagA com os domínios SH2 induz mudanças na conformação da fosfatase SHP-2, estimulando sua atividade (Higashi *et al.*, 2002b) e desencadeando mudanças no citoesqueleto celular que levam à formação de pedestais que permitem maior aderência bacteriana, bem como alongamento das células epiteliais que adquirem o fenótipo denominado “hummingbird” (Beija-flor) (Segal *et al.*, 1996; Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001; Saadat *et al.*, 2007). As alterações do citoesqueleto celular são acompanhadas de uma série de eventos que aumentam o risco de mutações genéticas pré-cancerosas (Feng *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1998; Backert *et al.*, 2010b; Tegtmeyer *et al.*, 2011) contribuindo assim, para a carcinogênese (Motiwala *et al.*, 2006; Ostman



et al., 2006). SHP-2 desempenha um papel importante como a regulação de fatores de crescimento que influenciam a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Tang *et al.*, 1995; Hadari *et al.*, 1998; You *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). Além da atividade tirosina fosfatase, SHP-2 pode atuar como uma proteína adaptadora quando fosforilada nas tirosinas Y546 e Y584 localizadas na sua porção carboxi-terminal, quando há a formação de um sítio de acoplamento com outras moléculas, como a proteína CagA. As duas funções, molécula adaptadora e tirosina fosfatase, interferem igualmente nos processos celulares já citados e podem ter efeito direto positivo ou negativo nas cascatas de sinalização envolvidas nesses processos, como a MAPK-ERK1/2 (*Mitogen Activated Protein Kinase-Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) e JAK/STAT3 (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription Factor 3*). A ativação de outras vias como MAPK-p38, JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*) e Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Proteína cinase B (Akt) pela fosforilação da proteína CagA não foi ainda estudada.

Análises da região carboxi-terminal da proteína CagA que contem as sequências EPIYA identificaram a existência de 3 sequências: a primeira, denominada EPIYA A, a segunda EPIYA B, e a terceira EPIYA C. Os sítios A e B seguidos de uma a três repetições do sítio C estão presentes na proteína CagA da maioria das amostras dos países ocidentais (Hatakeyama, 2009). Já, as amostras isoladas nos países asiáticos contêm o sítio D em substituição ao C (Higashi *et al.*, 2002a; Argent *et al.*, 2004; Hatakeyama *et al.*, 2005). Os diferentes sítios são determinados pelos aminoácidos que flanqueiam as sequências EPIYA como mostra a Figura 1.

As sequências C e D são consideradas os principais sítios de fosforilação e o sítio D fosforilado tem maior afinidade de ligação à SHP-2. Entretanto, quando há

duas a três repetições da sequência EPIYA C também ocorre maior afinidade de ligação à SHP-2 com consequente aumento da atividade da fosfatase (Higashi *et al.*, 2002b; Naito *et al.*, 2006).

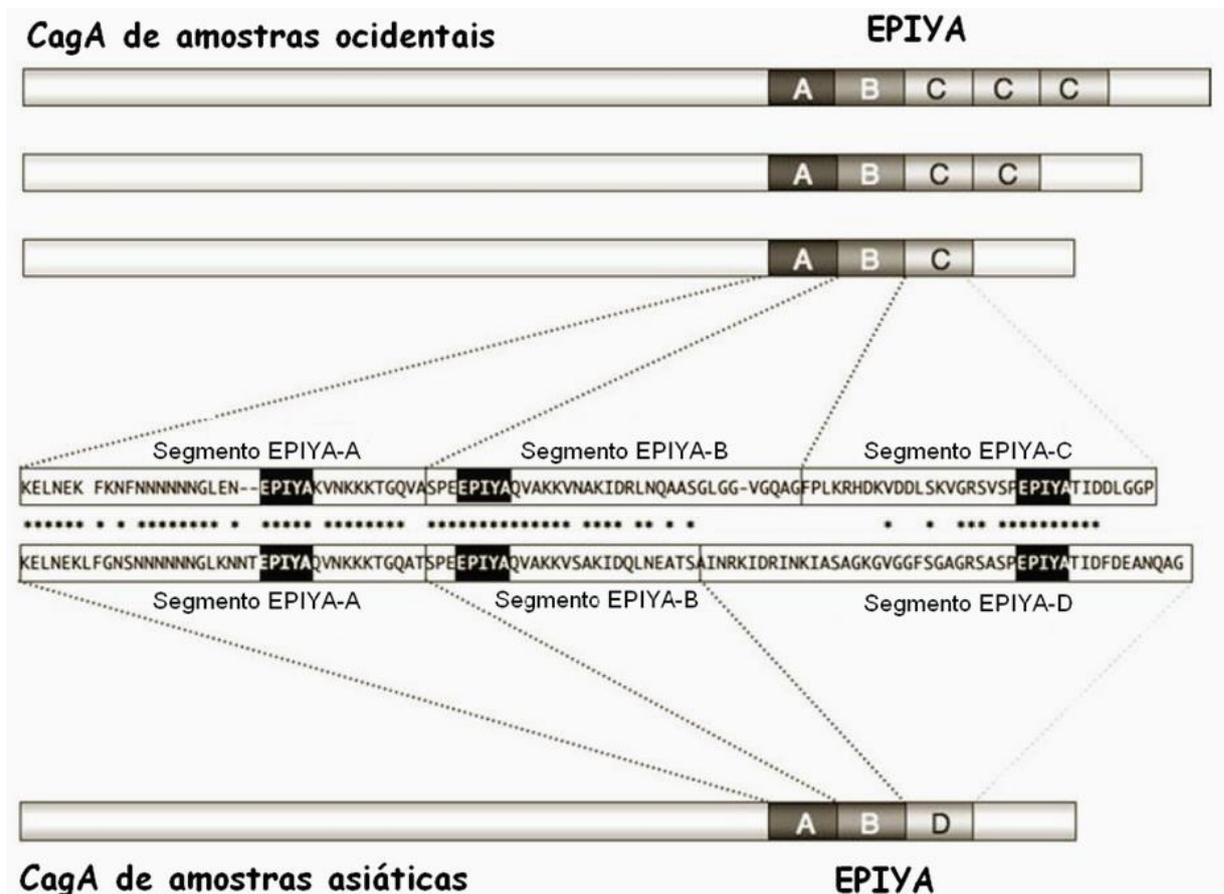


Figura 1 – Região carboxi-terminal da proteína CagA de amostras ocidentais com os diferentes padrões de EPIYA seguidos de 1, 2 ou 3 sítios EPIYA C e de amostras asiáticas apresentando o sítio EPIYA D em substituição ao sítio EPIYA C.

Recentemente, nosso grupo avaliou 436 amostras de *H. pylori cagA*-positivas isoladas de pacientes adultos (188 com carcinoma gástrico, 112 com úlcera duodenal e 136 com gastrite) e foi observado que a infecção por amostras de *H. pylori cagA*-positivas contendo dois ou mais sítios de fosforilação EPIYA C na proteína CagA está associada com o carcinoma gástrico, independentemente da

idade e do sexo do paciente (Batista, 2010; Batista *et al.*, 2011). Por outro lado, embora pacientes com úlcera duodenal sejam frequentemente colonizados por amostras de *H. pylori cagA*-positivas, no estudo não foi observada associação entre o número de sequências EPIYA C e úlcera duodenal, uma vez que a maioria dos pacientes com úlcera duodenal era colonizada por amostras de *H. pylori* com apenas uma sequência EPIYA C (Batista, 2010; Batista *et al.*, 2011).

Considerando os resultados de Batista e colaboradores (2010 e 2011) e com base no fato de que a transmissão da infecção pelo *H. pylori* é predominantemente intrafamiliar, é esperado que parentes próximos compartilhem as mesmas cepas bacterianas. Portanto, é razoável supor que parentes de primeiro grau de pacientes com carcinoma gástrico sejam colonizados por amostras de *H. pylori* que secretam a proteína CagA com mais de um sítio EPIYA C, estando; assim, sujeitos a risco aumentado de carcinoma gástrico. Embora diversos estudos demonstrem associação positiva entre história familiar e risco para carcinoma gástrico em parentes de primeiro grau de pacientes com a doença (Brener *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002; Motta *et al.*, 2008; Yaghoobi *et al.*, 2010; Mansour-Ghanaei *et al.*, 2012), há poucos estudos investigando a presença de fatores de virulência nas amostras de *H. pylori* de familiares de pacientes com carcinoma gástrico. Argent e colaboradores (2008), ao avaliarem parentes de primeiro grau de pacientes com carcinoma gástrico, observaram associação entre genótipo *vacA s1m1* e hipocloridria secundária a lesões gástricas atróficas que são pré-malignas. Os autores, no entanto, não encontraram associação entre o número de sítios EPIYA C e risco de carcinoma gástrico, o que pode ser explicado pelo pequeno número de indivíduos analisados. Para avaliar a hipótese formulada acima, em um estudo em parceria com pesquisadores da Universidade Federal do Ceará, investigamos a

presença de sítios de fosforilação EPIYA em amostras de *H. pylori* de parentes de primeiro grau de pacientes com carcinoma gástrico, comparando os resultados com os de um grupo de pacientes com sintomas dispépticos, sem história familiar de carcinoma gástrico. Nesse estudo, já publicado (anexo 1), foi observado que os parentes de primeiro grau de pacientes com carcinoma gástrico são mais frequentemente colonizados por amostras de *H. pylori* contendo maior número de sítios de fosforilação EPIYA C na proteína CagA, o que indica que essas amostras circulam no ambiente familiar. E foi visto, também, que a infecção por amostras de *H. pylori* contendo maior número de sítios de fosforilação EPIYA C na proteína CagA associou-se com maior grau de inflamação, hiperplasia foveolar e atrofia do corpo gástrico; lesões que precedem o câncer gástrico.

1.3. Citocinas e fatores de transcrição

Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , têm sido consideradas relevantes no curso da infecção pelo *H. pylori* (Yamaoka *et al.*, 1997; Katagiri *et al.*, 1997; Lindholm *et al.*, 1998; El-Omar, 2001; Vilaichone *et al.*, 2005). No estômago, além de induzir inflamação, a IL-1 β , atua diretamente na célula parietal, inibindo a secreção ácida, o que favorece a alcalinização do corpo gástrico, condição favorável para a migração do microrganismo e colonização do corpo gástrico, região habitualmente menos colonizada em decorrência da acidez. Assim, há aumento do grau de inflamação do corpo gástrico predispondo à atrofia (lesão pré-neoplásica), e maior risco de carcinogênese (El-Omar *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005).

Recentemente, foi descrita uma nova linhagem de células T CD4+, distinta das clássicas células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), denominada T helper 17 (Th17). As células Th17 produzem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-17A, IL-17F, IL-6 e TNF- α que atuam na resposta imunológica contra bactérias extracelulares e fungos. Ainda, há evidências de que são importantes mediadoras inflamatórias nas doenças da autoimunidade e em processos envolvidos na carcinogênese (Wilson *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2010). Nos seres humanos, a diferenciação de células Th17 depende dos fatores de transcrição STAT3 e ROR γ t (*retinoid-related orphan nuclear*) e das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-23 e TGF- β (Volpe *et al.*, 2008; Korn *et al.*, 2009; Littman & Rudensky, 2010). Embora haja divergência entre os trabalhos quanto à participação da IL-23 na diferenciação das células Th17 em seres humanos, há consenso de que a citocina é importante para a manutenção/estabilização das células Th17 (McGeachy *et al.*, 2007; Awasthi & Kuchroo, 2009). A principal citocina pró-inflamatória produzida pelas células Th17, IL-17A, estimula, na mucosa gástrica, a produção de IL-8 e outras quimiocinas facilitando a quimiotaxia de neutrófilos. A IL-17A também regula positivamente a produção de uma variedade de fatores pró-angiogênicos, como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e prostaglandinas E1 (PGE1), tanto por fibroblastos como por células tumorais, sendo considerada importante na carcinogênese gástrica.

A IL-6 tem papel crucial na diferenciação das células Th17 por mecanismos que incluem a inibição da ativação do fator de transcrição Foxp3 estimulada por TGF- β (Korn *et al.*, 2009), o que, conseqüentemente, resulta na indução e diferenciação das células Th17. Trabalhos destacam a importância, na infecção por *H. pylori*, da IL-6 na inibição da apoptose de células da mucosa gástrica e

hiperproliferação, que predispõem ao acúmulo de mutações, contribuindo para a gênese do câncer gástrico (Lin *et al.*, 2001). Ainda, a IL-6 parece estar envolvida no processo de angiogênese atuando na modulação do VEGF (Kawaguchi *et al.*, 2004).

Atualmente, a IL-11 tem sido considerada uma molécula importante no desenvolvimento do câncer gástrico, participando tanto no processo inflamatório, quanto nos processos de carcinogênese propriamente ditos e invasão (Necula *et al.*, 2012). A IL-11 pode influenciar a homeostasia epitelial por meio da diminuição da apoptose e aumento de mitose (Howlett *et al.*, 2009). Há vários trabalhos mostrando a participação da citocina na gênese do câncer por mecanismos que incluem a ativação de STAT3 e consequente indução de sinais anti-apoptóticos (Kanda *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2007; Merchant *et al.*, 2008; Lay *et al.*, 2012; G; Howlett *et al.*, 2012).

As proteínas STATs constituem uma família de fatores de transcrição latentes que existem como monômeros no citoplasma das células (Yu & Jove, 2004; Yu *et al.*, 2007). Dentre os membros dessa família, STAT3 pode ser ativado pela glicoproteína gp130, por diferentes citocinas, incluindo IL-6, IL-11, fator neurotrófico ciliar, oncostatina M e fator inibidor de leucemia. Em resposta a estímulos, como a presença de IL-11, ocorre a associação (dimerização) das cadeias α e β de JAK e sua ativação. A ativação de JAK leva à fosforilação de resíduos de tirosina na gp130 que recrutam monômeros de STAT3, que por sua vez, são fosforilados e formam dímeros. Os dímeros de STAT3 são translocados para o núcleo onde regulam a transcrição de vários genes envolvidos no crescimento e diferenciação celular.

Estudos “*in vitro*” demonstraram que a ativação de STAT3 promove a proliferação, migração e invasão de células tumorais no carcinoma gástrico (Dauer *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2007) e regula positivamente a expressão de potentes

fatores angiogênicos (Dauer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012). Em condições fisiológicas normais, a ativação de STAT3 é temporária, com duração de alguns minutos a algumas horas (Bromberg, 2001). Em contraste, em muitos tipos de tumores humanos, STAT3 é ativada constitutivamente e contribui para a carcinogênese, tanto por inibição da apoptose quanto por aumento da proliferação celular (Lin *et al.*, 2001; Yu & Jove, 2004; Yu *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao câncer gástrico, STAT3 é constitutivamente fosforilado em várias linhagens celulares do tumor (Kanda *et al.*, 2004). Estudos “*in vivo*”, em camundongo “knock in”, com mutação induzida na subunidade do receptor gp130, que resulta em aumento constitutivo da transcrição de STAT3, demonstraram que os animais desenvolveram espontaneamente tumores no antro gástrico nas quatro primeiras semanas de vida (Tebbut *et al.*, 2002; Judd *et al.*, 2004). Os achados desses e de outros estudos reforçam a hipótese de que a ativação de STAT3 desempenha papel crítico na carcinogênese (Howlett *et al.*, 2009; Jackson & Giraud, 2009; Chen *et al.*, 2012).

1.4. Relevância das vias de sinalização na produção de citocinas e na carcinogênese

Por meio de vias de sinalização as células acoplam a ativação de receptores presentes na membrana celular a alvos críticos intracelulares, gerando respostas coerentes, tanto na manutenção da homeostase celular quanto na ocorrência de processos biológicos mais complexos, como proliferação, diferenciação celular e apoptose.

A via das MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase*) é uma das principais vias de sinalização, altamente conservada, e envolvida no controle das mais



diversas funções celulares. A via é composta por três proteínas cinases: uma MAP cinase cinase cinase (MAPKKK), que fosforila e ativa uma MAP cinase cinase (MAPKK), que, por sua vez, ativa também por fosforilação uma MAP cinase (MAPK). Esta configuração proporciona, não somente a amplificação do sinal, como talvez ainda mais relevante, a regulação de outras interfaces que permitem que a cinética de duração e amplitude da atividade seja precisamente ajustada. Há descritos sete grupos distintos de MAPKs que compartilham componentes estruturalmente relacionados, porém parecem mediar respostas biológicas específicas (Kolch, 2000; Bardwell *et al.*, 2009). Dentro da via das MAPKs, as mais bem estudadas são ERK1/2, p38 e JNK, sendo a primeira via preferencialmente ativada em resposta a fatores de crescimento enquanto que as demais são ativadas por estímulos de estresse, como choque osmótico e de citocinas pró-inflamatórias. Uma vez ativada, MAPK é capaz de modular o funcionamento de uma série de proteínas alvo em todos os compartimentos celulares, incluindo núcleo, citoplasma, membranas e citoesqueleto (Roux e Blenis, 2004). Seus substratos vão desde fatores de transcrição, proteínas de membrana, outras proteínas cinases e moléculas do citoesqueleto. A ativação destas vias pode desencadear eventos celulares dos mais diversos, incluindo proliferação, interferência no ciclo celular, diferenciação, apoptose e produção de citocinas (Enslin e Davis, 2001; Sacks, 2006).

Apesar da complexidade desses eventos intracelulares, a compreensão dessas vias vem sendo elucidada com a descoberta de ferramentas de biologia molecular e bioquímica. Inibidores específicos de moléculas, que são essenciais para a ativação dos sinais, têm sido considerados uma ferramenta de grande relevância para melhor compreender esse sistema complexo de comunicação que governa e coordena as atividades e funções celulares.

Citocinas da família IL-6, principalmente IL-6 e IL-11, ao se ligarem a seus receptores celulares específicos, IL-6R α e IL-11R α , formam complexos que se associam com homodímeros de gp130 levando à formação de hexâmeros constituídos por duas moléculas do ligante, duas moléculas do receptor α (gp80) e duas de gp130 (Peters *et al.*, 1998; Howlett *et al.*, 2009). Uma vez formado o complexo, duas vias podem ser ativadas nos seres humanos. Uma pela fosforilação da tirosina localizada na posição Y759 da gp130 ativando a via SHP-2/MAPK/ERK1/2, e a segunda pela fosforilação de uma das quatro tirosinas Y767, Y814, Y905 ou Y915 na posição carboxi-terminal da gp130 (Figura 2) que leva à ativação de JAK/STAT3 (Nishihara *et al.*, 2007). A ativação de SHP-2 e sua ligação na tirosina Y759 da gp130 é um evento inicial crítico para a ativação da via SHP-2/MAPK/ERK1/2 (Howlett *et al.*, 2009; Eulenfeld *et al.*, 2012).

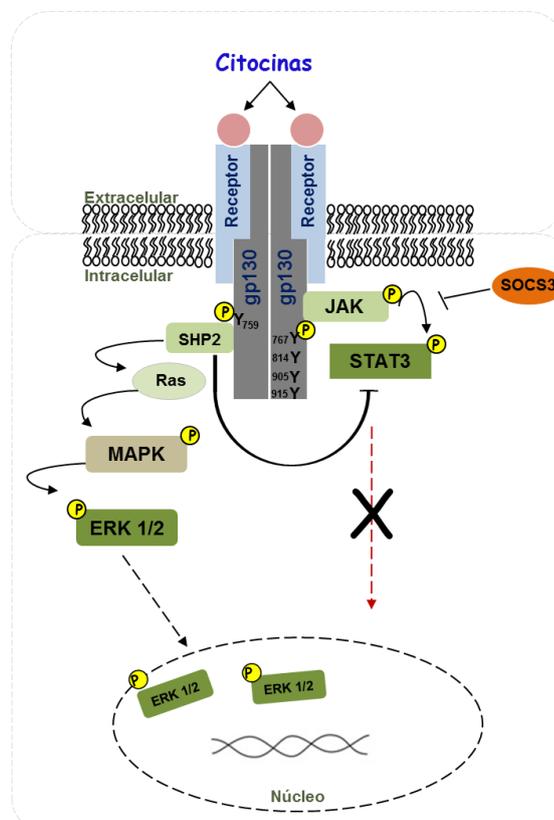


Figura 2: Vias de sinalização SHP-2/MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT3. Proteínas SOCS3 e SHP-2 atuam como mediadoras da homeostasia.

O controle da via JAK/STAT3 é mediado por proteínas, entre elas as denominadas SOCS (*suppressor of cytokine signalling proteins*) 1 e 3. A via também pode ser negativamente controlada por SHP-2, que depois de ser recrutada pela tirosina fosforilada (Y759) da gp130 bloqueia, de forma semelhante à SOCS3, a ativação de STAT3 (Figura 2) (Howlett *et al.*, 2009).

Assim, a ativação SHP-2/MAPK/ERK1/2 inibe a ativação de JAK/STAT3 e vice-versa. Como as duas vias são consideradas relevantes na carcinogênese, visto que participam no controle de atividades e funções celulares vitais, como apoptose, proliferação, morfogênese e motilidade celular (Neel *et al.*, 2003; Meloche *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010), um desequilíbrio nas vias induzido pela infecção pelo *H. pylori* pode predispor à carcinogênese gástrica (Figura 3).

1.5. Participação dos sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA de *H. pylori* nas vias de sinalização

Na infecção pelo *H. pylori* há a ativação de uma complexa rede de citocinas e quimiocinas na mucosa gástrica. Fatores de virulência bacterianos, bem como a genética do hospedeiro, parecem ditar o equilíbrio entre tolerância e resposta inflamatória no curso da infecção. A quimiocina IL-8, um potente fator quimiotático e ativador de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, contribui para uma resposta inflamatória mais acentuada. Nos pacientes colonizados por amostras de *H. pylori* *cagA*-positivas observam-se níveis aumentado de IL-8 (Crabtree *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 2001; Viala *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2005). Embora a secreção da quimiocina seja ativada pela via MAPK/ERK/NF- κ B, trabalhos recentes têm demonstrado, tanto “*in vivo*”, quanto “*in vitro*”, que o efeito ocorre de forma independente do número de sítios EPIYA C (Prates, 2012; Papadakos *et al.*, 2013).

Como já mencionado, nas infecções por amostras de *H. pylori* *cagA*-positivas que carregam *cag* PAI, a proteína CagA é fosforilada nos sítios EPIYA C e liga-se à SHP-2. Ocorre, então, a ativação da via SHP-2/MAPK/ERK1/2 o que causa alterações no citoesqueleto celular culminando com o descontrole na regulação do crescimento celular, do contato célula/célula e da migração celular (Backert *et al.*, 2001; Saadat *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). Além disso, a função de controle negativo na via JAK/STAT3, desempenhada pela SHP-2, pode ser perdida quando SHP-2 se encontra ligada à proteína CagA, favorecendo o aumento da fosforilação de STAT3, como mostra a Figura 3. Uma vez ativado, STAT3 pode participar na progressão para o carcinoma gástrico (Lee *et al.*, 2010). STAT3 também é um fator de transcrição de citocinas, especialmente IL-6, IL-11 e IL-23, que têm sido associadas à carcinogênese por vários mecanismos e também participam na diferenciação de células Th17, recentemente reconhecidas como relevantes na carcinogênese (Chen *et al.*, 2006).

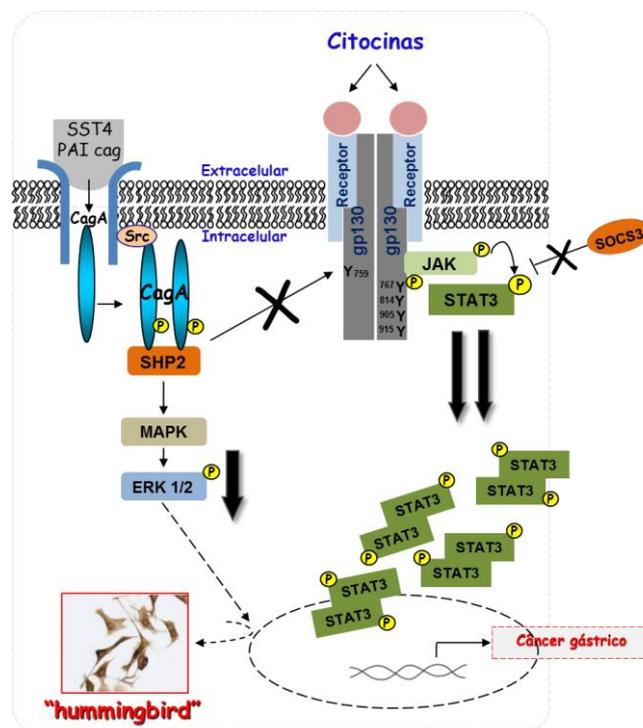


Figura 3: Vias de sinalização da glicoproteína gp130 na presença de infecção por amostras de *H. pylori* *cagA*-positivas.

Para melhor compreender a importância dos sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA no desenvolvimento das doenças graves associadas ao *H. pylori*, no que se refere à indução de citocinas cuja transcrição pode ser desencadeada pela ativação das vias SHP-2/MAPK/ERK1/2 ou JAK/STAT3, recentemente nosso grupo investigou, “*in vivo*”, o efeito do número de sítios EPIYA C na concentração gástrica de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, IL-17A, IL23 e TGF- β (Prates, 2012). Foram estudados 101 pacientes com câncer gástrico e 105 com gastrite. Nos pacientes com gastrite, infectados por amostras de *H. pylori* com um maior número de sítios EPIYA C, a concentração gástrica de IL-11, IL-17A e IL-23 foi maior que naqueles infectados por amostras de *H. pylori* com até um ou nenhum sítio EPIYA C. Nos pacientes com câncer gástrico, a concentração gástrica de IL-6, IL-11, IL-17A, IL-23 e TGF- β foi maior nos pacientes infectados com amostras com dois ou mais sítios EPIYA C quando comparados com pacientes infectados com amostras com um sítio de fosforilação EPIYA C.

Trabalhos recentes têm demonstrado o efeito da proteína CagA, em células AGS de coleção (ATCC CRL-1739, células de câncer gástrico humano) na produção de citocinas. Embora diversos autores tenham avaliado o efeito da proteína CagA em células AGS na produção de IL-8 (Kim *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2009; Lamb *et al.*, 2009; Backert & Naumann, 2010; Papadakos *et al.*, 2013), não há estudos investigando outras citocinas relevantes nos processos envolvidos na carcinogênese.

Odenbreit *et al.* e Moese *et al.* (2001) demonstraram que a proteína CagA de *H. pylori* é translocada para o interior, não somente de células epiteliais gástricas, mas também de células humanas específicas da reposta imunológica (U937 - ATCC CRL-1593.2, células de linfoma histiocítico, THP1 - ATCC TIB-202, células de

leucemia monocítica aguda, JoskM - DSM ACC30, células de Leucemia mielomonocítica aguda e em Promielócitos), onde CagA é fosforilada nos sítios EPIYA por proteínas cinases celulares. Ao contrário do que ocorre nas células epiteliais, como observado nas células AGS, no interior das células da resposta imunológica a proteína CagA é processada em dois fragmentos, um de aproximadamente 100-105 kDa e o outro de 30 a 40 kDa, variação que se deve, principalmente, à presença dos diferentes números de sítios de fosforilação EPIYA C. Vale ressaltar, também, que recentemente Lin *et al.* (2010) demonstraram, por microscopia confocal, que o *H. pylori* também é capaz de injetar a proteína CagA em linfócitos B, sendo posteriormente fosforilada por cinases do hospedeiro desencadeando diversos eventos intracelulares que, de acordo com os autores, podem estar associados com o desenvolvimento do linfoma gástrico do tipo MALT. Entretanto, não há estudos avaliando o efeito da proteína CagA, no que se refere à produção de citocinas, em células específicas da resposta imunológica. Além disso, os trabalhos com células da resposta imunológica não avaliaram a influência do número de sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA de *H. pylori* nas vias de sinalização, vias que são responsáveis tanto pela manutenção da homeostase celular quanto pela ocorrência de processos biológicos mais complexos, como diferenciação celular, proliferação e apoptose. Como descrito anteriormente, um desequilíbrio nessas vias de sinalização induzido pela infecção pelo *H. pylori*, principalmente por amostras *cagA*-positivas, pode predispor à carcinogênese gástrica.

Com base no descrito, visando avaliar o efeito do número de sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA de *H. pylori* na produção de citocinas ligadas

à carcinogênese gástrica, bem como nas vias de sinalização envolvidas, são objetivos desse estudo:

2. Objetivos

1. Obter amostras isogênicas de *H. pylori* (exceto para o número de sítios de fosforilação EPIYA C).
2. Determinar a concentração de citocinas representativas da resposta Th17 (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23 e TGF- β), bem como de IL-8 e IL-11 por ensaio imunoenzimático em sobrenadantes de células mononucleares e AGS estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.
3. Avaliar o efeito do número de sítios de fosforilação EPIYA C nas vias de sinalização MAPKs (ERK1/2 e p38), JAK/STAT3 e NF- κ B ativadas nas células mononucleares do sangue periférico e AGS estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.
4. Avaliar por meio do uso de inibidores específicos (PD98059, SB203580, 5,15-DPP, Bay11-7082) as vias envolvidas na produção das citocinas representativas da resposta Th17, bem como de IL-8 e IL-11 em sobrenadantes de células mononucleares e AGS estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.
5. Determinar no lisado celular, por quantificação relativa, os transcritos de mRNA das referidas citocinas por PCR em tempo real, antes e depois de estímulo com as amostras isogênicas na presença/ausência de inibidores específicos.

3. Pacientes e Métodos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer nº ETIC 0578.0.203.000-10, anexo 2), e foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da Faculdade de Medicina/UFMG.

Os voluntários assintomáticos que aceitaram participar do estudo, depois de terem sido informados sobre todos os procedimentos, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 3).

3.1. Doadores voluntários

Como a prevalência da infecção em nosso meio é de aproximadamente 60% entre adultos, 12 indivíduos foram convidados a participar do estudo. Para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico, foram selecionados cinco indivíduos assintomáticos, *H. pylori*-negativos, que foram recrutados dentre professores e alunos de pós-graduação da Faculdade de Medicina e Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Esses indivíduos foram submetidos ao teste respiratório com uréia marcada com ^{13}C (de Carvalho *et al.*, 2003) e, daqueles doadores com resultado negativo para *H. pylori* ($n = 5$), foram colhidos 20 mL de sangue periférico, sistema a vácuo em tubos contendo EDTA. Deve ser ressaltado que a participação foi inteiramente voluntária e que o teste respiratório com ^{13}C , isótopo não radioativo, não oferece nenhum risco para os participantes.

3.2. Obtenção e manutenção das amostras isogênicas de *H. pylori* para os ensaios “*in vitro*”

Amostras isogênicas, com diferentes números de sítios EPIYA C, foram obtidas de colônias individuais nas placas de cultivo com meio BHM (Belo Horizonte medium), onde fragmentos de mucosa gástrica de um paciente com câncer gástrico atendido no Hospital das Clínicas para a remoção cirúrgica do estômago foram cultivados. Foi possível isolar colônias de bactéria com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C (ABC, ABCC e ABCCC). BHM é composto por ágar-infusão cérebro-coração (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com sangue de carneiro a 10%, 6 mg/L de vancomicina e 20 mg/mL de ácido nalidíxico (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) (Queiroz *et al.*, 1987).

A determinação do número de sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA de *H. pylori* foi feita por PCR e sequenciamento de acordo com a metodologia descrita por Yamaoka e colaboradores (1998). Para confirmar a isogenia das amostras (exceto pelo número de sítios de fosforilação EPIYA C), foram adotados dois procedimentos. Inicialmente, cinco genes da governança (*efp*, *yphC*, *atpA*, *ureI* e *mutY*) foram sequenciados de acordo com a metodologia proposta por Achtman *et al.* (1999). Resumidamente, a amplificação por PCR dos genes da governança foi feita em um volume final de 30 µL, contendo 50 a 100 ng de DNA; tampão da Taq DNA polimerase a 1X (KCl 50 mM e Tris-HCl 20 mM, pH 8,4); 1,5 mM de MgCl₂; 100 µM de cada um dos deoxinucleotídeos (Promega, Madison, WI, EUA); 0,5 U de “Platinun Taq DNA polimerase” (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 10 picomols de cada um dos iniciadores. Os iniciadores e as condições de reação estão descritos na Tabela 1. Para o sequenciamento, os produtos amplificados foram purificados com o kit de purificação Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega) de acordo

com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados com o kit de reação ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing em um sequenciador automático de DNA ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas dos cinco genes da governança das amostras isogênicas apresentaram 100% de identidade.

Tabela 1 - Iniciadores e condições das reações de PCR, RAPD-PCR e sequenciamento para os genes da governança de *H. pylori*

Gene	Produto gênico ou função	Condições de reação da PCR	Iniciadores	Tamanho (pb) ²
<i>efp</i> ¹	Elongation factor EF-P	94°C-2 min.; 30 ciclos de (94°C-30 seg.; 56°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-5 min. de extensão final.	F: 5'-GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC-3' R: 5'-CTTCACCTTTTCAAGATACTC-3'	410
<i>yphC</i> ¹	GTPase	94°C-2 min.; 30 ciclos de (94°C-30 seg.; 55°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-5 min. de extensão final.	F: 5'-CACGCCTATTTTTTACTAAAAAC-3' R: 5'-CATTYACCCCTCCCAATGATGC-3'	510
<i>atpA</i> ¹	ATP synthase, F1 α	94°C-2 min.; 30 ciclos de (94°C-30 seg.; 56°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-5 min. de extensão final.	F: 5'-GGACTAGCGTTAAACGCACG-3' R: 5'-CTTGAAACCGACAAGCCAC-3'	627
<i>ureI</i> ¹	Urease accessory protein	94°C-2 min.; 30 ciclos de (94°C-30 seg.; 53°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-5 min. de extensão final.	F: 5'-AGGTTATTCGTAAGGTGCG-3' R: 5'-GTTTAAATCCCTTAGATTGCC-3'	585
<i>mutY</i> ¹	A/G-specific adenine glycosylase	94°C-2 min.; 30 ciclos de (94°C-30 seg.; 56°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-5 min. de extensão final.	F: 5'-GTGGTTGTAGYTGAAACTTTACAC-3' R: 5'-CTTAAGCGTGTGYTTTCTAGG-3'	420
<i>cagE</i>	Cytotoxin-associated gene	95°C-5 min.; 35 ciclos de (95°C-30 seg.; 55°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-7 min. de extensão final.	F: 5'-TTGAAAACCTCAAGGATAGGATAGAGC-3' R: 5'-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC-3'	508
<i>cagL</i>	Cytotoxin-associated gene	95°C-5 min.; 35 ciclos de (95°C-30 seg.; 55°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-7 min. de extensão final.	F: 5'-CAC AAA ATG CCC CTA TCT TG-3' R: 5'-CTA CAA GCG TCT GTG AAG-3'	870
<i>cagT</i>	Cytotoxin-associated gene	95°C-5 min.; 35 ciclos de (95°C-30 seg.; 55°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-7 min. de extensão final.	F: 5'-GGG AGC TTA GTG CCA TAC AA-3' R: 5'-TCA TCT TTC ACG CAG AGC-3'	842
<i>cagX</i>	Cytotoxin-associated gene	95°C-5 min.; 35 ciclos de (95°C-30 seg.; 55°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-7 min. de extensão final.	F: 5'-CAATGGCGCCATCAGTCATGGTCAA-3' R: 5'-ACTTATCGTAGATGCGCCTGACC-3'	980
<i>cagY</i>	Cytotoxin-associated gene	95°C-5 min.; 35 ciclos de (95°C-30 seg.; 55°C-30 seg. e 72°C-1 min.), e 72°C-7 min. de extensão final.	F: 5'-CTT GCG GAT CGT TGC TAT CT-3' R: 5'-GAA ACA AGC CCT GTC AAA CAG G-3'	1041
	RAPD-PCR	04 ciclos de (94°C-5 min.; 6°C-5 min. e 72°C-5 min.), 30 ciclos de (94°C-1 min., 36°C-1 min. e 72°C-2min.), e 72°C-10 min. de extensão final.	Akopyanz <i>et al.</i> , 1992 1254 F: 5'- CCG CAG CCA A - 3' 1281 F: 5' - AAC GCG CAA C - 3'	-

¹ Todos os iniciadores para os genes da governança de *H. pylori* estão disponíveis no site <http://pubmlst.org/helicobacter/>

² pb, pares de bases

A isogenia foi também averiguada por RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) com os iniciadores 1281 e 1254 descritos por Akopyanz *et al.* (1992). Resumidamente, a PCR foi feita em um volume final de 25 μ L, contendo 20 ng de DNA bacteriano; tampão da Taq DNA polimerase a 1X (KCl 50 mM e Tris-HCl 20 mM, pH 8,4); 3 mM de $MgCl_2$; 250 μ M de cada um dos deoxinucleotídeos (Promega); 1 U de “Platinun Taq DNA polimerase” (Invitrogen) e 20 picomols dos iniciadores. Para avaliar a integridade da ilha de patogenicidade *cag* (PAI) foram feitas reações de PCR para os genes *cagE*, *cagL*, *cagT*, *cagX* e *cagY*. As condições de reação e os iniciadores estão descritos na Tabela 1. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e analisados em transiluminador de luz ultravioleta. Os padrões obtidos com cada um dos iniciadores foram idênticos para as três amostras isoladas. Ainda, foi sequenciada as regiões i/d do gene *vacA*, consideradas atualmente como as mais fidedignas para avaliar a produção da citotoxina vacuolizante (VacA) funcional.

Depois de confirmada a isogenia, foram feitos repiques em placas de Petri contendo BHM. As placas foram incubadas a 37°C, em microaerofilia (Anaerocult C®; Merck, Darmstadt, Alemanha), por dois dias e o conteúdo de cada placa de Petri (100 mm de diâmetro) foi retirado com um “swab”, transferido para tubos contendo caldo Brucella suplementado com 30% de glicerol e estocado em freezer a -80°C até o momento de uso. O tamanho do inóculo (MOI de 100 ou de 20) foi determinado por densidade óptica (DO) a 600 nm, Ultrospec® 2100 Pro (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) onde $DO = 1 = 1,0 \times 10^8$ bactérias/mL (Yeh *et al.*, 2010). A viabilidade bacteriana, morfologia e motilidade, foram confirmadas por microscopia de campo escuro.

3.3. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

Vinte mililitros de sangue periférico foram colhidos por sistema a vácuo em tubos com EDTA. Imediatamente depois da colheita, as células mononucleares foram separadas em gradiente Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A separação foi feita conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, o sangue colhido foi distribuído em dois tubos tipo falcon de 50 mL. A cada 10 mL de sangue foram adicionados 10 mL de PBS (Tampão Fosfato-salina, pH 7,4). Em seguida, a suspensão de células foi adicionada lentamente sobre 14 mL de Ficoll-Paque PLUS, e centrifugada a 400 g por 40 minutos a 20°C. Depois da centrifugação, a camada de células mononucleares foi retirada com o auxílio de uma pipeta e adicionada a um novo tubo tipo falcon contendo 10 mL de PBS. Essa nova suspensão de células foi centrifugada a 300 g por 20 minutos a 20°C, e o sobrenadante descartado. Depois da segunda lavagem com PBS, o “pellet” foi diluído em 1 mL de meio RPMI-1640 (Invitrogen) e a contagem do número de células mononucleares foi feita em câmara de Neubauer. A viabilidade das células mononucleares do sangue periférico foi confirmada, por microscopia, depois de coloração com azul de tripan. Em seguida, as células foram diluídas em meio RPMI-1640 para se obter uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células mononucleares por mL de meio para uso nos experimentos.

3.4. Estímulo das células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C

Cocultivos de amostras de *H. pylori* com as células mononucleares foram feitos na proporção de 20 bactérias para uma célula (MOI de 20) em placas de

poliestireno com 24 poços. Resumidamente, foi adicionado a 5 poços 1 mL de meio RPMI-1640 contendo $1,0 \times 10^6$ células mononucleares. Em seguida foram adicionadas amostras viáveis de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C a poços diferentes. Para avaliar o efeito apenas da presença do gene *cagA*, independentemente do número de sítios EPIYA C, foi usado uma amostra padrão *cagA*-negativa (Tx30A). Foram usadas, como controle negativo, células mononucleares mantidas em meio RPMI-1640. As placas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 6 horas para quantificação dos transcritos de mRNA, imunoprecipitação e por 24 e 48 horas para as dosagens de citocinas. Depois de cada período de incubação, o conteúdo dos poços foi transferido para tubos de 2 mL que foram centrifugados a 300 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi mantido em freezer a -80°C até o uso. Aos “pellets” dos cocultivos de 6 horas de incubação foram adicionadas solução estabilizadora e protetora de RNA (RNA later® solution – Ambion, Applied Biosystem) para análise dos transcritos e tampão de lise nos “pellets” para os ensaios de imunoprecipitação. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e estocados em um freezer -80°C até o uso.

O número de sítios EPIYA C da proteína CagA das amostras de *H. pylori* foi confirmado por PCR (Yamaoka *et al.*, 1998) depois de cada experimento.

3.4.1 Estímulo das células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* para estudo de vias de sinalização

Para o estudo das vias de sinalização, células mononucleares, obtidas por separação pelo gradiente de Ficoll-Paque PLUS (item 3.3), foram diluídas em 25 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de

estreptomicina (Sigma, São Paulo, Brasil). A suspensão de células foi mantida em garrafas de cultivo celular de 75 cm² (Sarstedt, Newton, EUA) em repouso “overnight” em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte, antes dos estímulos, a suspensão de células foi centrifugada a 300 g por 20 minutos a 20°C, e o sobrenadante descartado. Após a segunda lavagem com RPMI-1640 sem suplementos, o “pellet” foi diluído em 1 mL de meio RPMI-1640 e a contagem do número de células mononucleares foi feita em câmara de Neubauer.

Cocultivos de amostras de *H. pylori* com as células mononucleares foram feitos na proporção de 20 bactérias para uma célula (MOI de 20) em placas de poliestireno com 24 poços. Resumidamente, foi adicionado a 4 poços 1 mL de meio RPMI-1640 contendo $1,0 \times 10^6$ células mononucleares. Em seguida foram adicionadas amostras viáveis de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C a poços diferentes. Foram usadas, como controle negativo, células mononucleares mantidas em meio RPMI-1640. As placas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. Depois de cada período de incubação, as células foram transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a 300 g por 15 minutos a 4°C, quando, então, o sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 250 µL de tampão de lise (25 mM Tris [2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol], pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 5 mM pirofosfato de sódio; 1 mM ortovanato de sódio; 10 mM fluoreto de sódio; 10% glicerol; 1 mM PMSF [fluoreto de fenilmetilsulfonilo]; 25 µg/mL leupeptina; 25 µg/mL aprotinina; 2 µg/mL pepstatina) ao “pellet” formado para dosagem de proteínas totais. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e estocados em um freezer -80°C até o uso.

As concentrações de proteínas totais foram determinadas em triplicata pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Resumidamente, 180 μL do reagente de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foram adicionados a 20 μL das amostras. A leitura de absorvância foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm (Victor X4, Perkin Elmer, CA, EUA). A concentração da proteína total foi determinada comparando-se o resultado com os de uma curva padrão construídos com valores de concentração de soroalbumina bovina (BSA) de 0,2 $\text{g}/\mu\text{L}$ a 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.5. Avaliação das vias de sinalização por “Western blot”

Para as reações de “Western blot” foram usados volumes contendo 30 μg de proteína total, adicionados ao tampão de corrida (NUPAGE[®] LDS pH 8,4/Invitrogen) e submetidos à desnaturação durante 10 minutos a 70°C. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (gradiente de 4-12%) (NuPAGE[®] Bis-Tris Gel/Invitrogen) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen), que foi lavada com TBS (Tampão Tris-salina, pH 7,2) por 5 minutos sob agitação seguida de bloqueio com 25 mL do tampão de bloqueio (TBS, Tween-20 a 0,05% e leite em pó a 3% p/v) por 1 hora. Depois do bloqueio, as membranas foram lavadas duas vezes, por 5 minutos, com 15 mL do tampão de diluição do anticorpo (TBS, Tween-20 a 0,05% e BSA a 4%). Em seguida foram mantidas em geladeira “overnight” sob agitação com os respectivos anticorpos primários fosforilado e não fosforilado “anti-NF-kB p65”, “anti-p38 MAPK”, “anti-p44/42 MAPK ERK1/2” e “anti-STAT3” (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) na diluição de 1:1000. As membranas foram, então, lavadas quatro vezes por 5 minutos

com 15 mL do tampão TBS-T (TBS, Tween-20 a 0,05%) e incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com o anticorpo secundário (“ECL Rabbit IgG, HRP -linked” – GE Healthcare/Amersham Biosciences) diluído em tampão de bloqueio na proporção de 1:2000. Para detecção das proteínas, as membranas foram lavadas com TBS-T uma vez por 15 minutos, seguida de três lavagens com TBS-T por 5 minutos e finalmente duas lavagens por 2 minutos com TBS. A revelação foi feita com solução reveladora Immobilon™ Western-Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, EUA) e a leitura foi feita em um sistema de foto documentação (ImageQuant 350, GE Healthcare).

3.6. Avaliação da presença da proteína CagA fosforilada no citoplasma das células por imunoprecipitação

Para as reações de imunoprecipitação foram usados volumes contendo 1000 µg de proteína total. A cada um dos tubos com 1000 µg de proteína total foram adicionados 4 µg do anticorpo Anti-CagA (A-10, Santa Cruz Biotechnology), homogeneizados e incubados “overnight” sob agitação a 4°C. No dia seguinte 30 µL de sefarose com a proteína G (Life Technologies) lavadas previamente por 4 vezes com 1 mL de PBS estéril (5 minutos a 5000 rpm) foram adicionados a cada um dos tubos com os imunocomplexos. Depois de homogeneizados, a suspensão de sefarose foi incubada, sob agitação, por 4 horas a 4°C e lavada por centrifugação 2 vezes com 1 mL de PBS e tampão de lise e uma vez com PBS. Foram acrescentados, então, 100 µL de tampão de corrida aos “pellets”, incubados a 95°C por 5 minutos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (NuPAGE® Bis-Tris Gel/Invitrogen, gradiente de 4-12%). A presença dos sítios EPIYA C da proteína CagA fosforilados no citoplasma das células foi avaliada por “imunoblot”, nas

condições descritas anteriormente, usando o anticorpo secundário p-Tyr (pY-99, Santa Cruz Biotechnology).

3.7. Obtenção das células epiteliais gástricas (AGS) e THP-1

Células AGS (ATCC CRL-1739; Rockville, MD, EUA) e THP-1 (monócitos de leucemia monocítica aguda - ATCC TIB-202; Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em garrafas de poliestireno contendo 20 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma). As garrafas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, até as células ficarem confluentes, quando as células AGS foram lavadas com PBS e tratadas com 3 mL de tripsina/EDTA a 0,25% (Invitrogen). Em seguida as células AGS e THP-1 foram transferidas para um tubo tipo falcon e lavadas duas vezes com PBS. Depois da segunda lavagem em PBS os “pellets” foram diluídos em 1 mL de meio RPMI-1640. A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer, e obteve-se uma concentração de 2,0 x 10⁵ células AGS por 5 mL de meio RPMI-1640 e 1,0 x 10⁶ células THP-1 por 1 mL de meio RPMI-1640.

3.8. Estímulo das células AGS e THP-1 com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C

Cocultivos de amostras de *H. pylori* e células AGS foram feitos na proporção de 100 bactérias para uma célula AGS (MOI de 100), em placas de poliestireno com 6 poços. Resumidamente, foram adicionados a cada um dos poços 5 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2,0 x 10⁵ células AGS. As

placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, até atingirem confluência de 80 a 90%, quando foram lavadas com PBS e reincubadas “overnight” em 4 mL de meio RPMI-1640 sem suplementos. No dia seguinte foram adicionadas as amostras viáveis de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C a poços diferentes. Cocultivos de amostras de *H. pylori* com as células THP-1 foram feitos na proporção de 20 bactérias para uma célula (MOI de 20) em placas de poliestireno com 24 poços. Resumidamente, foi adicionado a 4 poços 1 mL de meio RPMI-1640 contendo 1,0 x 10⁶ células THP-1. Em seguida foram adicionadas as amostras viáveis de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C a poços diferentes. Foram usadas como controle negativo células AGS e células THP-1 mantidas em meio RPMI-1640 sem suplementos.

As condições e tempos de incubação foram feitas como descritos nos itens 3.4 e 3.4.1.

3.8.1. Estímulo das células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* para estudo de vias de sinalização, imunoprecipitação e observação do fenótipo “Beija-flor”

Cocultivos de amostras de *H. pylori* e células AGS foram feitos como descrito no item 3.8. Foram usados também como controle negativo células AGS estimuladas com amostra *cagA*-negativa (Tx30A).

As condições e tempos de incubação, determinação da concentração de proteínas totais foram feitas como descrito no item 3.4.1. As reações de “Western blot” foram feitas como descrito no item 3.5. e reações de imunoprecipitação como descrito no item 3.6.

Para a observação do fenótipo “Beija-flor” as placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, quando então foram foto documentadas.

3.8.2. Estímulo das células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* para imunoprecipitação e observação do fenômeno de agregação celular

Cocultivos de amostras de *H. pylori* com três sítios de fosforilação EPIYA C e células mononucleares foram feitos como descrito nos itens 3.4. Foram usados também como controle negativo células THP-1 estimuladas com amostra *cagA*-negativa (Tx30A).

As condições e tempos de incubação, determinação da concentração de proteínas totais foram feitas como descrito no item 3.4.1. As reações de imunoprecipitação foram feitas como descrito no item 3.6.

Para a observação do fenômeno de agregação celular as placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por até 24 horas, quando então foram foto documentadas nos tempos de uma, doze e 24 horas.

3.9. Estímulo das células mononucleares e AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* na presença de inibidores específicos

Foram adicionadas a cada um dos poços 1,0 x 10⁶ células mononucleares ou AGS, diluídas em meio de cultura RPMI-1640 e em seguida foram adicionados os inibidores específicos das vias de sinalização p38 MAPK, 10 µM de SB203580 (Invitrogen); MAPK/ERK1/2, 50 µM de PD98059 (Invitrogen); NF-κB, 10 µM de Bay11-7082, (Biomol-Plymouth Meeting, PA, EUA); STAT3, 50 µM de 5,15-DPP;

Src, 10 μ M de PP2; SHP1/2, 50 μ M de NSC-87877 (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) todos diluídos em DMSO, exceto o inibidor NSC-87877 que foi diluído em água. Cada uma das placas, então, foi incubada em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por uma hora (exceto no caso do STAT3, cuja placa ficou incubada por 24 horas) antes de receber os estímulos.

Depois da incubação com os inibidores, foram adicionadas amostras viáveis de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C ao respectivo poço. Foram usadas, como controles, células mononucleares ou AGS mantidas em meio RPMI-1640 e mantidas em meio RPMI-1640 com DMSO. As placas foram então incubadas novamente em câmara úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 4 e 6 horas para “Western blot”, por 6 horas para quantificação dos transcritos de mRNA e por 48 horas para dosagem de citocinas. O conteúdo de cada um dos poços foi transferido para tubos de 2,0 mL e centrifugados a 300 g por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes de 48 horas foram recolhidos em alíquotas e mantidos em freezer -80°C para dosagem de citocinas, aos “pellets” de 4 e 6 horas foram adicionados 200 μ L de tampão de lise para “Western blot” e aos “pellets” de 6 horas foi adicionado solução estabilizadora e protetora de RNA para quantificação dos transcritos de mRNA. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e estocados em freezer a -80°C até o uso.

3.10. Determinação da concentração de citocinas nos cocultivos de *H. pylori* nas células mononucleares e AGS

As concentrações das citocinas representativas da resposta Th17 (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23 e TGF- β), bem como de IL-8 e IL-11 foram determinadas em triplicata nos sobrenadantes dos cocultivos dos itens 3.4, 3.7 e 3.8 por método

imunoenzimático (BioSource, Camarillo, CA, EUA) que usa anticorpos específicos para as referidas citocinas humanas. As reações foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e as concentrações das citocinas foram expressas em pg/mL. Todos os valores abaixo dos limites esperados (ponto de corte) foram considerados como zero.

3.11. Quantificação relativa dos transcritos de mRNA por PCR em tempo real

Para a quantificação relativa dos transcritos de mRNA das citocinas em estudo, foram usados os “pellets” dos cocultivos de *H. pylori* com um e três sítios EPIYA C com células mononucleares do sangue periférico incubadas por 6 horas (itens 3.4) mantidos em solução estabilizadora e protetora de RNA em um freezer a -80°C.

O RNA total das células foi extraído com o RNeasy MiniKit – Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total usando o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi produzido usando 5 a 20 ng de RNA total com as seguintes condições de termociclagem: 25°C – 10 minutos para anelamento dos iniciadores; 37°C – 120 minutos para extensão pela enzima transcriptase reversa; 85°C – 4 minutos para inativação da enzima.

Para amplificação dos transcritos de mRNA das citocinas foram utilizados os ensaios específicos (Tabela 2) e reagentes TaqMan® Master Mix (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante. As condições de reação da

PCR foram: 95°C por 10 minutos; seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C e 90 segundos a 60°C.

A quantificação relativa dos transcritos de mRNA das citocinas foi feita por PCR em tempo real usando o equipamento Real Time PCR 7500 System (Applied Biosystem) por meio da comparação entre o número de cópias dos transcritos alvo e o número de cópias dos transcritos de GAPDH (*gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*) cujo gene possui expressão constitutiva, sendo, deste modo, usado como controle endógeno da reação. Células mononucleares não estimuladas por amostras de *H. pylori* foram usadas como controle.

Tabela 2 – Ensaio para a amplificação dos transcritos de mRNA das citocinas

Citocinas	Ensaio*
IL-1 β	hs01555410_m1
IL-6	hs00985639_m1
IL-8	hs00174103_m1
IL-11	hs00174148_m1
IL-17A	hs99999082_m1
IL-23	hs00372324_m1
TGF- β	hs00998133_m1

*Números de controle da Applied Biosystem.

Os valores de expressão relativa dos transcritos de mRNA das citocinas foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ – Relative Quantification) calculado automaticamente pelo programa 7500 v2.0.5 do equipamento Real Time PCR 7500 System (Applied Biosystem).

3.12. Análise Estatística

Os dados foram analisados com o programa estatístico SPSS “*Statistical Package for the Social Sciences*”, versão 17.0 (SPSS IN., Chicago, IL, EUA).

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para avaliar a normalidade dos dados. Os valores obtidos que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmos. Os dados que estavam na curva de normalidade foram apresentados como média \pm desvio padrão; caso contrário, como mediana com valor mínimo e máximo.

A comparação dos níveis de citocinas, de acordo com os sítios EPIYA C, foi feito pelo teste “t” de Student e ANOVA quando os dados estavam na normalidade ou pelo teste bicaudal de Mann-whitney, quando não apresentaram distribuição normal.

Diferenças entre os períodos de incubação foram também avaliados pelo teste bicaudal de Mann-whitney.

Correlações entre os níveis das diferentes citocinas foram avaliadas pela Correlação de Pearson.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4.1. Obtenção das amostras isogênicas de *H. pylori*

Foram usadas nesse estudo as cepas LPB-14, LPB-2 e LPB-6 com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C, respectivamente (Figura 4).

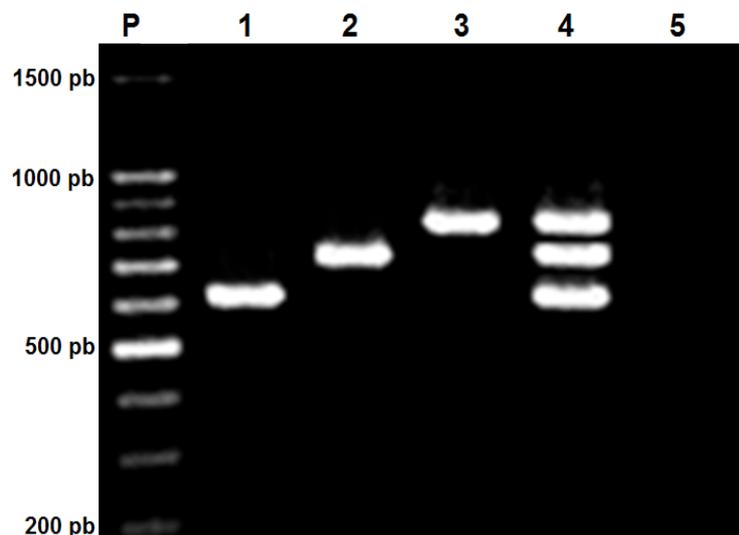


Figura 4 - Gel de agarose dos produtos amplificados da região variável 3' do gene *cagA* das amostras isogênicas de *H. pylori*: canaleta 1, colônia LPB-14 com perfil de EPIYA ABC (banda de 640 pb); canaleta 2, colônia LPB-2 com perfil de EPIYA ABCC (banda de 760 pb); canaleta 3, colônia LPB-6 com perfil de EPIYA ABCCC (banda de 850 pb); canaleta 4, amostra LPB original com perfil de EPIYA ABC + ABCC + ABCCC (bandas de 640, 760 e 850 pb) de onde foram obtidas as colônias isoladas; canaleta 5 controle negativo interno da reação (água destilada); canaleta P, padrão de tamanho molecular (100 pb, Promega, Madison WI, USA). Os perfis ABC, ABCC e ABCCC das colônias isoladas foram todos confirmados por sequenciamento.

4.2. Identificação das amostras isogênicas por sequenciamento de genes da governança e por RAPD-PCR.

A isogenia foi confirmada por sequenciamento de cinco genes da governança demonstrando 100% de identidade como mostram as Figuras 5A - 5E.

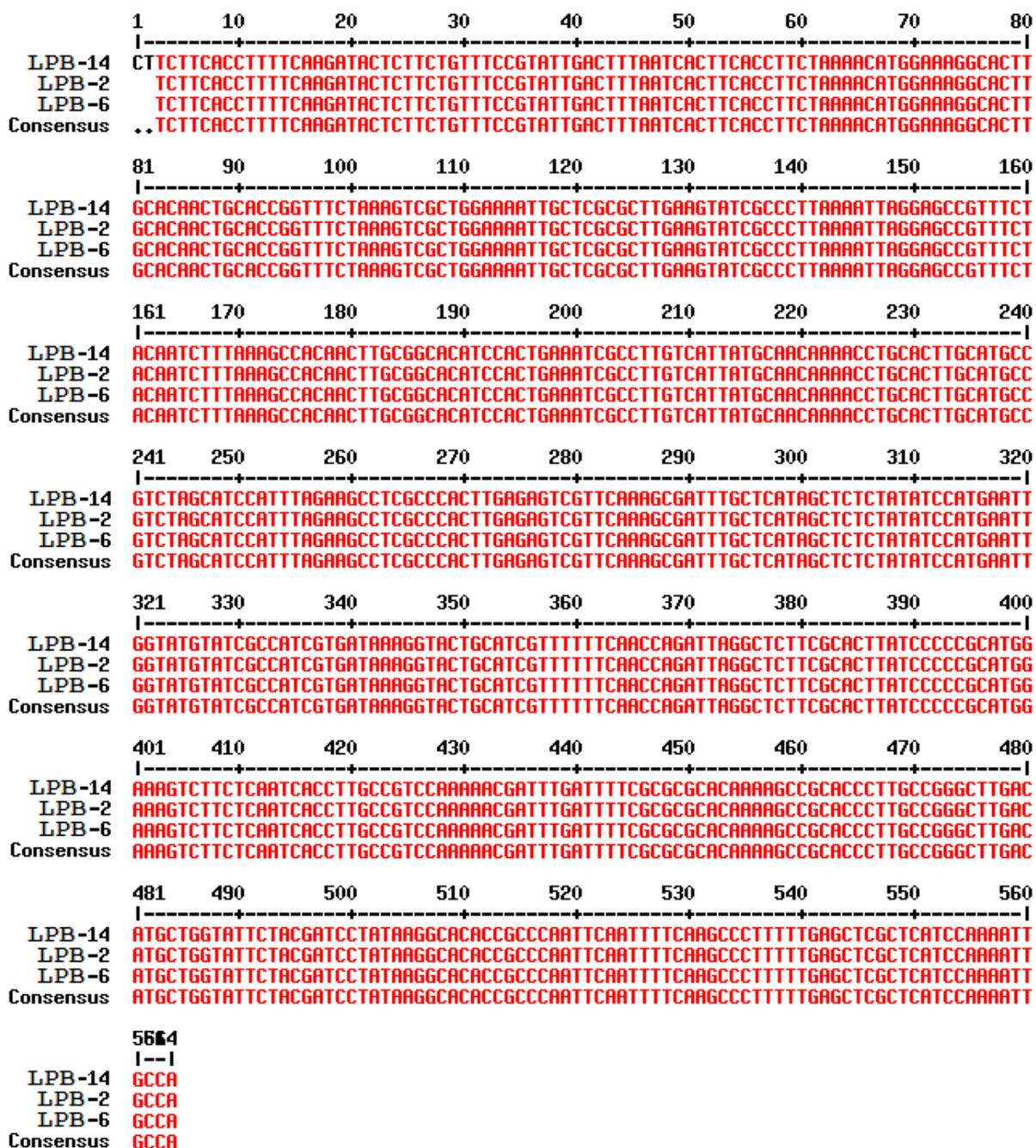


Figura 5A - Alinhamento das seqüências de ácidos nucléicos da região *efp* das amostras isogênicas de *H. pylori*.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	ATGATGCCTACTTGAAATGATTTCTTCTTTAGTTTCTTCTAAGCGTTATTAGGGGTTCTAAGCTTTCTAAATATC								
LPB-2	ATGATGCCTACTTGAAATGATTTCTTCTTTAGTTTCTTCTAAGCGTTATTAGGGGTTCTAAGCTTTCTAAATATC								
LPB-6	ATGATGCCTACTTGAAATGATTTCTTCTTTAGTTTCTTCTAAGCGTTATTAGGGGTTCTAAGCTTTCTAAATATC								
Consensus	ATGATGCCTACTTGAAATGATTTCTTCTTTAGTTTCTTCTAAGCGTTATTAGGGGTTCTAAGCTTTCTAAATATC								
	81	90	100	110	120	130	140	150	160
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	CGCATCCAATCTTGCTCTATGATTTGGTTTAAATTCATGCGTTCAATACCGCATCAATTAATGCACTAATGCCCTAT								
LPB-2	CGCATCCAATCTTGCTCTATGATTTGGTTTAAATTCATGCGTTCAATACCGCATCAATTAATGCACTAATGCCCTAT								
LPB-6	CGCATCCAATCTTGCTCTATGATTTGGTTTAAATTCATGCGTTCAATACCGCATCAATTAATGCACTAATGCCCTAT								
Consensus	CGCATCCAATCTTGCTCTATGATTTGGTTTAAATTCATGCGTTCAATACCGCATCAATTAATGCACTAATGCCCTAT								
	161	170	180	190	200	210	220	230	240
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	TGTGCGAAGCGGAATATTAAGCTCTTAGGATGCCAAGAGAAACGCATAGCTCGCTCTTTTCTTTGTCGTTA								
LPB-2	TGTGCGAAGCGGAATATTAAGCTCTTAGGATGCCAAGAGAAACGCATAGCTCGCTCTTTTCTTTGTCGTTA								
LPB-6	TGTGCGAAGCGGAATATTAAGCTCTTAGGATGCCAAGAGAAACGCATAGCTCGCTCTTTTCTTTGTCGTTA								
Consensus	TGTGCGAAGCGGAATATTAAGCTCTTAGGATGCCAAGAGAAACGCATAGCTCGCTCTTTTCTTTGTCGTTA								
	241	250	260	270	280	290	300	310	320
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	TCATCTTATTGATCACTAAAAGCAGTTAGGGTGGATCTTAAATCTCTTAAAAGCTTGATGTCTTCATCGCTAGG								
LPB-2	TCATCTTATTGATCACTAAAAGCAGTTAGGGTGGATCTTAAATCTCTTAAAAGCTTGATGTCTTCATCGCTAGG								
LPB-6	TCATCTTATTGATCACTAAAAGCAGTTAGGGTGGATCTTAAATCTCTTAAAAGCTTGATGTCTTCATCGCTAGG								
Consensus	TCATCTTATTGATCACTAAAAGCAGTTAGGGTGGATCTTAAATCTCTTAAAAGCTTGATGTCTTCATCGCTAGG								
	321	330	340	350	360	370	380	390	400
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	GATAGACTTGCCATCCACACGATATAAATCAATCGCTCATTTGAGCGGCTTTTAAATTAAGGGCTTTGATTTCTTTAG								
LPB-2	GATAGACTTGCCATCCACACGATATAAATCAATCGCTCATTTGAGCGGCTTTTAAATTAAGGGCTTTGATTTCTTTAG								
LPB-6	GATAGACTTGCCATCCACACGATATAAATCAATCGCTCATTTGAGCGGCTTTTAAATTAAGGGCTTTGATTTCTTTAG								
Consensus	GATAGACTTGCCATCCACACGATATAAATCAATCGCTCATTTGAGCGGCTTTTAAATTAAGGGCTTTGATTTCTTTAG								
	401	410	420	430	440	450	460	470	480
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	ACAAAAGAGCGCTTTAGCCATGCCCTGTATCTAATAGCTCCACTTCATGGCCGTTCAATGCGATTTTTCGTTTGTTA								
LPB-2	ACAAAAGAGCGCTTTAGCCATGCCCTGTATCTAATAGCTCCACTTCATGGCCGTTCAATGCGATTTTTCGTTTGTTA								
LPB-6	ACAAAAGAGCGCTTTAGCCATGCCCTGTATCTAATAGCTCCACTTCATGGCCGTTCAATGCGATTTTTCGTTTGTTA								
Consensus	ACAAAAGAGCGCTTTAGCCATGCCCTGTATCTAATAGCTCCACTTCATGGCCGTTCAATGCGATTTTTCGTTTGTTA								
	481	490	500	510	520	530	540	550	560
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	ATATCTCGTGGTGCCTGCAAAATCTGAAGTGATAGCGATCCTTTCTTAGCCAGGCGGTTAAATAGTGAGCTTTTCCC								
LPB-2	ATATCTCGTGGTGCCTGCAAAATCTGAAGTGATAGCGATCCTTTCTTAGCCAGGCGGTTAAATAGTGAGCTTTTCCC								
LPB-6	ATATCTCGTGGTGCCTGCAAAATCTGAAGTGATAGCGATCCTTTCTTAGCCAGGCGGTTAAATAGTGAGCTTTTCCC								
Consensus	ATATCTCGTGGTGCCTGCAAAATCTGAAGTGATAGCGATCCTTTCTTAGCCAGGCGGTTAAATAGTGAGCTTTTCCC								
	561	570	580	590	600	610	620	630	640
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	CACATTAGGCTGGCTAAAATCGCATGGTTTTAAAGTTTTATGGCTTGATTCATCTTTTTATCGCTTCATTTAAT								
LPB-2	CACATTAGGCTGGCTAAAATCGCATGGTTTTAAAGTTTTATGGCTTGATTCATCTTTTTATCGCTTCATTTAAT								
LPB-6	CACATTAGGCTGGCTAAAATCGCATGGTTTTAAAGTTTTATGGCTTGATTCATCTTTTTATCGCTTCATTTAAT								
Consensus	CACATTAGGCTGGCTAAAATCGCATGGTTTTAAAGTTTTATGGCTTGATTCATCTTTTTATCGCTTCATTTAAT								
	641	650	660	670	680	690	700	710	720
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	CAAAATTAGATTACATATTATAGTTATTTAAGCTTAAATAGGGCTAGCATTGTTTTAGTCAAAAAAAAAAGGGGG								
LPB-2	CAAAATTAGATTACATATTATAGTTATTTAAGCTTAAATAGGGCTAGCATTGTTTTAGTCAAAAAAAAAAGGGGG								
LPB-6	CAAAATTAGATTACATATTATAGTTATTTAAGCTTAAATAGGGCTAGCATTGTTTTAGTCAAAAAAAAAAGGGGG								
Consensus	CAAAATTAGATTACATATTATAGTTATTTAAGCTTAAATAGGGCTAGCATTGTTTTAGTCAAAAAAAAAAGGGGG								
	724								

LPB-14	GGGG								
LPB-2	GGGG								
LPB-6	GGGG								
Consensus	GGGG								

Figura 5B - Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região *ypc* das amostras isogênicas de *H. pylori*.

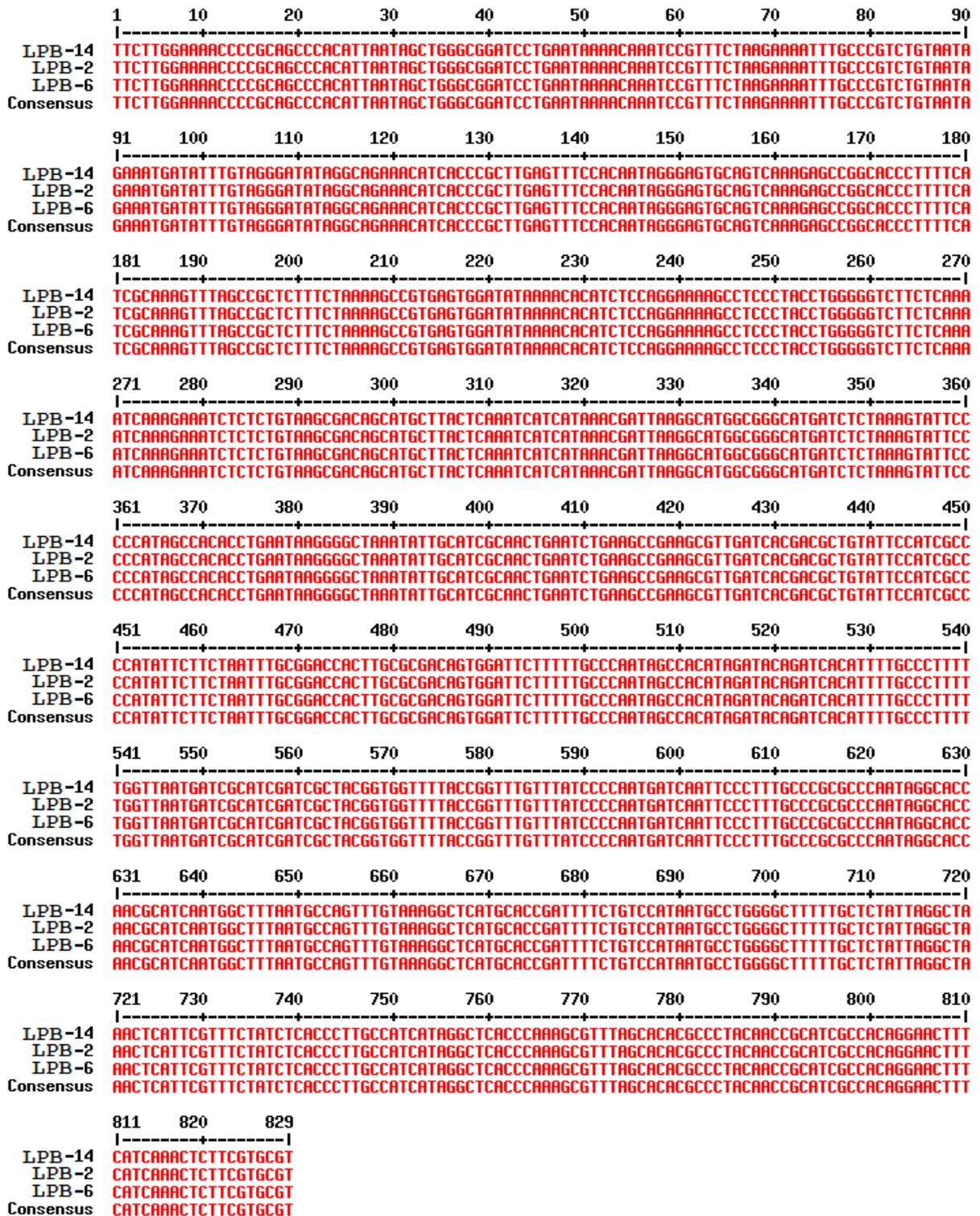


Figura 5C - Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região *atpA* das amostras isogênicas de *H. pylori*.

```

1      10      20      30      40      50      60      70  75
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  A G G T G C G T T T G T T G T A A A A A T T T T G T T T T G G A G G G A T A G G C A A T G C T A G G A C T T G T A T T G T T A T A T G T T G G G A T
LPB -2   A G G T G C G T T T G T T G T A A A A A T T T T G T T T T G G A G G G A T A G G C A A T G C T A G G A C T T G T A T T G T T A T A T G T T G G G A T
LPB -6   A G G T G C G T T T G T T G T A A A A A T T T T G T T T T G G A G G G A T A G G C A A T G C T A G G A C T T G T A T T G T T A T A T G T T G G G A T
Consensus A G G T G C G T T T G T T G T A A A A A T T T T G T T T T G G A G G G A T A G G C A A T G C T A G G A C T T G T A T T G T T A T A T G T T G G G A T

76     85     95     105    115    125    135    145  150
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  T G T T T A A T C A G C A A T G G G A T T T G C G G A T T A C C A A A G T C G A T C C T A A A A G C A C T G C G G T G A T G A C T T T T T T G T
LPB -2   T G T T T A A T C A G C A A T G G G A T T T G C G G A T T A C C A A A G T C G A T C C T A A A A G C A C T G C G G T G A T G A C T T T T T T G T
LPB -6   T G T T T A A T C A G C A A T G G G A T T T G C G G A T T A C C A A A G T C G A T C C T A A A A G C A C T G C G G T G A T G A C T T T T T T G T
Consensus T G T T T A A T C A G C A A T G G G A T T T G C G G A T T A C C A A A G T C G A T C C T A A A A G C A C T G C G G T G A T G A C T T T T T T G T

151    160    170    180    190    200    210    220  225
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  G G G T G G G C T C C A T T A T T T G T A A T A T A G T T G T A A T C A C T T A C T C C G C G C T C C A C C C T A C A G C C C C T G T A G A A G G
LPB -2   G G G T G G G C T C C A T T A T T T G T A A T A T A G T T G T A A T C A C T T A C T C C G C G C T C C A C C C T A C A G C C C C T G T A G A A G G
LPB -6   G G G T G G G C T C C A T T A T T T G T A A T A T A G T T G T A A T C A C T T A C T C C G C G C T C C A C C C T A C A G C C C C T G T A G A A G G
Consensus G G G T G G G C T C C A T T A T T T G T A A T A T A G T T G T A A T C A C T T A C T C C G C G C T C C A C C C T A C A G C C C C T G T A G A A G G

226    235    245    255    265    275    285    295  300
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  T G C A G A A G A T A T T G T T C A A G T A T C A C A C C A T T T G A C T A G T T T C T A T G G G C C A G C G A C T G G G T A T T G T T T G G T T
LPB -2   T G C A G A A G A T A T T G T T C A A G T A T C A C A C C A T T T G A C T A G T T T C T A T G G G C C A G C G A C T G G G T A T T G T T T G G T T
LPB -6   T G C A G A A G A T A T T G T T C A A G T A T C A C A C C A T T T G A C T A G T T T C T A T G G G C C A G C G A C T G G G T A T T G T T T G G T T
Consensus T G C A G A A G A T A T T G T T C A A G T A T C A C A C C A T T T G A C T A G T T T C T A T G G G C C A G C G A C T G G G T A T T G T T T G G T T

301    310    320    330    340    350    360    370  375
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  T A C T A C T T G T A T G C G G C T A T C A C C A C A C T T T T G G T T T G G A T T G G A G G C C T A T T C T T G G T A T A G C T T A T T C G T
LPB -2   T A C T A C T T G T A T G C G G C T A T C A C C A C A C T T T T G G T T T G G A T T G G A G G C C T A T T C T T G G T A T A G C T T A T T C G T
LPB -6   T A C T A C T T G T A T G C G G C T A T C A C C A C A C T T T T G G T T T G G A T T G G A G G C C T A T T C T T G G T A T A G C T T A T T C G T
Consensus T A C T A C T T G T A T G C G G C T A T C A C C A C A C T T T T G G T T T G G A T T G G A G G C C T A T T C T T G G T A T A G C T T A T T C G T

376    385    395    405    415    425    435    445  450
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  A G C G A T C A A C A C T G T T C C T G C T G C G A T T T A T C C C A C T A T A G C G A T A T G C T T G A T G A C C A C A A A G T G T T A G G C A T
LPB -2   A G C G A T C A A C A C T G T T C C T G C T G C G A T T T A T C C C A C T A T A G C G A T A T G C T T G A T G A C C A C A A A G T G T T A G G C A T
LPB -6   A G C G A T C A A C A C T G T T C C T G C T G C G A T T T A T C C C A C T A T A G C G A T A T G C T T G A T G A C C A C A A A G T G T T A G G C A T
Consensus A G C G A T C A A C A C T G T T C C T G C T G C G A T T T A T C C C A C T A T A G C G A T A T G C T T G A T G A C C A C A A A G T G T T A G G C A T

451    460    470    480    490    500    510    520  525
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  C A C T G A A G G C G A T T G G T G G G C G A T C A T A T G G T T G G C T T G G G G T G T T T T G T G G C T T A C C G C T T T C A T T G A A A A C A T
LPB -2   C A C T G A A G G C G A T T G G T G G G C G A T C A T A T G G T T G G C T T G G G G T G T T T T G T G G C T T A C C G C T T T C A T T G A A A A C A T
LPB -6   C A C T G A A G G C G A T T G G T G G G C G A T C A T A T G G T T G G C T T G G G G T G T T T T G T G G C T T A C C G C T T T C A T T G A A A A C A T
Consensus C A C T G A A G G C G A T T G G T G G G C G A T C A T A T G G T T G G C T T G G G G T G T T T T G T G G C T T A C C G C T T T C A T T G A A A A C A T

526    535    545    555    565    575    585    595  600
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  C T T G A A A A T C C C T T T A G G G A A A T T C A C T C C A T G C C T T G C T A T C A T T G A G G G T A T T T T A A C C G C T T G G A T C C C T G C
LPB -2   C T T G A A A A T C C C T T T A G G G A A A T T C A C T C C A T G C C T T G C T A T C A T T G A G G G T A T T T T A A C C G C T T G G A T C C C T G C
LPB -6   C T T G A A A A T C C C T T T A G G G A A A T T C A C T C C A T G C C T T G C T A T C A T T G A G G G T A T T T T A A C C G C T T G G A T C C C T G C
Consensus C T T G A A A A T C C C T T T A G G G A A A T T C A C T C C A T G C C T T G C T A T C A T T G A G G G T A T T T T A A C C G C T T G G A T C C C T G C

601    610    620    630    640    650    660    670
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
LPB -14  T T G G T T A C T C T T T A T C C A C A C A C T G G G T G T G A G A T G A T C A T A G A G C G T T A G T T G G C A A T C T A A G G A A A T T
LPB -2   T T G G T T A C T C T T T A T C C A C A C A C T G G G T G T G A G A T G A T C A T A G A G C G T T A G T T G G C A A T C T A A G G A A A T T
LPB -6   T T G G T T A C T C T T T A T C C A C A C A C T G G G T G T G A G A T G A T C A T A G A G C G T T A G T T G G C A A T C T A A G G A A A T T
Consensus T T G G T T A C T C T T T A T C C A C A C A C T G G G T G T G A G A T G A T C A T A G A G C G T T A G T T G G C A A T C T A A G G A A A T T

```

Figura 5D - Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região *ureI* das amostras isogênicas de *H. pylori*.

	1	10	20	30	40	50	60	70	75
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	AAGGGGGGGTTTTTCTAGGTGGTTTTTACCTAACCAATAAGGATTGAAGGGCAATCGCGCATTGGGTTTAGG								
LPB-2	AAGGGGGGGTTTTTCTAGGTGGTTTTTACCTAACCAATAAGGATTGAAGGGCAATCGCGCATTGGGTTTAGG								
LPB-6	AAGGGGGGGTTTTTCTAGGTGGTTTTTACCTAACCAATAAGGATTGAAGGGCAATCGCGCATTGGGTTTAGG								
Consensus	AAGGGGGGGTTTTTCTAGGTGGTTTTTACCTAACCAATAAGGATTGAAGGGCAATCGCGCATTGGGTTTAGG								
	76	85	95	105	115	125	135	145	150
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	GGAGCAGATTAAAGCCCCTAGATCAATTAGGGCTTGGTTATGATTAAAGCTTTCATTAGATTGAGAAAGTCATT								
LPB-2	GGAGCAGATTAAAGCCCCTAGATCAATTAGGGCTTGGTTATGATTAAAGCTTTCATTAGATTGAGAAAGTCATT								
LPB-6	GGAGCAGATTAAAGCCCCTAGATCAATTAGGGCTTGGTTATGATTAAAGCTTTCATTAGATTGAGAAAGTCATT								
Consensus	GGAGCAGATTAAAGCCCCTAGATCAATTAGGGCTTGGTTATGATTAAAGCTTTCATTAGATTGAGAAAGTCATT								
	151	160	170	180	190	200	210	220	225
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	CGCTTAAATTTGTAAGTCTTTAGCTTGATATTAGGATCTAACCAAAAAGCCTTAAAGCACGCGCTTGATATT								
LPB-2	CGCTTAAATTTGTAAGTCTTTAGCTTGATATTAGGATCTAACCAAAAAGCCTTAAAGCACGCGCTTGATATT								
LPB-6	CGCTTAAATTTGTAAGTCTTTAGCTTGATATTAGGATCTAACCAAAAAGCCTTAAAGCACGCGCTTGATATT								
Consensus	CGCTTAAATTTGTAAGTCTTTAGCTTGATATTAGGATCTAACCAAAAAGCCTTAAAGCACGCGCTTGATATT								
	226	235	245	255	265	275	285	295	300
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	AGCGTCCACGCATGCGCTCTTTCTCTAAGCCAAACACACAGATCGCATTAGCCGTGTATGCGCCARTCCCTGG								
LPB-2	AGCGTCCACGCATGCGCTCTTTCTCTAAGCCAAACACACAGATCGCATTAGCCGTGTATGCGCCARTCCCTGG								
LPB-6	AGCGTCCACGCATGCGCTCTTTCTCTAAGCCAAACACACAGATCGCATTAGCCGTGTATGCGCCARTCCCTGG								
Consensus	AGCGTCCACGCATGCGCTCTTTCTCTAAGCCAAACACACAGATCGCATTAGCCGTGTATGCGCCARTCCCTGG								
	301	310	320	330	340	350	360	370	375
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	GAGTTTCATAGGCTTTGATAGTCATTAGGTAATTGTGAGTTATGTTCTTTAACGCAATTTACGCGCTTTTTTT								
LPB-2	GAGTTTCATAGGCTTTGATAGTCATTAGGTAATTGTGAGTTATGTTCTTTAACGCAATTTACGCGCTTTTTTT								
LPB-6	GAGTTTCATAGGCTTTGATAGTCATTAGGTAATTGTGAGTTATGTTCTTTAACGCAATTTACGCGCTTTTTTT								
Consensus	GAGTTTCATAGGCTTTGATAGTCATTAGGTAATTGTGAGTTATGTTCTTTAACGCAATTTACGCGCTTTTTTT								
	376	385	395	405	415	425	435	445	450
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	TAAATTTTTAGCCCTTGAATAATAACCAAGCCCTCCAGAGCARTAAACCTCCTCTAATTGAGCGTTCGCTAA								
LPB-2	TAAATTTTTAGCCCTTGAATAATAACCAAGCCCTCCAGAGCARTAAACCTCCTCTAATTGAGCGTTCGCTAA								
LPB-6	TAAATTTTTAGCCCTTGAATAATAACCAAGCCCTCCAGAGCARTAAACCTCCTCTAATTGAGCGTTCGCTAA								
Consensus	TAAATTTTTAGCCCTTGAATAATAACCAAGCCCTCCAGAGCARTAAACCTCCTCTAATTGAGCGTTCGCTAA								
	451	460	470	480	490	500	510	520	525
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	GTCTTTTAAAGTGGGGAAAGCTTCTAAAAAGGGGAATAAAACGCTCAACCACCGTGTGATTTGGGTTTGTG								
LPB-2	GTCTTTTAAAGTGGGGAAAGCTTCTAAAAAGGGGAATAAAACGCTCAACCACCGTGTGATTTGGGTTTGTG								
LPB-6	GTCTTTTAAAGTGGGGAAAGCTTCTAAAAAGGGGAATAAAACGCTCAACCACCGTGTGATTTGGGTTTGTG								
Consensus	GTCTTTTAAAGTGGGGAAAGCTTCTAAAAAGGGGAATAAAACGCTCAACCACCGTGTGATTTGGGTTTGTG								
	526	535	545	555	565	575	585	595	600
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	GCTCATCACTTCGCTGATATAGACTTCATAAGGAGCGTTAATGCCCTTAAATTCCCTAAGGGTAATCCTTTCCG								
LPB-2	GCTCATCACTTCGCTGATATAGACTTCATAAGGAGCGTTAATGCCCTTAAATTCCCTAAGGGTAATCCTTTCCG								
LPB-6	GCTCATCACTTCGCTGATATAGACTTCATAAGGAGCGTTAATGCCCTTAAATTCCCTAAGGGTAATCCTTTCCG								
Consensus	GCTCATCACTTCGCTGATATAGACTTCATAAGGAGCGTTAATGCCCTTAAATTCCCTAAGGGTAATCCTTTCCG								
	601	610	620	630	640	650			
	-----+-----+-----+-----+-----+-----								
LPB-14	CCCAARTTCTTCATACCATTTTAAAGGGCGTTGTGTAAGTTCCACTT								
LPB-2	CCCAARTTCTTCATACCATTTTAAAGGGCGTTGTGTAAGTTCCACTT								
LPB-6	CCCAARTTCTTCATACCATTTTAAAGGGCGTTGTGTAAGTTCCACTT								
Consensus	CCCAARTTCTTCATACCATTTTAAAGGGCGTTGTGTAAGTTCCACTT								

Figura 5E - Alinhamento das sequências de ácidos nucleicos da região *mutY* das amostras isogênicas de *H. pylori*.

Como mostra a Figura 6, as cepas LPB-14, LPB-2 e LPB-6 com os perfis de EPIYA ABC, ABCC e ABCCC, respectivamente, apresentaram o mesmo padrão de RAPD usando os iniciadores 1281 e 1254.

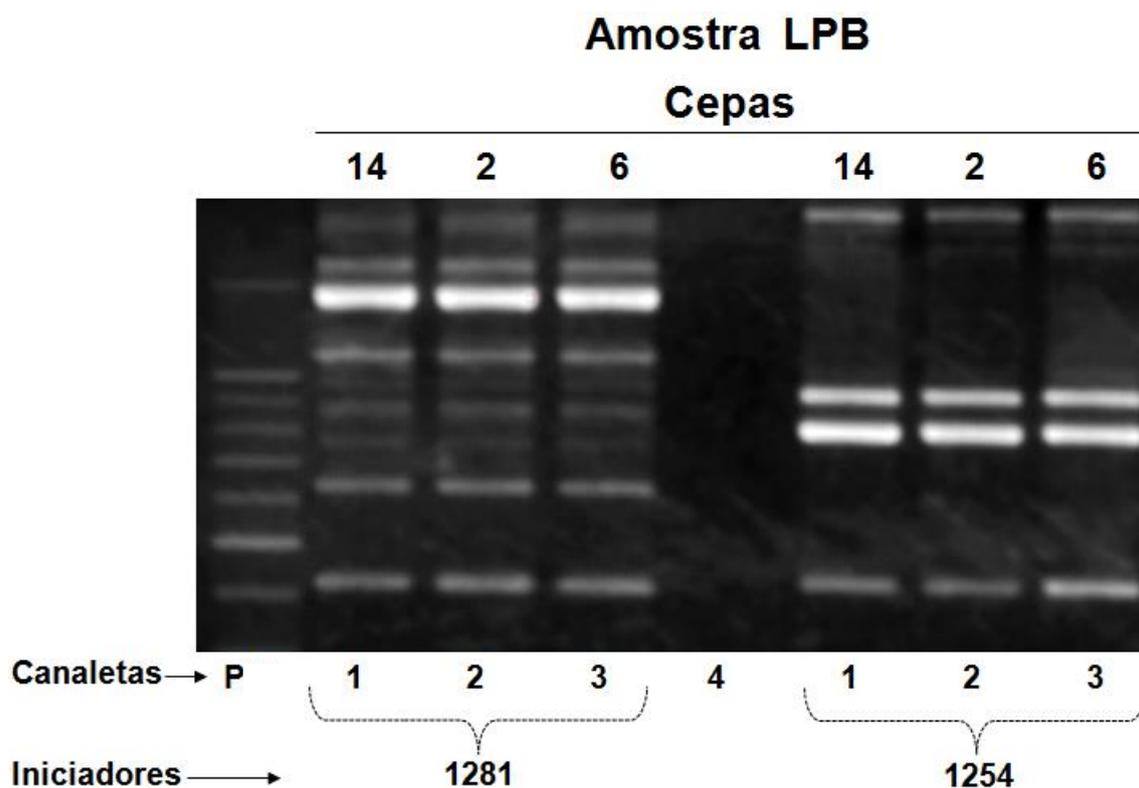


Figura 6 - Gel de agarose dos produtos amplificados por RAPD-PCR: canaletas 1, cepa LPB-14 com perfil de EPIYA ABC; canaletas 2, cepa LPB-2 com perfil de EPIYA ABCC; canaletas 3, cepa LPB-6 com perfil de EPIYA ABCCC; canaleta 4, controle negativo interno da reação (água destilada) e canaleta P, padrão de tamanho molecular (100 pb).

As sequências do gene *vacA* nas regiões i e d, demonstraram que as três cepas com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C são *vacA* i1/d1, considerado o genótipo de *vacA* mais virulento (Figura 7).

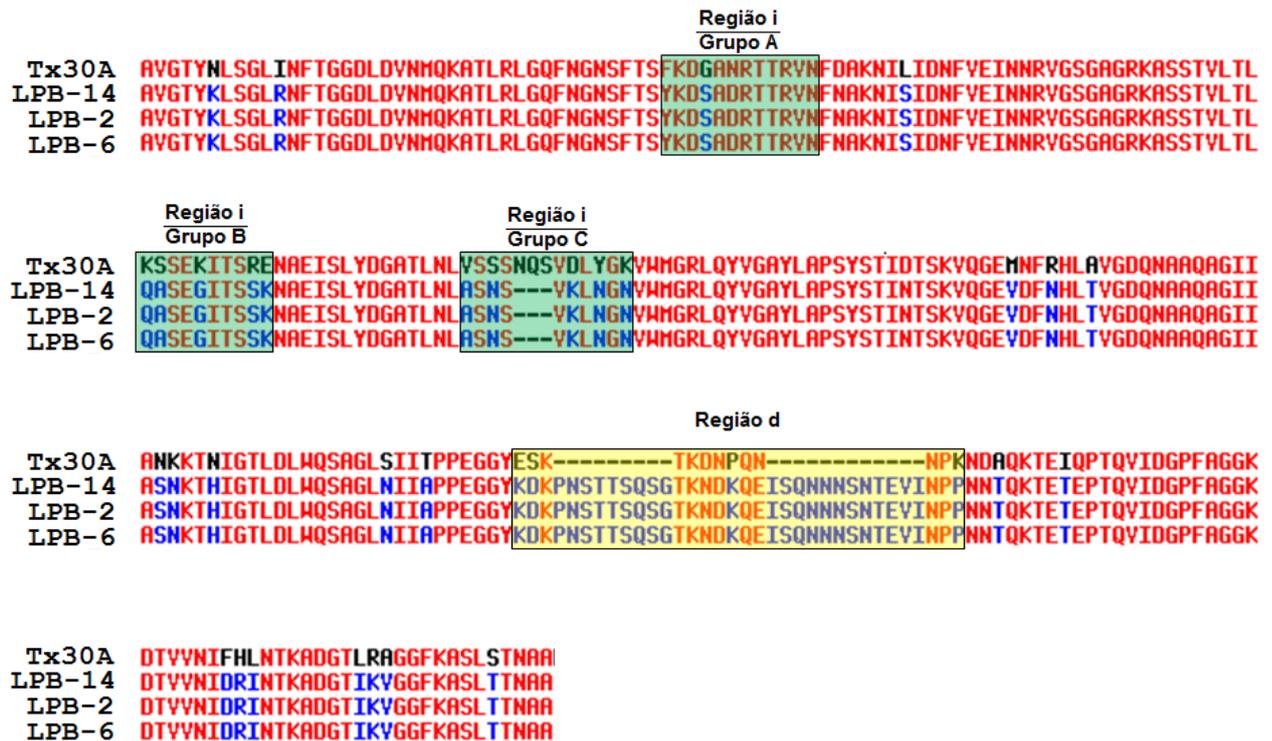


Figura 7 - Alinhamento parcial de aminoácidos das regiões i e d da citotoxina vacuolizante VacA das colônias de *H. pylori* LPB-14, LPB-2 e LPB-6 com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C, respectivamente. A amostra de referência Tx30A apresenta o genótipo i2/d2 enquanto as demais são i1/d1.

4.3. Efeito do número de sítios de fosforilação EPIYA C nas vias de sinalização

4.3.1. Ativação das vias de sinalização nas células mononucleares do sangue periférico em resposta ao estímulo com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios EPIYA C

Inicialmente foi demonstrado dois fenótipos já descritos na literatura induzidos pelos sítios de fosforilação EPIYA C: o fenótipo “Beija-flor” nas células AGS com aumento progressivo de acordo com o número de sítios EPIYA C e a agregação celular observada nas células mononucleares que ocorreu independentemente do número de sítios EPIYA C mas dependente do SST4 (Figura 8). Nas células AGS e mononucleares não estimuladas e nas células estimuladas com a amostra *cagA*-negativa (Tx30A) os dois fenômenos não foram observados (figura 8).

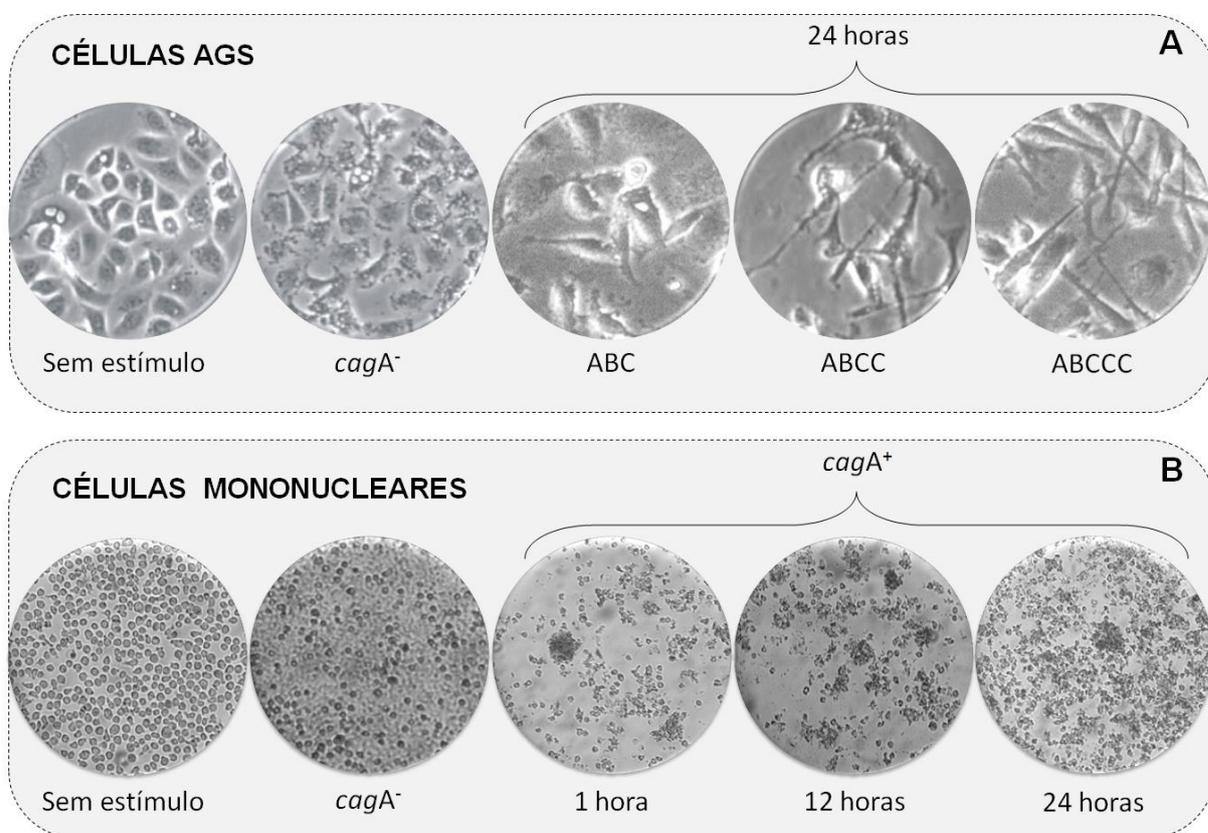


Figura 8: Células AGS e mononucleares estimuladas com amostras de *H. pylori* por 24 horas para avaliar os fenótipos (A) “Beija-flor” e (B) agregação celular.

Em seguida, demonstrou-se que a proteína CagA das cepas de *H. pylori* com diferentes números de sítios EPIYA C foi introduzida no interior das células mononucleares do sangue periférico e fosforilada, bem como nas células THP1 e AGS como mostra a Figura 9. Nas células mononucleares e THP-1 houve quebra da proteína CagA em dois fragmentos; um de 100 kDa referente à porção amino-terminal e outro correspondente à região carboxi-terminal com peso molecular variando entre 35 a 40 kDa, de acordo com o número de sítios EPIYA C (Figura suplementar 1). Nas células AGS, como o CagA não foi processado, o peso molecular da proteína variou de 120 a 140 kDa de acordo com o número de sítios de fosforilação EPIYA C (Figura 9).

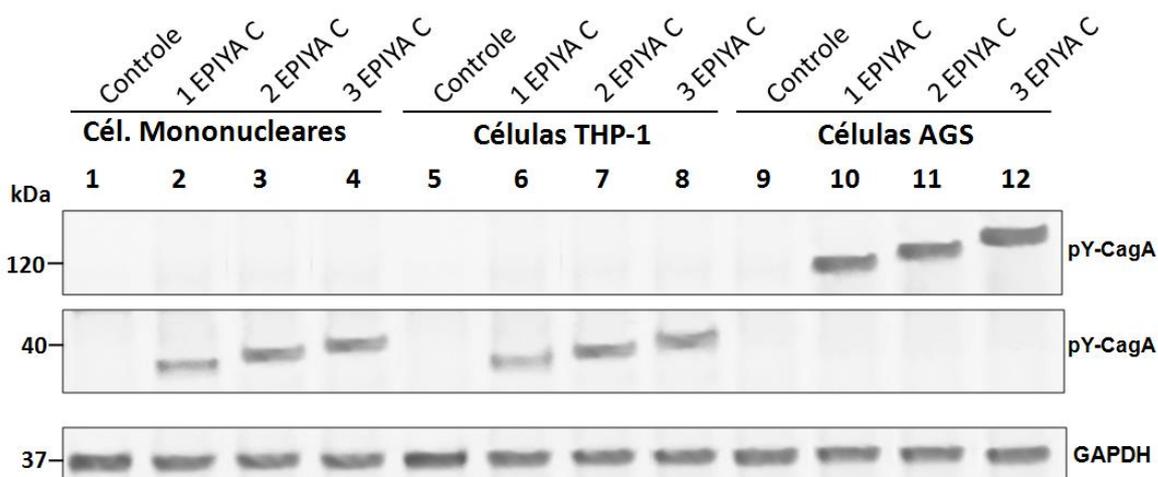


Figura 9: “Imunoblot” demonstrando a presença da proteína CagA de *H. pylori* com os sítios de tirosina fosforilados nas células mononucleares, células THP1 e células AGS depois de cocultivo por 6 horas com amostras isogênicas de *H. pylori* com diferentes números de sítios EPIYA C. Extrato total dos lisados celulares foram imunoprecipitados com o anticorpo Anti-CagA (A-10) e avaliados por “Imunoblot” com o anticorpo anti-pTyr (PY-99). Foram usados como Controle o imunoprecipitado dos lisados totais de células mononucleares, THP-1 e AGS sem estímulo. GAPDH foi usado como controle da reação que assegura o carregamento aproximadamente igual das amostras.

A ativação semi-quantitativa das vias dependentes de MAPKs (ERK1/2 e p38), STAT3 e NF- κ B na forma fosforilada e não fosforilada nas células mononucleares sob os diversos estímulos foi determinada por “Western blot”. Foram testados os tempos de incubação de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas (Figura 10). A ativação de NF- κ B com diferenças quanto ao número de sítios EPIYA C ocorreu somente na primeira hora (Figura 10D).

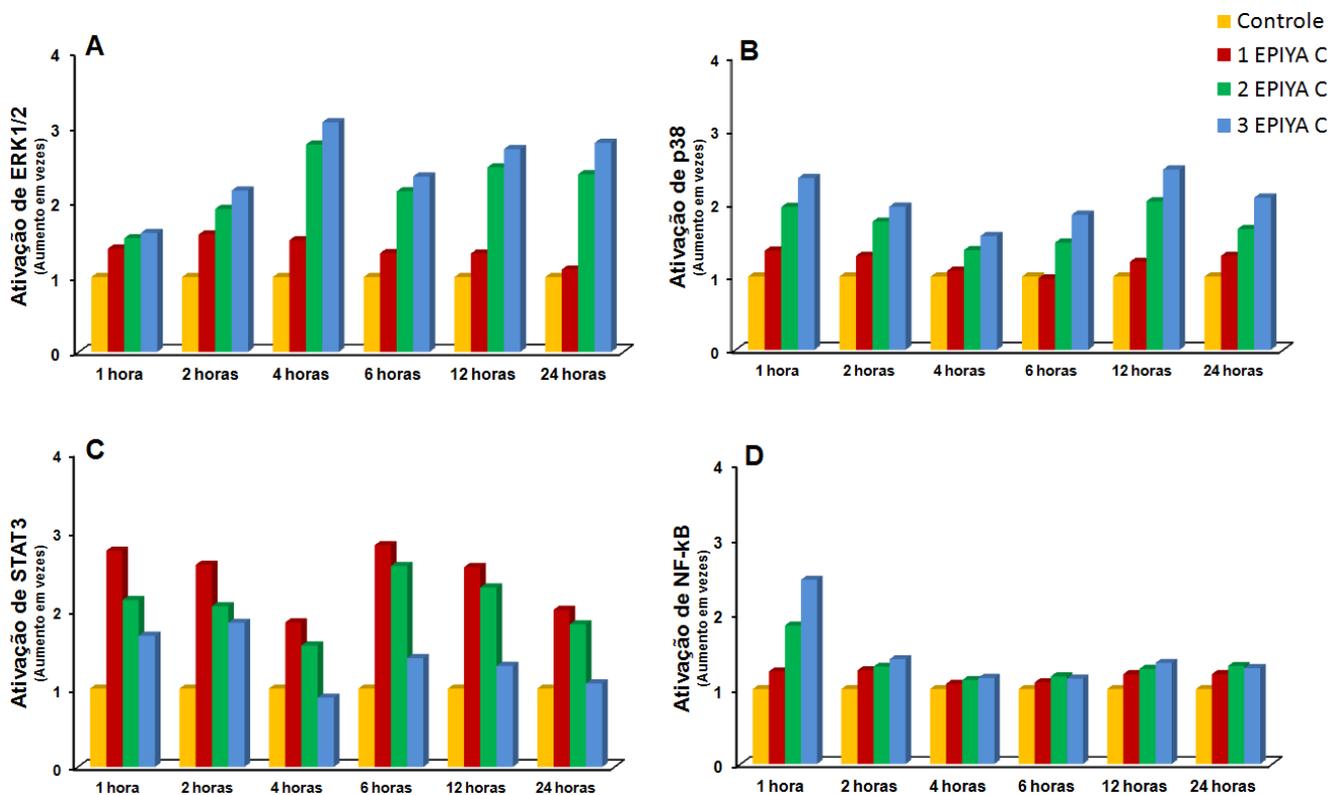


Figura 10: Análise quantitativa da ativação das vias de sinalização ERK1/2 (A), p38 (B), STAT3 (C) e NF- κ B (D) nos lisados de células mononucleares do sangue periférico depois de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas de estímulo com amostras de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C. Os gráficos foram construídos com base na intensidade das bandas observadas nos “blots”, quantificadas por densitometria (*Molecular Imaging Software v.4.0.5*, KODAK). Os resultados foram padronizados comparando os valores obtidos com os do controle sem estímulo. Média de três experimentos distintos.

Cepas de *H. pylori* ativaram as vias ERK1/2 e p38 proporcionalmente ao número de sítios EPIYA C. A ativação das MAPKs permaneceu até o último período avaliado de 24 horas, especialmente com as cepas com dois e três sítios EPIYA C (Figuras 10A e B). Um comportamento inverso foi visto quanto à ativação de STAT3, que foi maior no cocultivo com a amostra de *H. pylori* com um único sítio de fosforilação EPIYA C (Figura 10C). A via também permaneceu ativada até 24 horas.

Para representar a análise quantitativa determinada por “Western blot” da figura 10 foram escolhidos os “blots” com os tempos de incubação de 4 e 6 horas. A figura 11 mostra os “blots” das vias das MAPKs (ERK1/2 e p38), STAT3 e NF- κ B na forma fosforilada e não fosforilada dos lisados das células mononucleares estimuladas com as amostras de *H. pylori*.

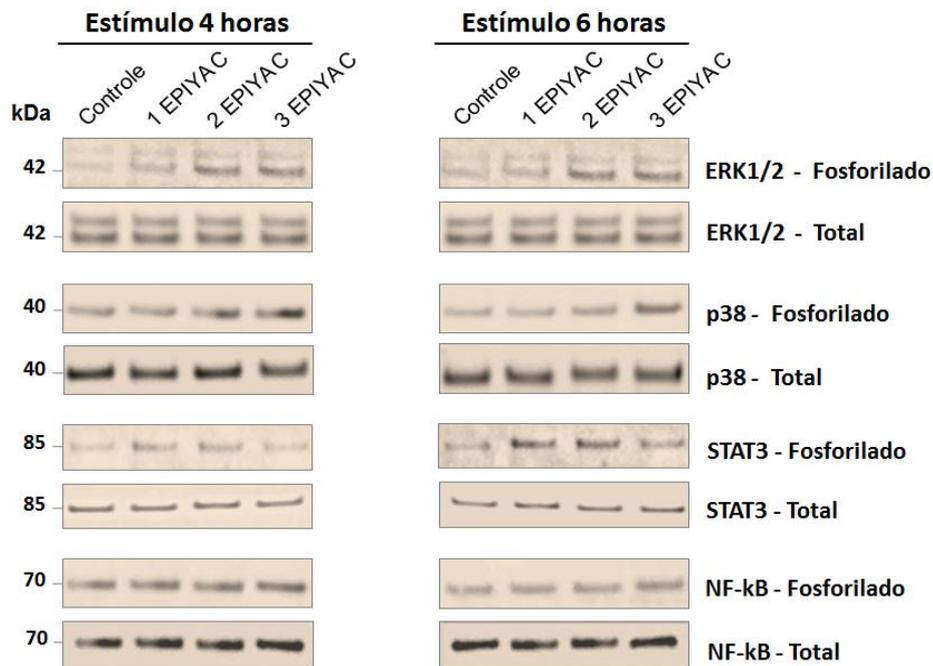


Figura 11: “Blots” representativos da ativação das vias ERK1/2, p38, STAT3 e NF- κ B na forma fosforilada e não fosforilada nos tempos de 4 e 6 horas dos lisados de células mononucleares sem estímulo (controle) e estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.

4.3.2. Ativação das vias de sinalização nas células AGS em resposta ao estímulo com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios EPIYA C

A expressão quantitativa das vias MAPKs (ERK1/2 e p38), STAT3 e NF- κ B na forma fosforilada e não fosforilada depois de as células AGS terem sido estimuladas foi determinada por “Western blot”. Foram testados os tempos de incubação de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas (Figura 12).

As amostras de *H. pylori* ativaram as vias MAPK/ERK1/2 proporcionalmente ao número de sítios EPIYA C (Figura 12A). Por outro lado, o padrão de ativação de STAT3 foi visto ser inverso, tendo a amostra de *H. pylori* com um único sítio de fosforilação EPIYA C ativado a via mais intensamente, com um pico de ativação na segunda hora (Figura 12C). Embora as amostras isogênicas tenham estimulado NF- κ B, não houve diferença significativa quanto ao número de sítios EPIYA C nos tempos de 2 a 24 horas (Figura 12D).

A ativação da via dependente de p38 pelas amostras isogênicas de *H. pylori* só foi significativamente diferente entre as amostras a partir do tempo de incubação de 4 horas com um pico em 6 horas (Figura 12B). Houve também um pico de ativação da via ERK1/2 com 6 horas. A ativação das duas vias MAPK's (ERK1/2 e p38) permaneceu até 24 horas.

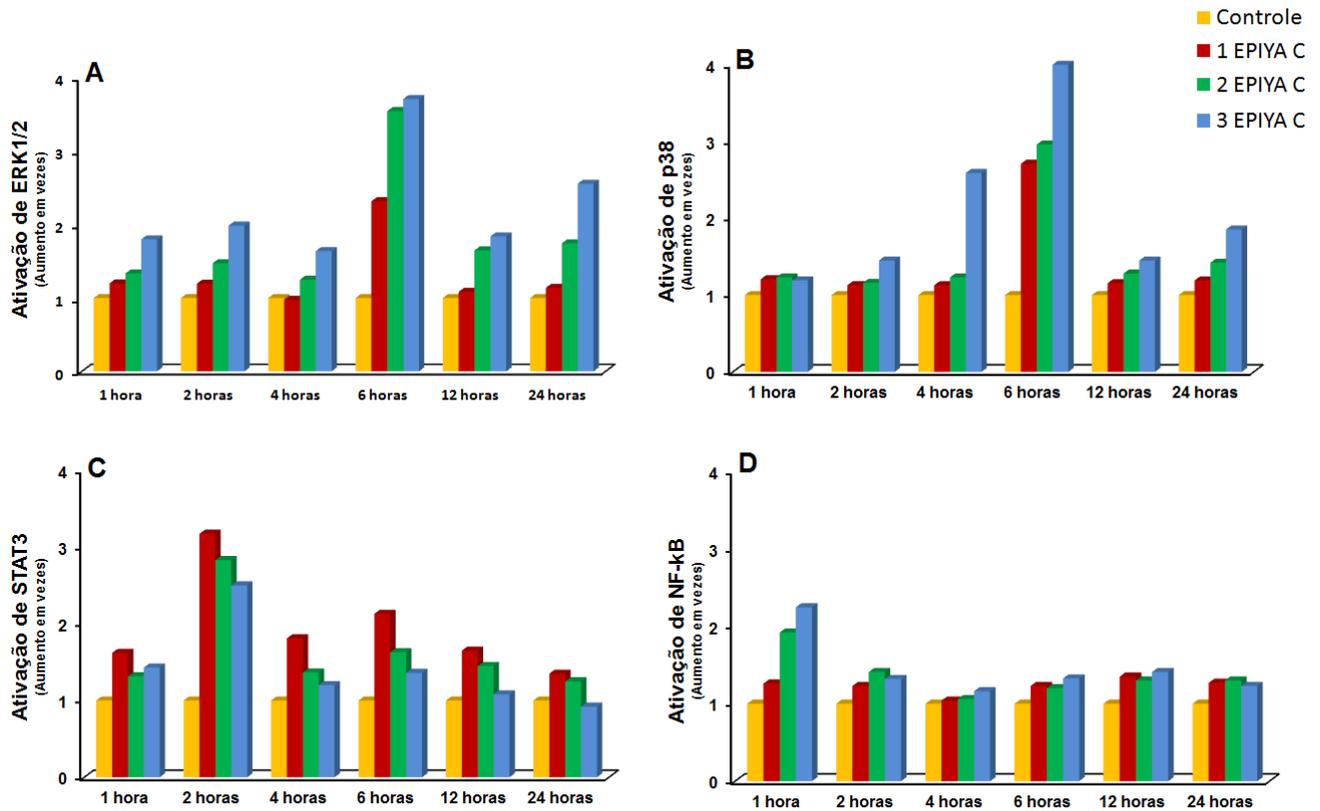


Figura 12: Análise quantitativa da ativação das vias de sinalização ERK1/2 (A), p38 (B), STAT3 (C) e NF-kB (D) nos lisados de células AGS depois de 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas de estímulo com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C. Os gráficos foram construídos com base na intensidade das bandas observadas nos “blots”, quantificadas por densitometria (*Molecular Imaging Software v.4.0.5*, KODAK). Os resultados foram padronizados comparando os valores obtidos com os do controle sem estímulo. Média de três experimentos distintos.

Para representar a análise quantitativa determinada por “Western blot” da figura 12 foram escolhidos os “blots” com os tempos de incubação de 4 e 6 horas. A figura 13 mostra os “blots” das vias das MAPKs (ERK1/2 e p38), STAT3 e NF-kB na forma fosforilada e não fosforilada dos lisados das células AGS estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori*.

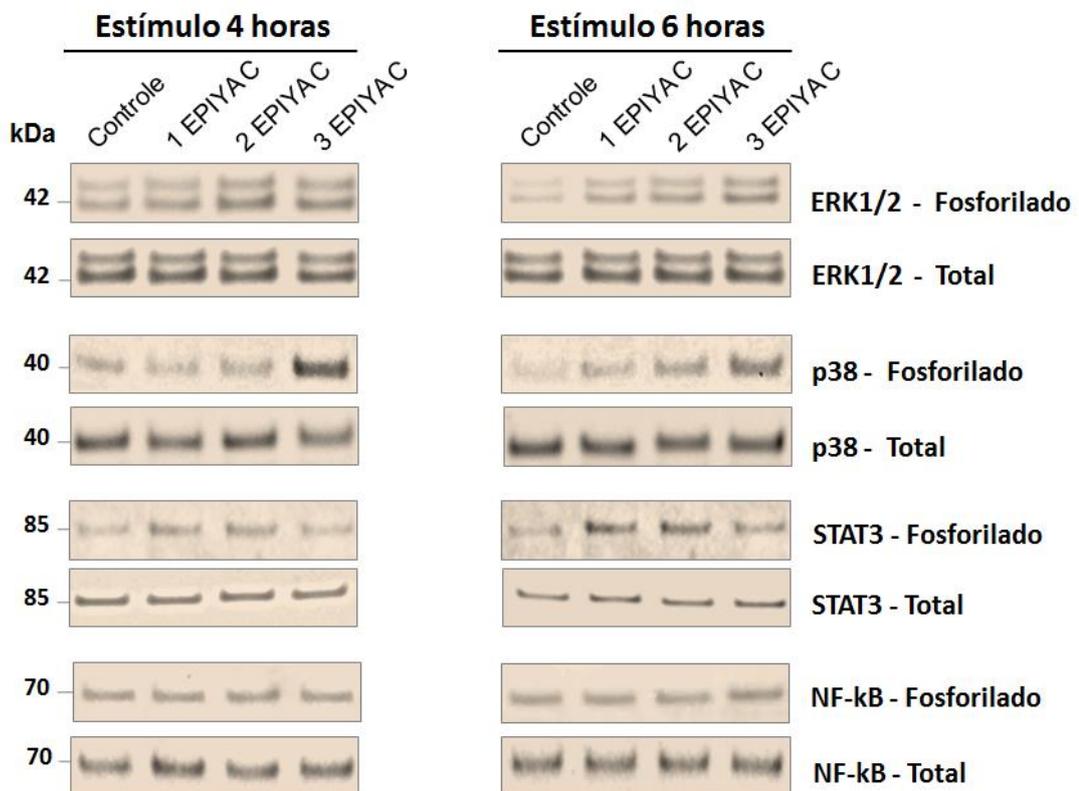


Figura 13: Blots representativos da ativação das vias ERK1/2, p38, STAT3 e NF-kB na forma fosforilada e não fosforilada nos tempos de 4 e 6 horas dos lisados de células AGS sem estímulo (controle) e estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C.

Como a ativação das vias MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT3 foi inversamente proporcional indicando controle mútuo foram feitos dois experimentos extras; um na presença do inibidor PP2 que impede a fosforilação da proteína CagA pela tirosina cinase Src, inibindo a ativação da via ERK1/2. Como pode ser observado na figura 14 foi visto aumento de fosforilação de STAT3. O mesmo resultado foi observado quando o inibidor PD98059 da via ERK (Figura 14) foi usado. Vale ressaltar que depois do uso dos inibidores PP2 e ou PD-98059 a maior ativação de STAT3 fosforilado ocorreu no cocultivo com a amostra de *H. pylori* com um sítio de fosforilação EPIYA C, em consonância com os resultados anteriores.

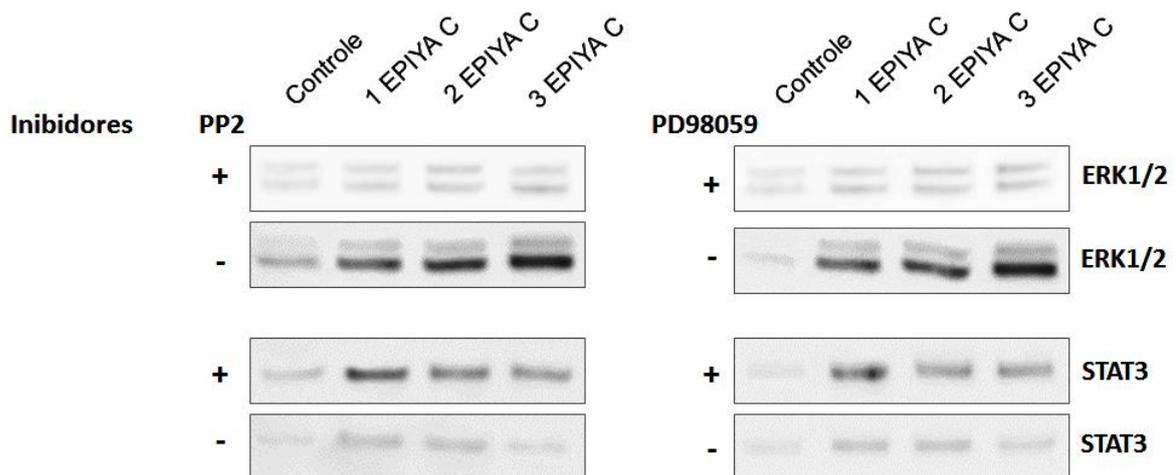


Figura 14: “Western blot” de lisado celular dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C depois de 6 horas de incubação na presença/ausência de inibidores. As células AGS foram pré-tratadas com os inibidores PP2 (10 µM) e ou PD98059 (50 µM) por uma hora antes de receber o estímulo. Os níveis de fosforilação de ERK1/2 e de STAT3 foram analisados por imunoblot. Células AGS sem estímulo foram usadas como controle.

4.4. Produção de citocinas por células mononucleares de indivíduos *H. pylori*-negativos estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori* com diferentes números de sítios de fosforilação EPIYA C

Inicialmente foi feito um estudo piloto com tempo de incubação de 24 e 48 horas estimulando as células com amostras de *H. pylori* com um e três sítios de fosforilação EPIYA C em três experimentos distintos (Figura 15). Diferenças relativas ao número de sítios EPIYA C foram significativas somente depois de 48 horas, motivo pelo qual esse tempo de incubação foi adotado para os demais experimentos.

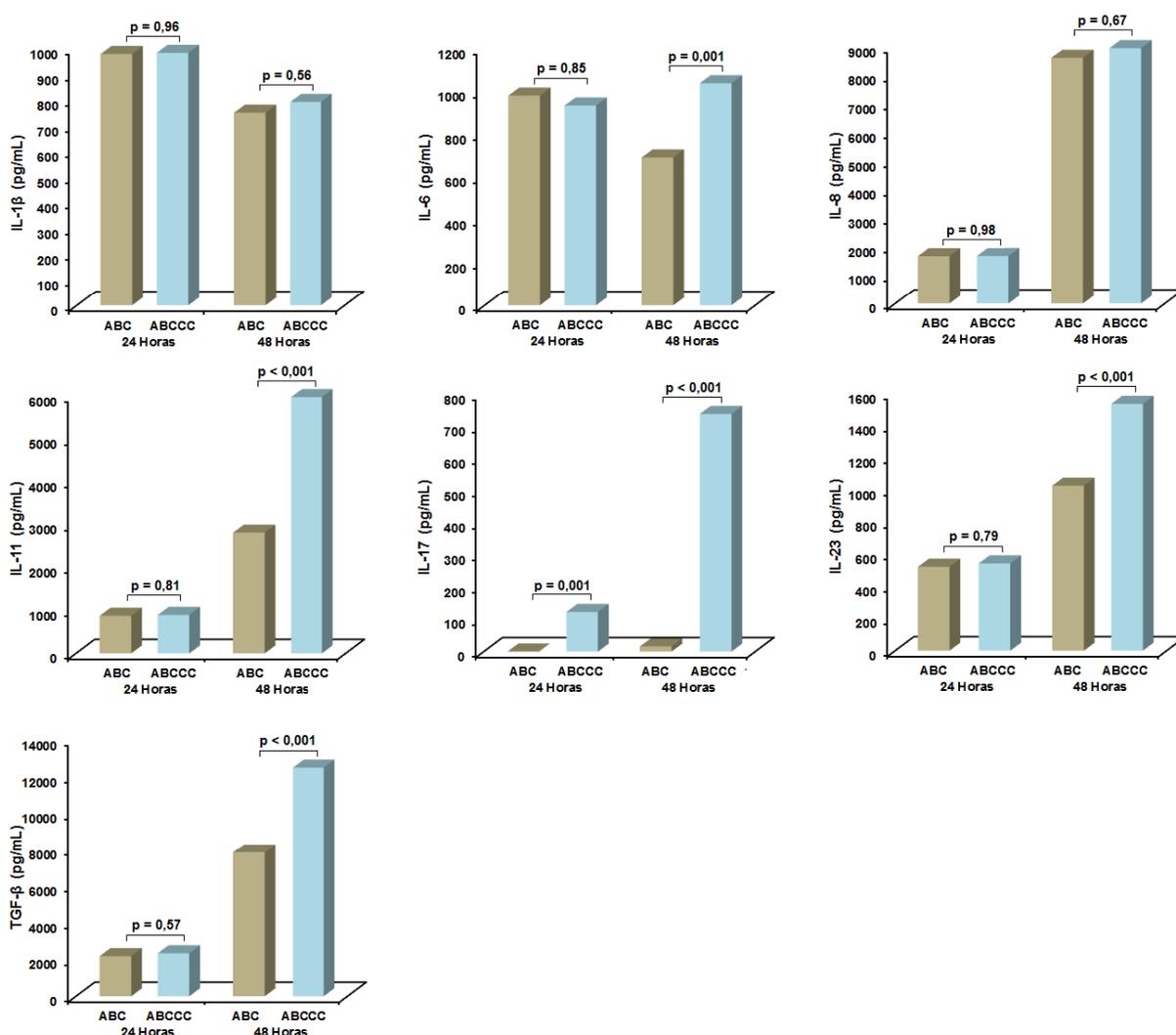


Figura 15: Concentração das citocinas no sobrenadante dos cocultivos de células mononucleares de cinco indivíduos *H. pylori*-negativos estimuladas com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e três sítios EPIYA C nos tempos de 24 e 48 horas para determinação do tempo de incubação (análise feita pelo ANOVA).

Embora tenha sido observada variação na concentração das citocinas produzidas pelas células mononucleares dos cinco doadores *H. pylori*-negativos, a concentração de IL-6, IL-11, IL-17A, IL-23 e TGF- β foi progressivamente maior de acordo com o número de sítios de fosforilação EPIYA C da proteína CagA nos cocultivos de 48 horas de cada um dos doadores em três experimentos distintos, o que, entretanto, não foi observado no caso da IL-1 β e IL-8 (Figura 16).

Amostras de *H. pylori cagA*-positivas com mais de um sítio de fosforilação EPIYA C induziram maior produção de todas as citocinas que a amostra padrão *cagA*-negativa (Tx30A), exceto IL-1 β (Figuras 16 e 17). Ressalta-se, ainda, que não foram observadas diferenças na produção de IL-1 β , IL-11 e TGF- β entre a amostra com um sítio EPIYA C e a amostra *cagA*-negativa (Figura 17). Não houve produção de IL-17 nos cocultivos com amostras *cagA*-negativa e amostra carreadora de um sítio EPIYA C (Figura 16).

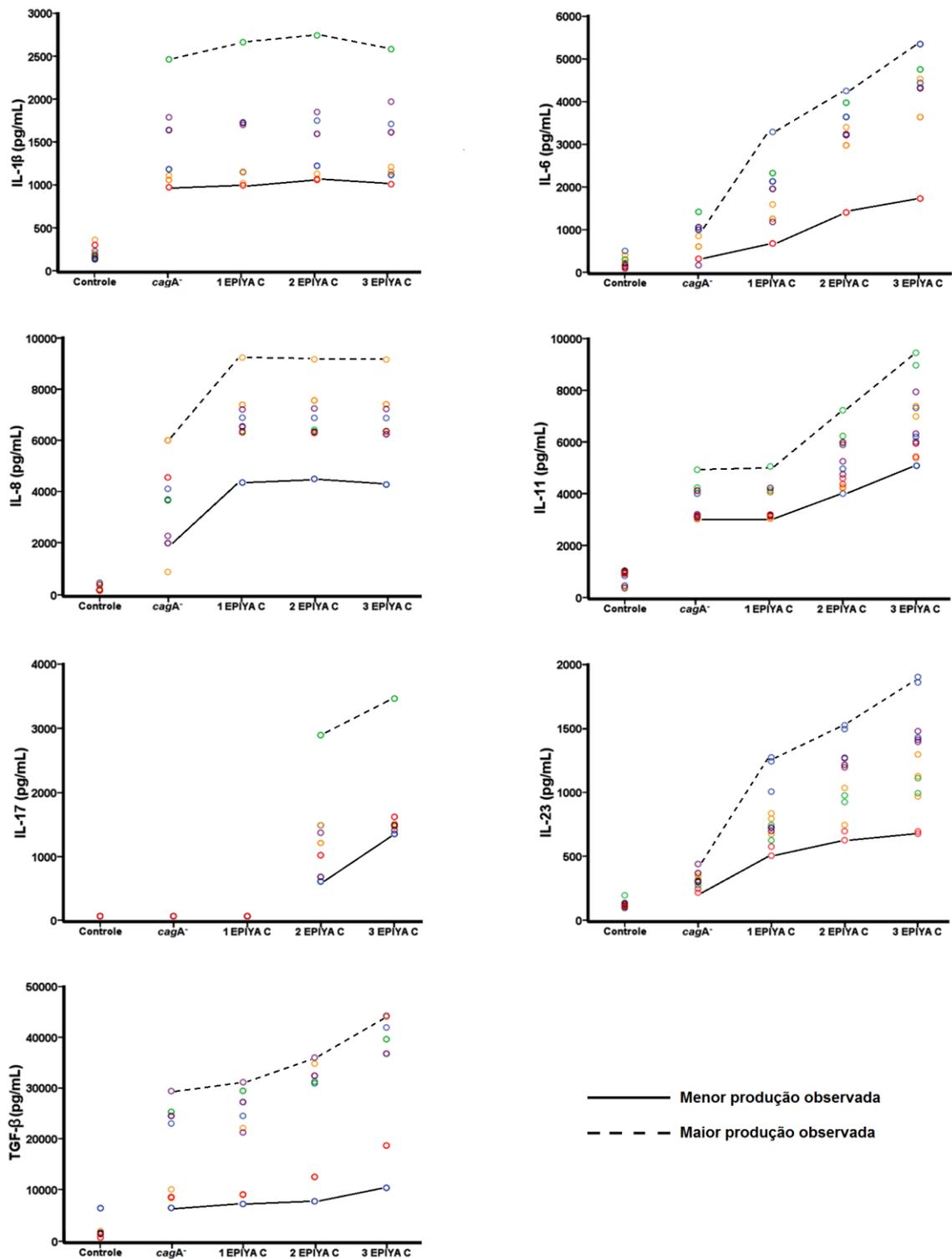


Figura 16: Concentração das citocinas no sobrenadante dos cocultivos de células mononucleares dos cinco doadores *H. pylori*-negativos e amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios EPIYA C da proteína CagA, amostra padrão *cagA*-negativa (Tx30A) e sem estímulo. Cada doador está representado por uma cor diferente. Resultado de três experimentos distintos com 48 horas de incubação.

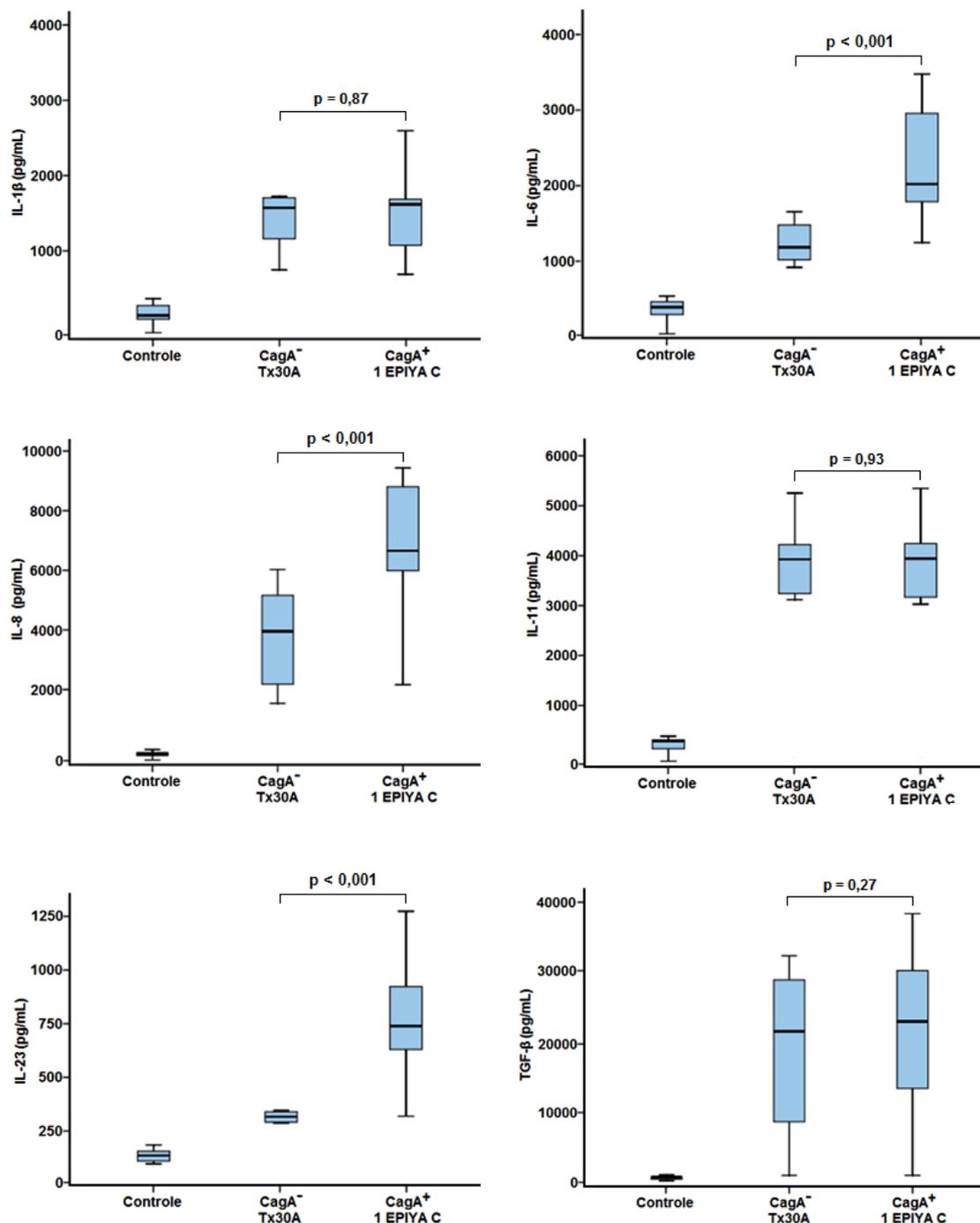


Figura 17: “Box plots” representando as concentrações de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-11, IL-23 e TGF-β (pg/mL) 48 horas depois dos estímulos das células mononucleares com amostra *cagA*-negativa (Tx30A) e *cagA*-positiva com um sítio de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo. Os limites superiores e inferiores do “box plot” representam, respectivamente, os percentis 75 e 25. As linhas horizontais dentro do “box plot” representam a mediana. As extremidades superiores e inferiores das linhas verticais representam os valores máximos e mínimos, respectivamente (Análise feita pelo teste de Mann-whitney). Resultados de três experimentos diferentes.

4.4.1. Concentração média de citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios EPIYA C

Quando os resultados foram analisados em conjunto, foi observado aumento significativo na média das concentrações de IL-6, IL-11, IL-17A, IL-23 e TGF- β de acordo com o aumento do número de sítios de fosforilação EPIYA C. Por outro lado, não houve associação entre as concentrações de IL-1 β e de IL-8 com o número de sítios de fosforilação EPIYA C, como mostra a Tabela 3 e a Figura 18. Vale ressaltar, que não houve produção de IL-17A quando as células foram estimuladas com amostras com um único sítio de fosforilação EPIYA C.

Tabela 3 – Concentração média (pg/mL) das citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C

Citocinas	Concentração Média \pm Desvio padrão			p^*
	1 EPIYA C	2 EPIYA C	3 EPIYA C	
IL-1 β	1577,5 \pm 647,4	1614,0 \pm 711,4	1558,0 \pm 582,1	0,98
IL-6	1518,8 \pm 610,7	2977,8 \pm 900,9	3745,8 \pm 1198,7	< 0,001
IL-8	6962,7 \pm 916,5	6954,2 \pm 945,6	6911,6 \pm 928,9	0,99
IL-11	3617,3 \pm 698,3	5280,5 \pm 1025,9	6975,4 \pm 1442,0	< 0,001
IL-17A	0,0 \pm 0,0	1433,6 \pm 822,9	1903,6 \pm 824,4	< 0,001
IL-23	690,0 \pm 99,6	990,0 \pm 237,3	1115,7 \pm 286,2	0,001
TGF- β	19354,0 \pm 9381,9	24804,0 \pm 10714,3	31566,0 \pm 11389,2	0,04

* Análise feita pelo ANOVA

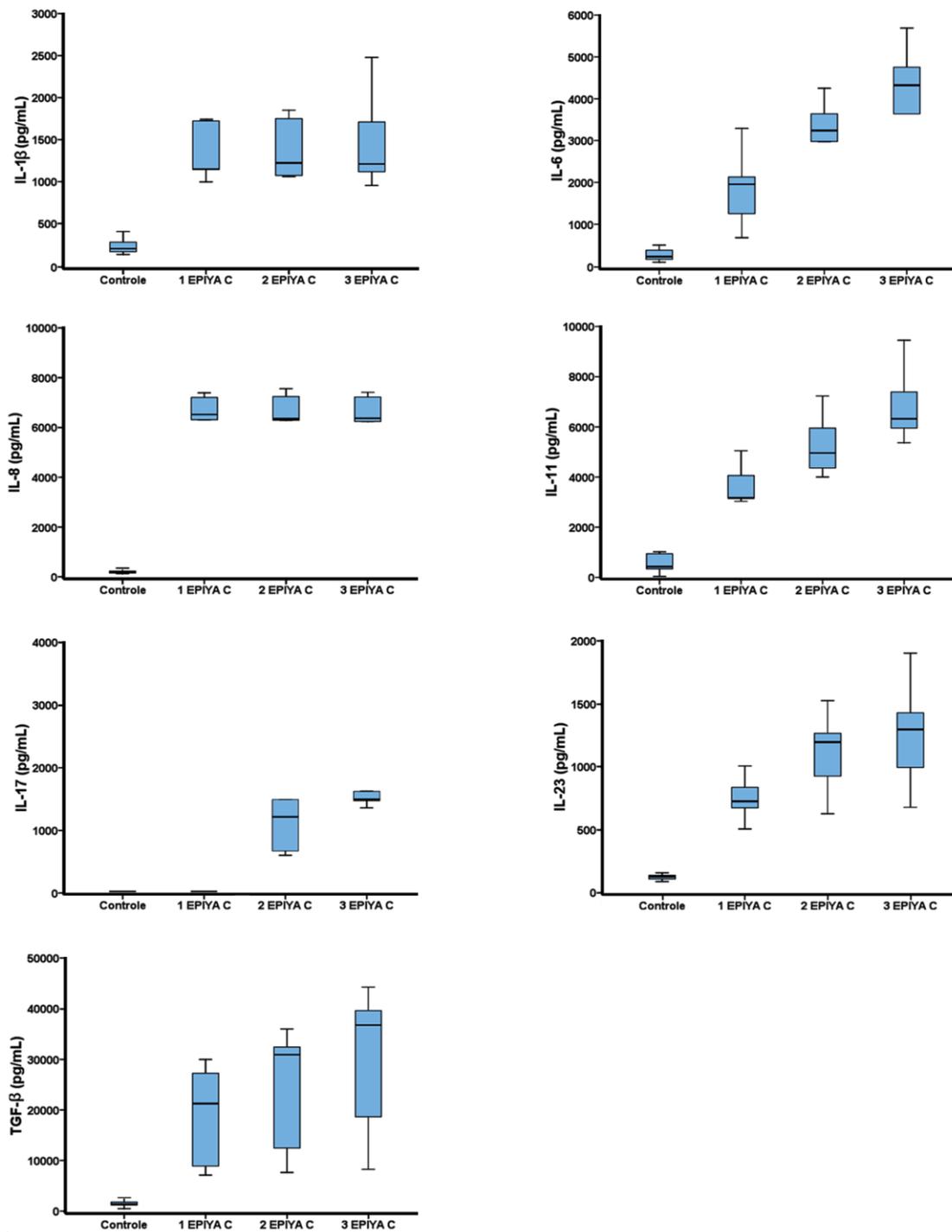


Figura 18: “Box plots” representando as concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, IL-17A, IL-23 e TGF- β (pg/mL) 48 horas depois dos estímulos das células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo. Os limites superiores e inferiores do “box plot” representam, respectivamente, os percentis 75 e 25. As linhas horizontais dentro do “box plot” representam a mediana. As extremidades superiores e inferiores das linhas verticais representam os valores máximos e mínimos, respectivamente Resultados de três experimentos diferentes.

4.5. Concentração média de citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com a amostra *cagA*-negativa (Tx30A) e a amostra *cagA*-positiva com um sítio EPIYA C bem como com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios EPIYA C

As células AGS estimuladas com as amostras isogênicas de *H. pylori* secretaram IL-1 β , IL-8, IL-11 e TGF- β . Por outro lado, não houve produção de IL-6, IL-17A e IL-23 (Figuras 19 e 20).

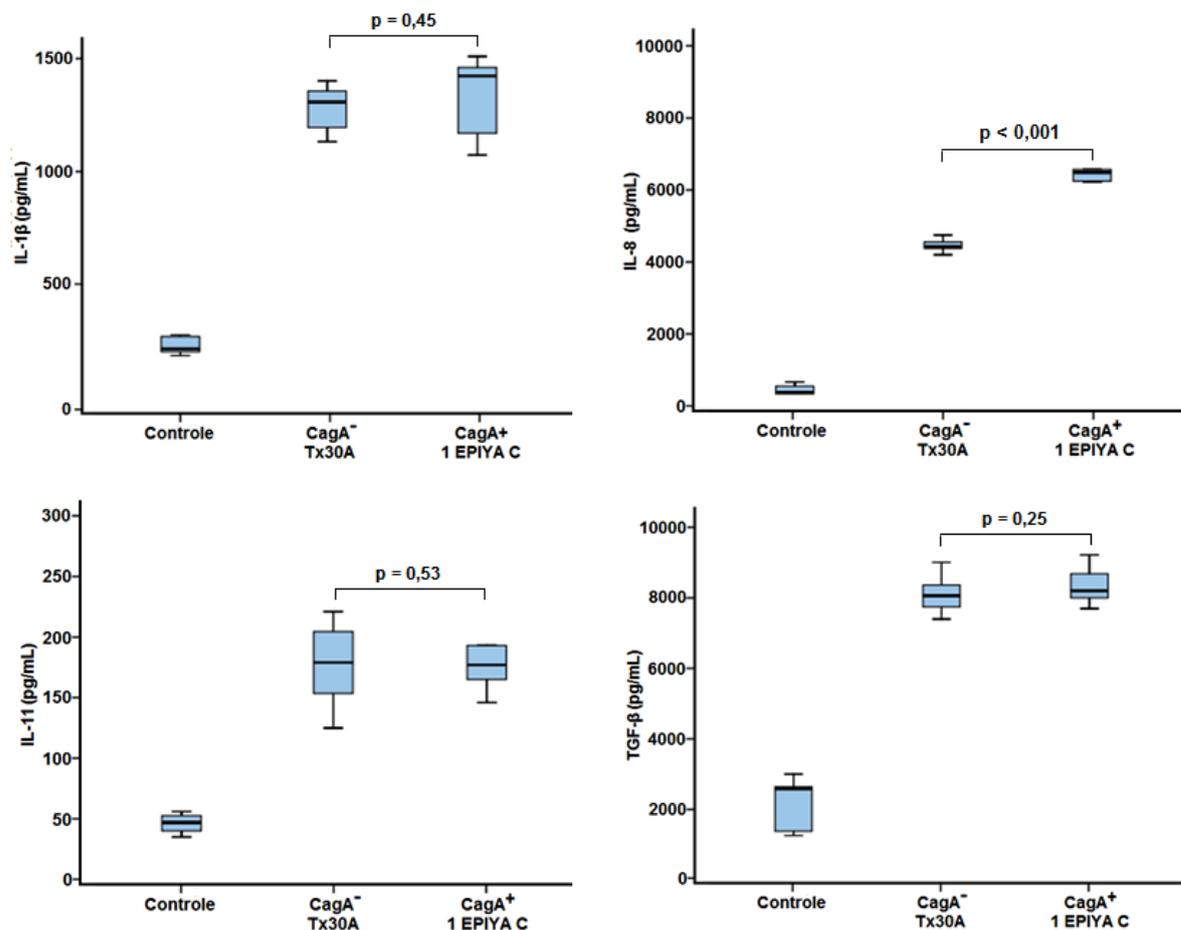


Figura 19: “Box plots” representando as concentrações (pg/mL) de IL-1 β , IL-8, IL-11 e TGF- β 48 horas depois do estímulo das células AGS amostra *cagA*-negativa (Tx30A) e *cagA*-positiva com um sítio de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo. Os limites superiores e inferiores do “box plot” representam, respectivamente, os percentis 75 e 25. As linhas horizontais dentro do “box plot” representam a mediana. As extremidades superiores e inferiores das linhas verticais representam os valores máximos e mínimos, respectivamente (Análise feita pelo teste de Mann-whitney). Resultado de três experimentos distintos.

Quando se avaliou a concentração das citocinas comparando os cocultivos de células AGS com a amostra *cagA*-negativa (Tx30A) com a amostra *cagA*-positiva com um sítio de fosforilação EPIYA C houve maior produção de IL-8 ($p < 0,001$) nos cocultivos com a amostra *CagA* positiva, mas sem diferença na produção de IL-1 β , IL-11 e TGF- β (Figura 19).

Foi observado aumento progressivo da concentração de IL-11 de acordo com o número de sítios de fosforilação EPIYA C da proteína *CagA* nos cocultivos de 48 horas de cada um dos três experimentos conduzidos em dias diferentes. Entretanto, não foi observada diferença nas concentrações médias de IL-1 β , IL-8 e TGF- β em razão do número de sítios EPIYA C como mostrado na Tabela 4 e Figura 20.

Tabela 4 – Concentração média (pg/mL) das citocinas nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C

Citocinas	Concentração Média \pm Desvio padrão			p^*
	1 EPIYA C	2 EPIYA C	3 EPIYA C	
IL-1 β	1313,0 \pm 207,8	1252,0 \pm 209,3	1291,0 \pm 224,9	0,96
IL-8	7208,0 \pm 1607,9	7175,0 \pm 1575,4	7197,0 \pm 1574,0	0,99
IL-11	208,5 \pm 47,4	297,0 \pm 5,6	378,0 \pm 1,41	< 0,001
TGF- β	8288,0 \pm 554,4	8237,5 \pm 569,2	7971,0 \pm 1045,1	0,90

* Análise feita pelo ANOVA

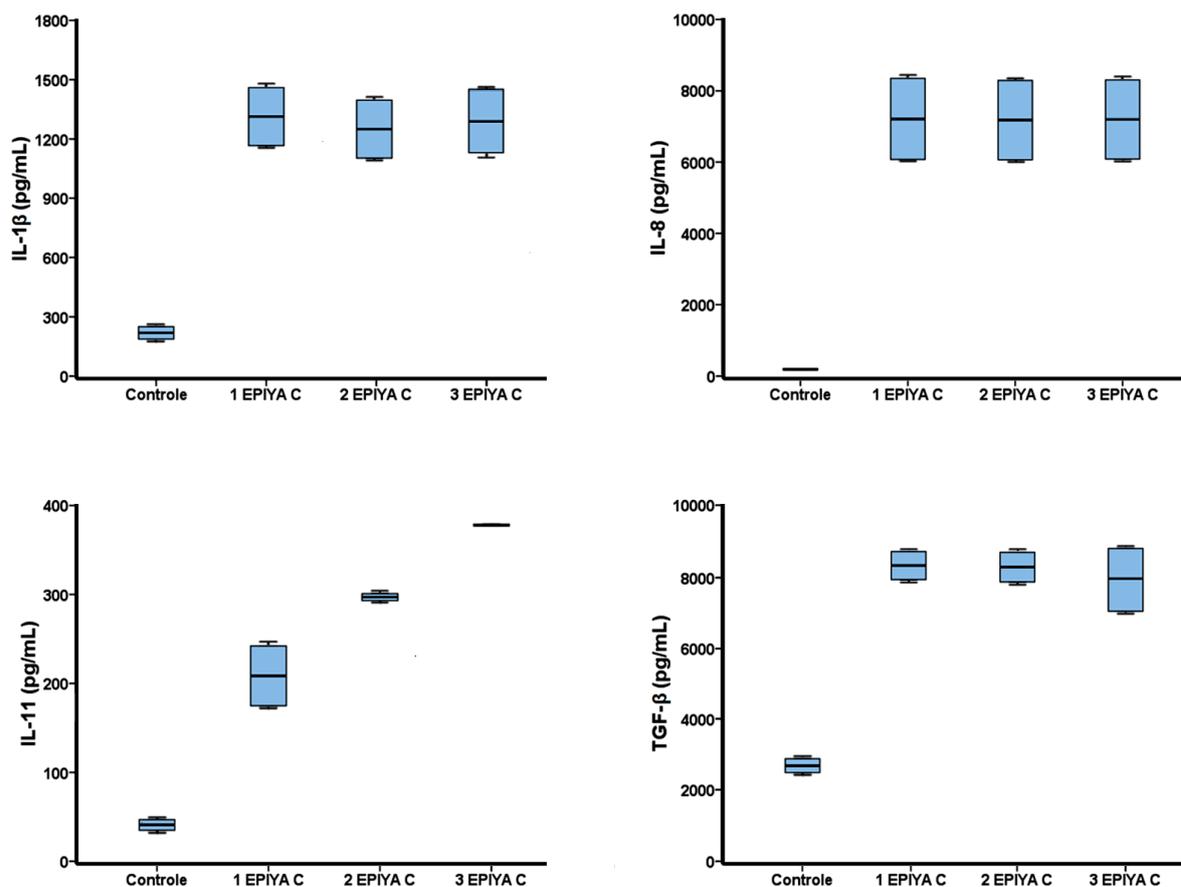


Figura 20: “Box plots” representando as concentrações (pg/mL) de IL-1 β , IL-8, IL-11 e TGF- β 48 horas depois do estímulo das células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C e controle sem estímulo. Os limites superiores e inferiores do “box plot” representam, respectivamente, os percentis 75 e 25. As linhas horizontais dentro do “box plot” representam a mediana. As extremidades superiores e inferiores das linhas verticais representam os valores máximos e mínimos, respectivamente. Resultado de três experimentos distintos.

4.6. Concentração de citocinas no sobrenadante dos cocultivos de *H. pylori* e células mononucleares na presença/ausência de inibidores específicos das vias de sinalização

A produção de IL-1 β foi 100% inibida na presença do inibidor Bay11-7082 (NF-kB) nos cocultivos de células mononucleares com as três cepas de *H. pylori*. Nesse sistema a transcrição de IL-1 β é totalmente dependente de NF-kB. Por outro lado, na presença do inibidor PD98059 (ERK), foi observado aumento da produção de IL-1 β , especialmente com o estímulo pela amostra com um sitio de fosforilação EPIYA C (Figura 21).

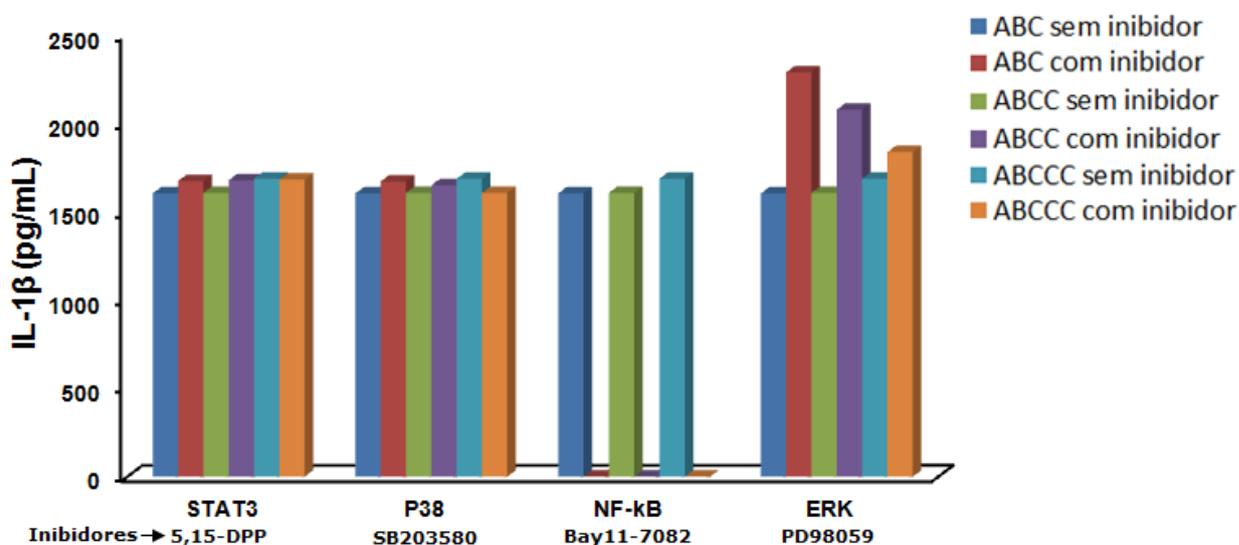


Figura 21: Concentração média de IL-1 β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve produção de IL-1 β nos controles (células mononucleares sem estímulo e células mononucleares sem estímulo, com DMSO).

A produção de IL-6 foi totalmente inibida na presença dos inibidores 5,15-DPP (STAT3) e PD98059 (ERK) nos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. A produção de IL-6 também foi inibida em 90% e 85% com o inibidores Bay11-7082 (NF-κB) e SB203580 (p38), respectivamente (Figura 22).

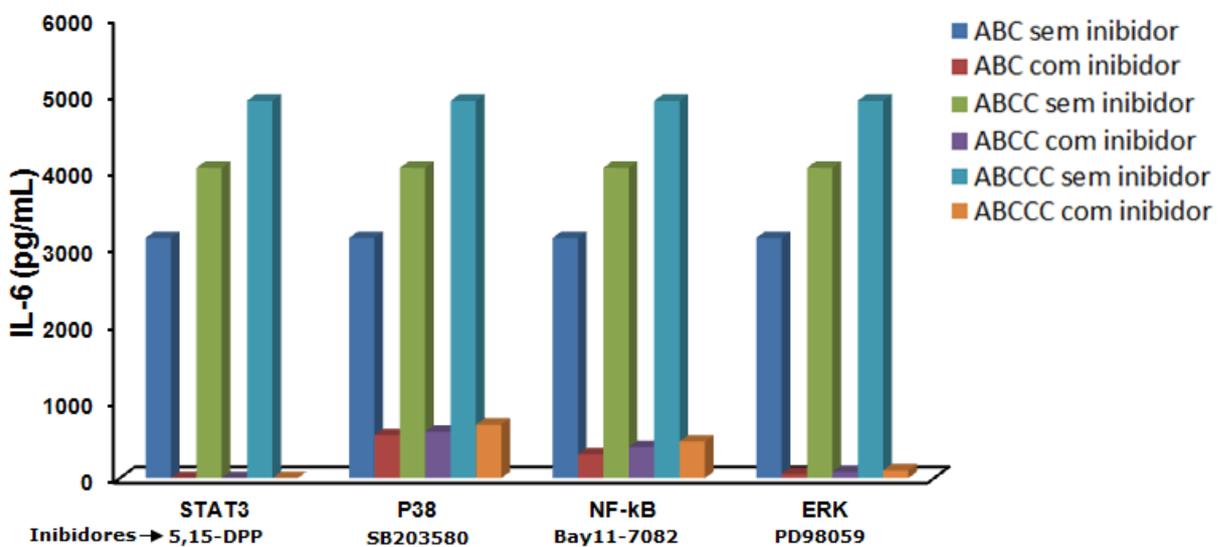


Figura 22: Concentração média de IL-6 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve produção de IL-6 nos controles (células mononucleares sem estímulo e células mononucleares sem estímulo, com DMSO).

A produção de IL-8 foi 100% inibida na presença do inibidor Bay11-7082 (NF- κ B) nos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* (Figura 23).

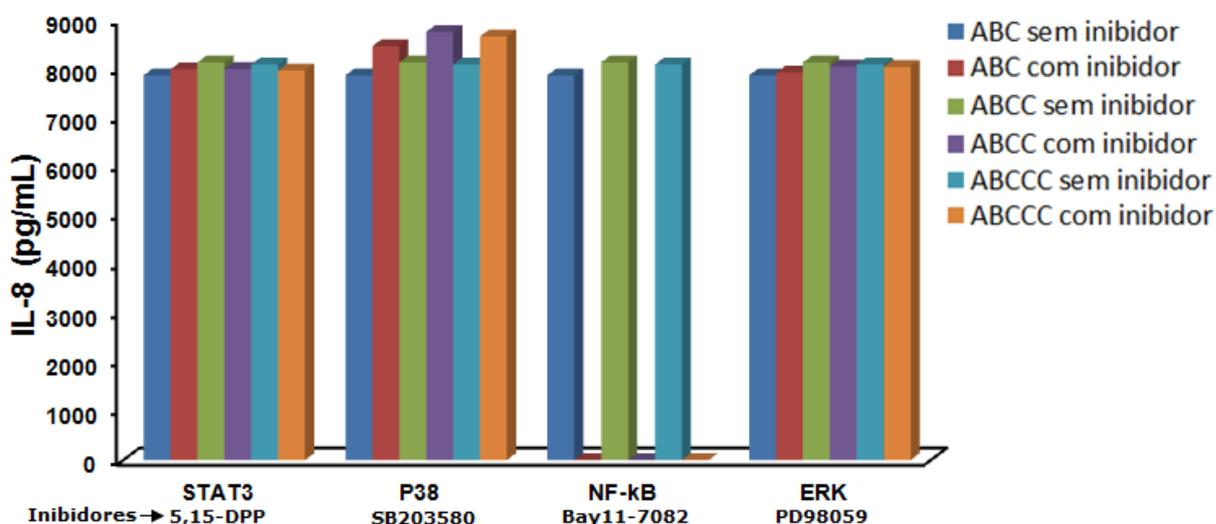


Figura 23: Concentração média de IL-8 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve produção de IL-8 nos controles (células mononucleares sem estímulo e células mononucleares sem estímulo, com DMSO).

A produção de IL-11 foi totalmente inibida na presença dos inibidores 5,15-DPP (STAT3) e PD98059 (ERK) e parcialmente inibida (50%) com os inibidores Bay11-7082 (NF-κB) e SB203580 (p38) nos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* (Figura 24).

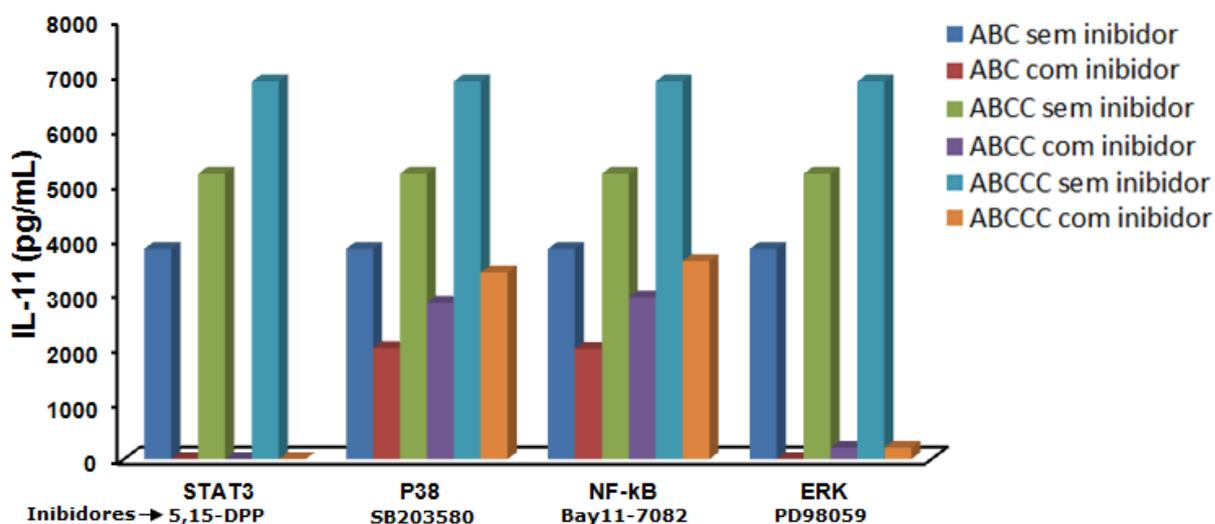


Figura 24: Concentração média de IL-11 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve produção de IL-11 nos controles (células mononucleares sem estímulo e células mononucleares sem estímulo, com DMSO).

Não foi observada produção de IL-17A nos cocultivos de células mononucleares com a cepa de *H. pylori* com apenas um sítio de fosforilação EPIYA C. A produção de IL-17A não foi alterada na presença de Bay11-7082 (NF-κB) e foi totalmente inibida na presença dos inibidores 5,15-DPP (STAT3), PD98059 (ERK) e SB203580 (p38) nos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* (Figura 25).

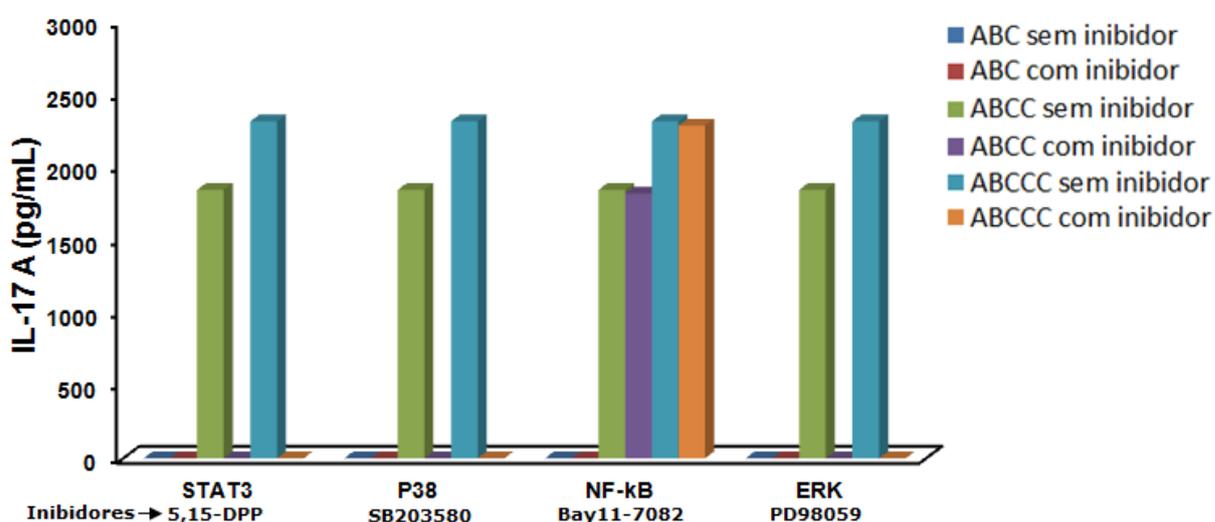


Figura 25: Concentração média de IL-17A (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve produção de IL-17A nos controles (células mononucleares sem estímulo e células mononucleares sem estímulo, com DMSO) bem como nos estímulos com a amostra com um sítio EPIYA C.

A produção de IL-23 foi totalmente inibida na presença dos inibidores Bay11-7082 (NF- κ B) e PD98059 (ERK) nos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. A produção de IL-23 também foi inibida em 84% e 79% com os inibidores SB203580 (p38) e 5,15-DPP (STAT3), respectivamente (Figura 26).

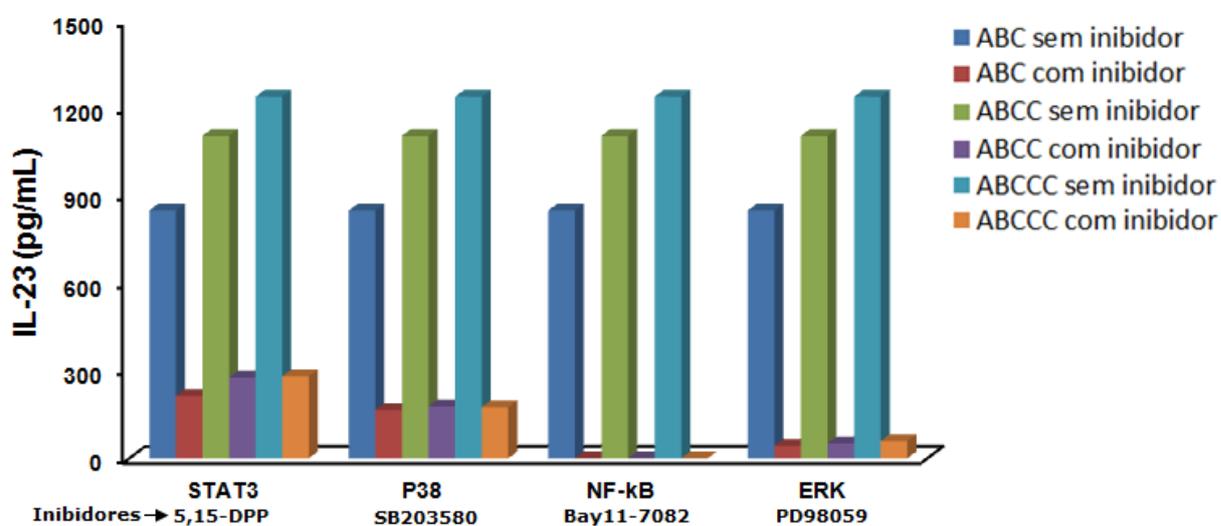


Figura 26: Concentração média de IL-23 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve produção de IL-23 nos controles (células mononucleares sem estímulo e células mononucleares sem estímulo, com DMSO).

A produção de TGF- β foi inibida em 90% na presença do inibidor Bay11-7082 (NF- κ B) nos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. Houve 59% de inibição na presença dos inibidores PD98059 (ERK) (Figura 27).

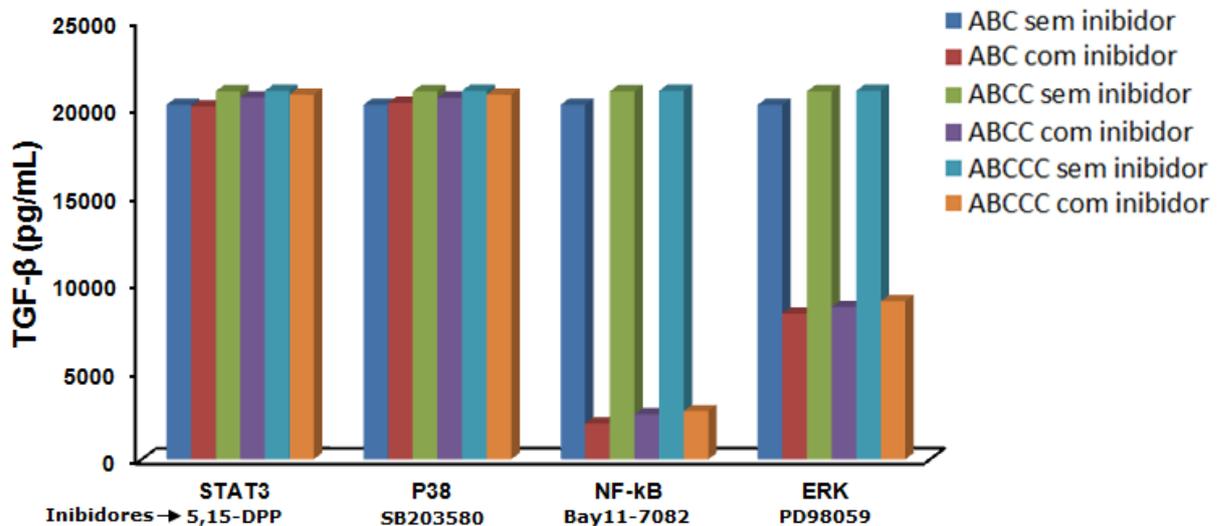


Figura 27: Concentração média de TGF- β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve produção de TGF- β nos controles (células mononucleares sem estímulo e células mononucleares sem estímulo, com DMSO).

4.7. Concentração de citocinas no sobrenadante dos cocultivos de *H. pylori* e células AGS na presença/ausência de inibidores específicos das vias de sinalização

A produção de IL-1 β foi totalmente inibida na presença do inibidor Bay11-7082 (NF-kB) nos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* (Figura 28).

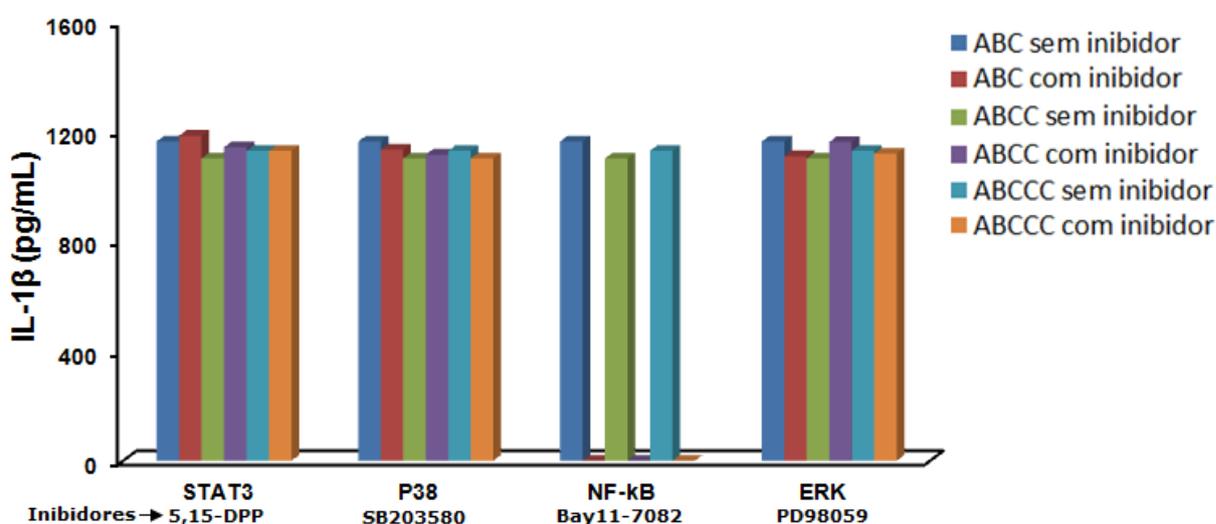


Figura 28: Concentração média de IL-1 β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve diferença na produção de IL-1 β (187 pg/mL) nos controles (células AGS sem estímulo e células AGS sem estímulo, com DMSO).

A produção de IL-8 foi totalmente inibida na presença do inibidor Bay11-7082 (NF- κ B). Também, foi inibida em 25% e 34% com os inibidores SB203580 (p38) e PD98059 (ERK), respectivamente, nos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* (Figura 29).

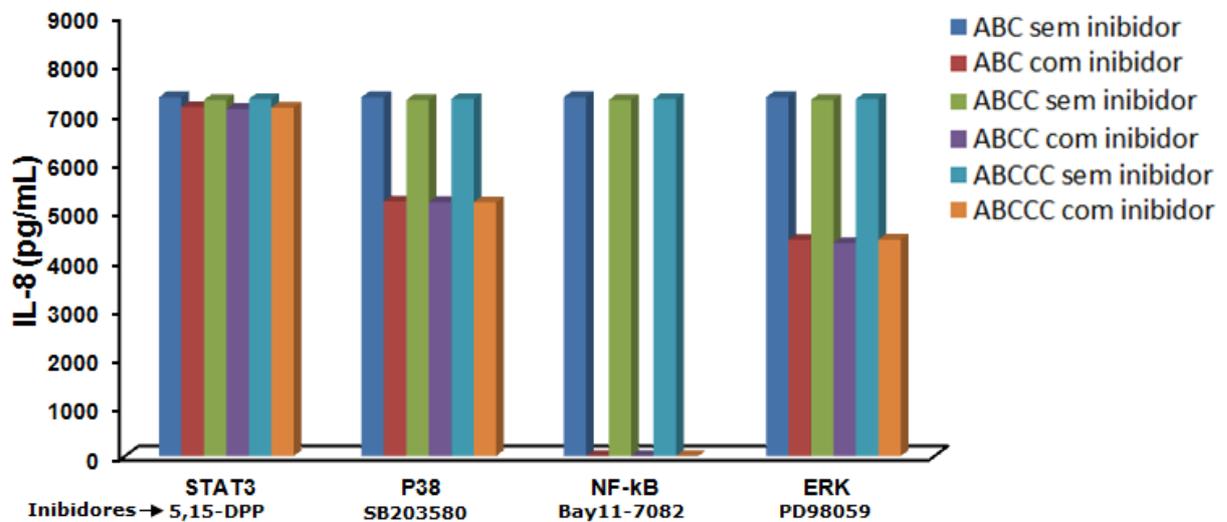


Figura 29: Concentração média de IL-8 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve diferença na produção de IL-8 (167 pg/mL) nos controles (células AGS sem estímulo e células AGS sem estímulo, com DMSO).

A produção de IL-11 foi totalmente inibida na presença do inibidor 5,15-DPP (STAT3) nos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori*. A produção de IL-11 também foi inibida em 73%, 73% e 10% com o inibidores SB203580 (p38), PD98059 (ERK) e Bay11-7082 (NF-κB), respectivamente (Figura 30).

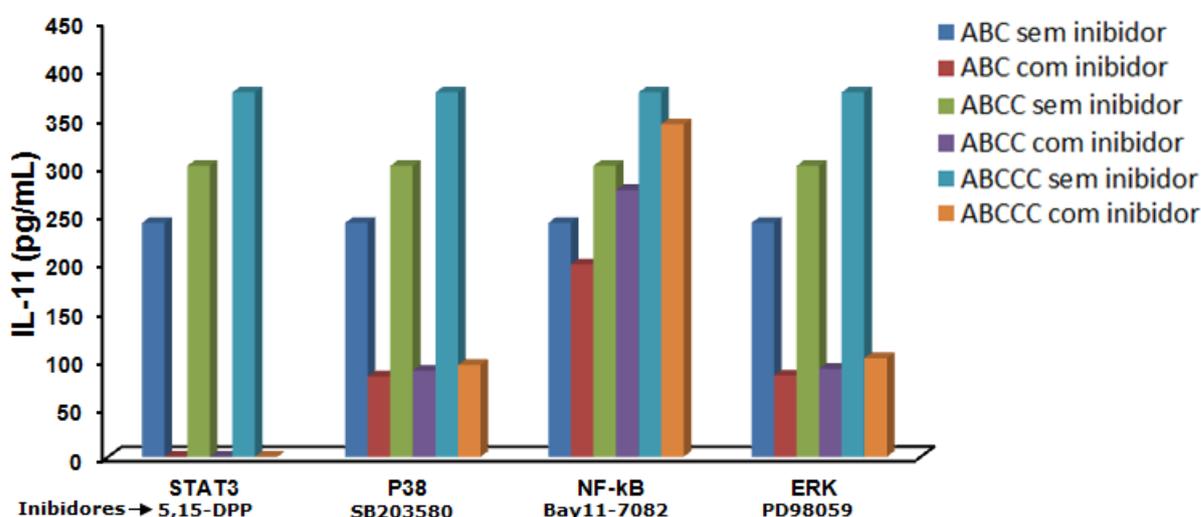


Figura 30: Concentração média de IL-11 (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve diferença na produção de IL-11 (47 pg/mL) nos controles (células AGS sem estímulo e células AGS sem estímulo, com DMSO).

A produção de TGF- β foi inibida em 70% na presença dos inibidores SB203580 (p38) e PD98059 (ERK) e em 46% na presença do inibidor Bay11-7082 (NF- κ B) nos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* (Figura 31).

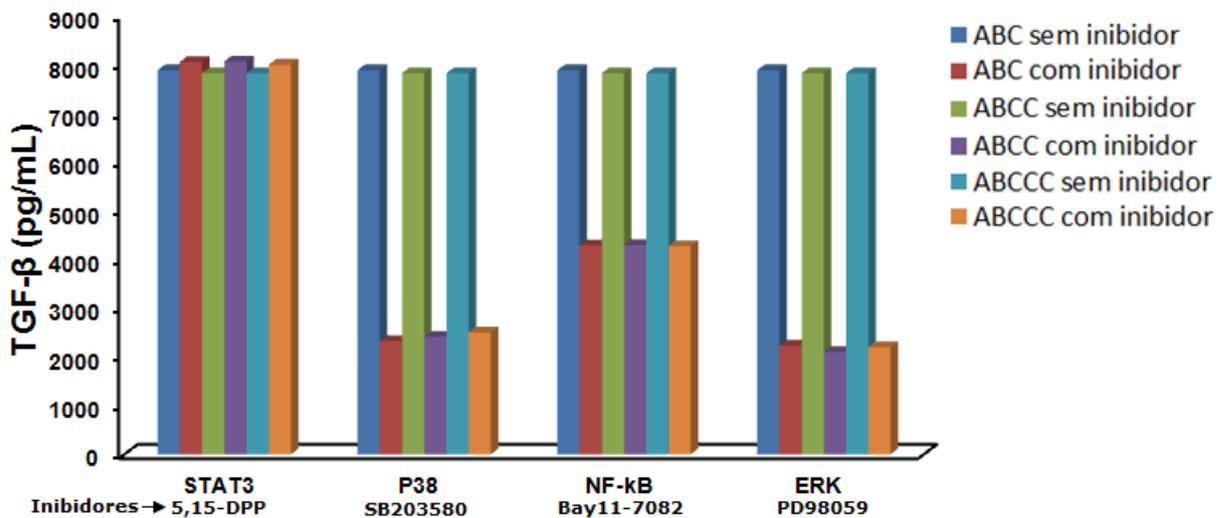


Figura 31: Concentração média de TGF- β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com inibição das vias em estudo. Não houve diferença na produção de TGF- β (2650 pg/mL) nos controles (células AGS sem estímulo e células AGS sem estímulo, com DMSO).

4.8. Quantificação da expressão relativa dos transcritos de mRNA das referidas citocinas nas células mononucleares na presença/ausência de inibidores específicos

A quantificação da expressão relativa de mRNA de IL-1 β foi 83% inibida na presença do inibidor Bay11-7082 (NF-kB), no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. Na presença dos inibidores PP2 (Src), que impede a fosforilação dos sítios EPIYA C, e de NSC-87877 (SHP-2) foi observado o dobro de transcritos de IL-1 β . Aumento discreto de transcritos de IL-1 β com a amostra com um sítio EPIYA C na presença do inibidor PD98059 (ERK) também foi observado (Figura 32).

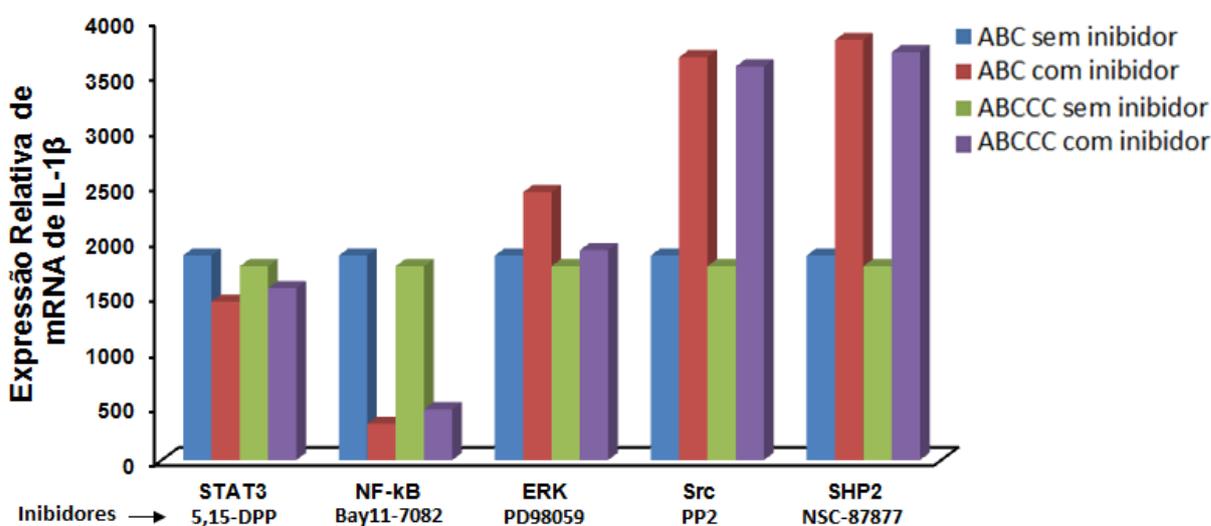


Figura 32: Expressão relativa de mRNA de IL-1 β no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH. Média de três experimentos em triplicata.

A quantificação da expressão relativa de mRNA de IL-6 foi praticamente 100% inibida na presença dos inibidores Bay11-7082 (NF- κ B) e PD98059 (ERK) no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. A expressão relativa de mRNA de IL-6 também foi 90% inibida na presença do inibidor 5,5-DPP (STAT3). Além disso, na presença dos inibidores PP2 (Src) e NSC-87877 (SHP-2) foi observada a diminuição em 70% da expressão de mRNA de IL-6 (Figura 33).

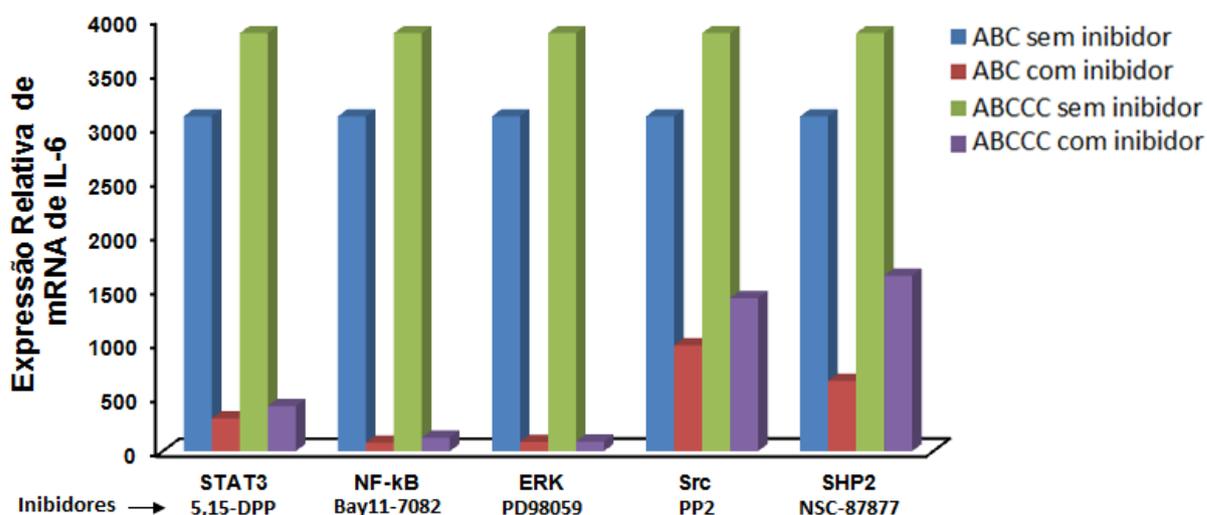


Figura 33: Expressão relativa de mRNA de IL-6 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH. Média de três experimentos em triplicata.

A quantificação da expressão relativa de mRNA de IL-8 foi quase 100% inibida na presença do inibidor Bay11-7082 (NF- κ B) no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. Na presença do inibidor PP2 (Src) e NSC-87877 (SHP-2) foi observado o dobro de transcritos de IL-8. Aumento discreto de transcritos de IL-8 na presença do inibidor PD98059 (ERK) também foi observado (Figura 34).

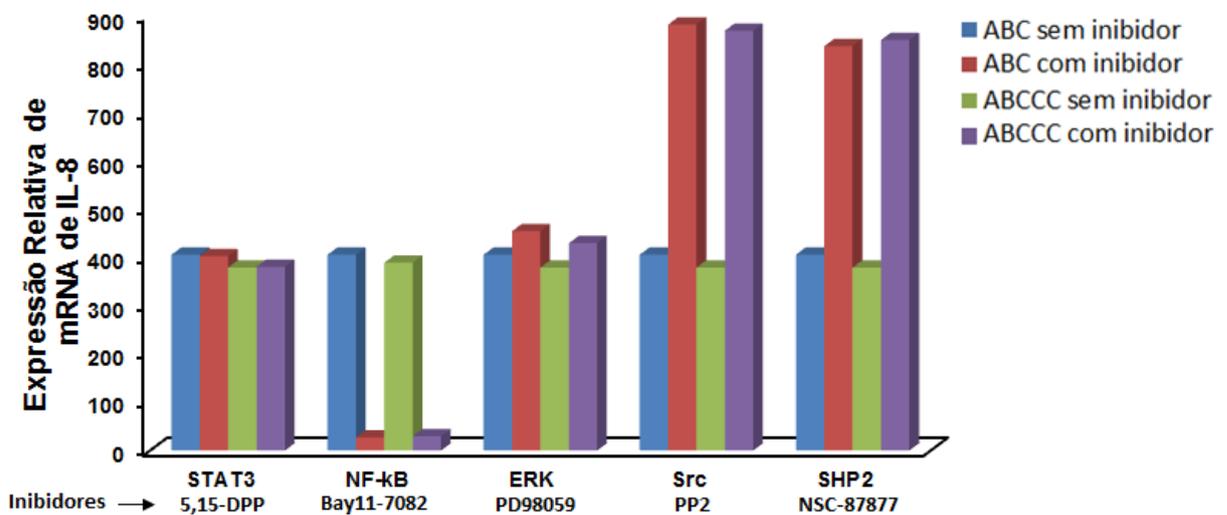


Figura 34: Expressão relativa de mRNA de IL-8 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH. Média de três experimentos em triplicata.

A quantificação da expressão relativa de mRNA de IL-11 foi inibida em 80%, 75% e 40% com os inibidores 5,15-DPP (STAT3), PD98059 (ERK) e Bay11-7082 (NF-κB), respectivamente, no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. A expressão relativa de mRNA de IL-11 foi também 83% inibida na presença dos inibidores PP2 (Src) e NSC-87877 (SHP-2) (Figura 35).

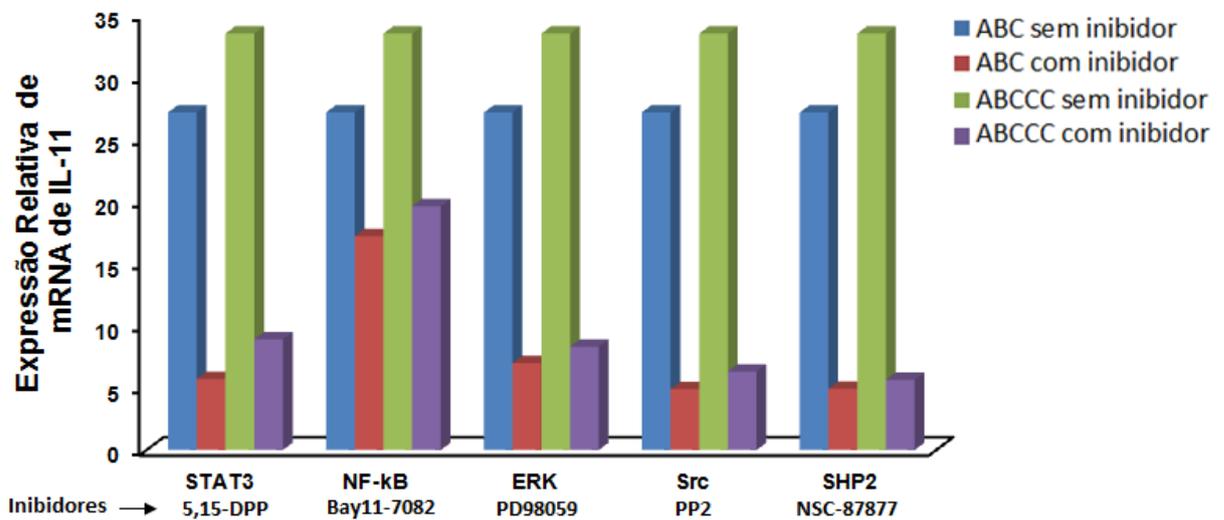


Figura 35: Expressão relativa de mRNA de IL-11 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH. Média de três experimentos em triplicata.

A quantificação da expressão relativa de mRNA de IL-23 foi inibida em 98%, 75% e 65% com os inibidores Bay11-7082 (NF- κ B), PD98059 (ERK) e 5,15-DPP (STAT3), respectivamente, no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. Além disso, a expressão relativa de mRNA de IL-23 também foi 75% inibida na presença dos inibidores de PP2 (Src) e NSC-87877 (SHP-2) (Figura 36).

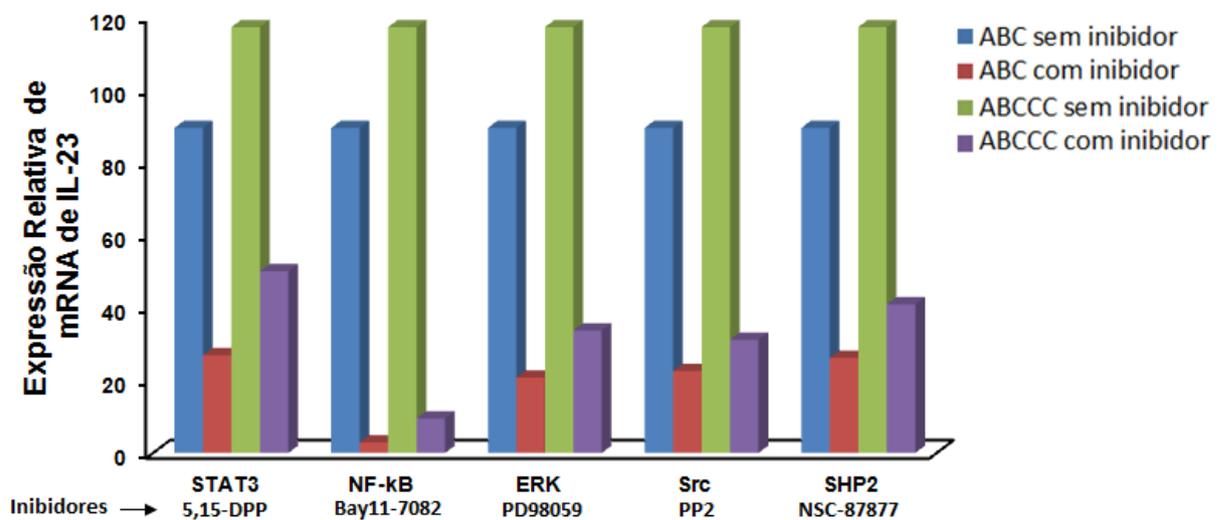


Figura 36: Expressão relativa de mRNA de IL-23 no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH. Média de três experimentos em triplicata.

A quantificação da expressão relativa de mRNA de TGF- β foi 60%, 17% e 8% inibida na presença dos inibidores Bay11-7082 (NF-kB), PD98059 (ERK) e 5,15-DPP (STAT3), respectivamente no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori*. Na presença do inibidor PP2 (Src), que impede a fosforilação dos sítios EPIYA C, foi observado diminuição em 42% da produção de TGF- β . Além disso, a expressão relativa de mRNA de TGF- β também foi 80% inibida na presença do inibidor NSC-87877 (SHP-2) (Figura 37).

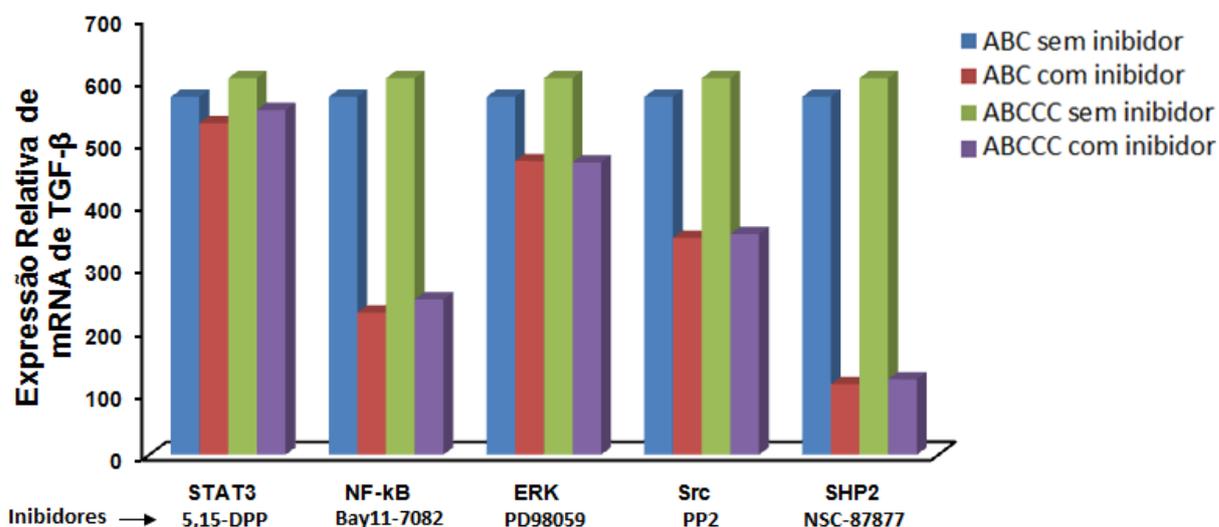


Figura 37: Expressão relativa de mRNA de TGF- β no lisado dos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e com três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com a presença de inibidores específicos. Os dados foram normalizados pela expressão do gene GAPDH. Média de três experimentos.

5. Discussão

Nesse estudo demonstrou-se pela primeira vez e de forma convincente que a proteína CagA é translocada para o interior de células mononucleares do sangue periférico onde é clivada e fosforilada nos sítios EPIYA C, ativando principalmente a via das MAPK cinases, desencadeando o fenótipo de grumos e a transcrição e secreção de citocinas fortemente associadas à carcinogênese gástrica.

O principal fator de virulência do *H. pylori* é o gene *cagA* que codifica uma proteína denominada CagA de 120 a 145 kDa (Ohnishi *et al.*, 2008; Hatakeyama, 2011), associada a risco aumentado de atrofia gástrica, metaplasia intestinal e câncer gástrico (Segal *et al.*, 1999; Odenbreitet *et al.*, 2000; Higashi *et al.*, 2002a; Naito *et al.*, 2006). CagA é considerada a primeira proteína bacteriana com propriedades oncogênicas (Ohnishi *et al.*, 2008; Hatakeyama, 2011). O *cagA* é um dos 28 genes que compõem a ilha de patogenicidade *cag* (PAI), descrita em 1996 por Censini e colaboradores. Além de *cagA*, outros genes são absolutamente essenciais para a formação do SST4 (Fisher *et al.*, 2001; Backert & Selbach, 2008) que é responsável pela translocação da proteína CagA para o interior das células epiteliais gástricas onde os sítios EPIYA são fosforilados no aminoácido tirosina por cinases da família Src ou por cinase Abl das células do hospedeiro (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007; Poppe *et al.*, 2007; Tegtmeyer *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2012). A proteína CagA fosforilada ao se ligar à fosfatase SHP-2 induz mudanças na conformação de SHP-2, desregulando sua atividade de fosfatase, potencializando sua atividade (Hatakeyama, 2014). Como efeitos, ocorrem alterações no citoesqueleto celular e uma série de eventos que aumentam o risco de mutações

genéticas pré-cancerosas (Feng *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1998; Backert *et al.*, 2010b; Tegtmeyer *et al.*, 2011) decorrentes da ativação das vias de sinalização, como a MAPK-ERK1/2 e JAK/STAT3, que participam no controle de atividades e funções celulares vitais como apoptose, proliferação, morfogênese e motilidade celular (Neel *et al.*, 2003; Meloche *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). Embora haja um grande número de trabalhos avaliando efeitos da proteína CagA fosforilada em células epiteliais, como células AGS, não há estudos relativos à infecção por amostras de *H. pylori* *cagA*-positivas com diferentes números de sítios de fosforilação EPIYA C em células especializadas na resposta imunológica. Deve-se ressaltar também que a indução de citocinas em função do número de sítios EPIYA C, exceto IL-8, não foi ainda investigada em sistemas celulares “*in vitro*”.

Um resultado “*in vivo*” importante obtido pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que a concentração de citocinas representativas da resposta Th17 (IL-6, IL-17A, IL-23 e TGF- β), bem como de IL-11, está aumentada na mucosa gástrica de pacientes com câncer gástrico infectados com amostras de *H. pylori* contendo mais de um sítio EPIYA C quando comparados com pacientes colonizados por amostras com um ou nenhum sítio de fosforilação EPIYA C (Prates, 2012). Esse é um resultado relevante visto que se tem atribuído participação importante das células Th17 na carcinogênese (Chen *et al.*, 2006). Portanto, foi objetivo desse estudo confirmar “*in vitro*”, em condições controladas, os resultados observados “*in vivo*”.

Com o objetivo de mimetizar o epitélio gástrico infectado com *H. pylori*, onde além de células epiteliais há um rico infiltrado inflamatório, nesse estudo foram usados dois sistemas celulares; células mononucleares do sangue periférico, compostas principalmente por monócitos e linfócitos, e células da mucosa gástrica (células AGS).

Inicialmente foi necessário obter amostras de *H. pylori* clonais (de um único paciente) com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C para estimularem “*in vitro*” os sistemas celulares. Cepas de *H. pylori* isoladas de um único indivíduo são usualmente clonais. Pequenas variações podem ocorrer devido à inserção, deleção ou recombinação homóloga, que; entretanto, não podem exceder a 6% de diferença para serem consideradas clonais. A isogenia das cepas obtidas foi confirmada por vários métodos: os padrões obtidos nas reações de RAPD-PCR foram idênticos; da mesma forma, as sequências de cinco genes da governança e das regiões i/d do gene de virulência *vacA* foram idênticas; a presença dos genes responsáveis pela função do SST4 foi detectada nos três isolados e diferentes mosaicos em outros genes de virulência (*iceA* e *babA*) não foram observados nas três cepas obtidas.

Uma vez confirmado o grau elevado de identidade entre as cepas que diferiram no número de sítios de fosforilação EPIYA C, demonstrou-se que a proteína CagA das três cepas foi translocada e fosforilada tanto no citoplasma das células mononucleares como das células AGS, à semelhança do observado na literatura em células THP-1 (Odenbreit *et al.*, 2001) e em células AGS (Moese *et al.*, 2004). Nas células mononucleares de sangue periférico, foi observada quebra da proteína CagA em 2 fragmentos, como descrito em linhagens celulares fagocíticas THP-1, U937 e JoskM (Moese *et al.*, 2001; Odenbreit *et al.*, 2001), mas não em células epiteliais, exceto a linhagem MKN-45 (Bauer *et al.*, 2005). Os fragmentos correspondentes à região carboxi-terminal variaram de tamanho, com pesos moleculares em torno de 35, 38 e 40 kDa e aumento da intensidade de fosforilação de acordo com o número de sítios EPIYA C das amostras. Pouco se conhece a respeito da protease envolvida na clivagem da proteína CagA; mas sabe-se que não está presente, ou está na forma inativa, na célula epitelial AGS (Odenbreit *et al.*,



2001). Há evidências de que se assemelha à protease V8 de *Staphylococcus aureus*, visto que essa protease foi capaz de clivar “*in vitro*” a proteína CagA exatamente entre as regiões amino e carboxi-terminais (Hayashi *et al.*, 2012). Os efeitos da clivagem não são bem conhecidos; entretanto, como as células especializadas parecem alvos naturais para a proteína CagA, no interior das quais é processada e fosforilada; é de se supor que tenha função biológica nessas células. Vale ressaltar, que o primeiro fragmento de 200 aminoácidos da região amino-terminal da proteína CagA inibe as respostas celulares induzidas pela fosforilação dos sítios EPIYA C, como o fenótipo “Beija-flor” (Pelz *et al.*, 2011). É válido supor; portanto, que a clivagem possa impedir o controle negativo exercido pela porção amino-terminal na região carboxi-terminal da proteína CagA. Em consonância com a hipótese, nesse estudo, a ativação das vias de sinalização dependentes do número de sítios de fosforilação EPIYA C foi vista se prolongar por período de tempo maior nas células mononucleares (48 horas, dados não mostrados) que nas células AGS. Outro ponto relevante, observado nas células mononucleares, foi a formação de grumos celulares que teve início depois de uma hora de estímulo aumentando em intensidade em relação ao tempo. O fenômeno não foi visto nos cultivos de células sem estímulos. A formação de grumos, já descrita nas células THP-1 (Moese *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2005), é totalmente dependente da ilha de patogenicidade *cag* (PAI) e do SST4 funcionante, mas não dos sítios de fosforilação EPIYA C, à semelhança do observado com a secreção de IL-8. Depende da ativação de NF-κB que induz aumento, na superfície celular, da expressão e exposição da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). ICAM-1 interage com a integrina LFA-1 (antígeno-1 associada à função linfocitária) das células mononucleares, resultando no fenômeno de agregação celular (Moese *et al.*, 2002).

Os resultados desse estudo, quanto às células AGS, estão de acordo com dados da literatura. O peso molecular dos fragmentos fosforilados no interior das células variou de acordo com o número de sítios EPIYA C entre 120–140 kDa (Hatakeyama, 2014). Ainda, foi observado o fenótipo “Beija-flor”, bem descrito nas células AGS, com intensidade variável, com base no número de sítio EPIYA C. O fenômeno depende da fosfatase SHP-2 ativada pela proteína CagA fosforilada que também defosforila a cinase FAK (Focal Adhesion Kinase) que regula a forma e a motilidade celular. Nas células mononucleares não ocorre essa defosforilação (Bauer *et al.*, 2005), o que pode explicar o fato de não adquirirem o fenótipo alongado semelhante à “Beija-flor”.

Como há diferenças individuais na resposta imunológica, e considerando que a infecção pelo *H. pylori* sabidamente modula negativamente a resposta imunológica (Cinque *et al.*, 2002), foram selecionados cinco indivíduos saudáveis e *H. pylori*-negativos como doadores de células mononucleares. As células mononucleares de todos os doadores produziram as citocinas investigadas depois do estímulo com as cepas bacterianas. Embora as concentrações das citocinas tenham variado de doador para doador, o padrão foi idêntico em todos. Assim, as células mononucleares do doador que responderam com menor concentração de uma determinada citocina também responderam com baixas concentrações das demais citocinas avaliadas. Ao contrário, naqueles cocultivos com maior concentração de uma determinada citocina, as concentrações das demais citocinas também foram elevadas. As diferenças decorrentes do tipo de amostra usada como estímulo foram observadas em todos cocultivos, independentemente do doador.

Inicialmente foram constatadas diferenças entre as duas linhagens celulares em respeito à secreção das citocinas sob os estímulos usados. As células AGS sob

estímulo secretaram somente IL-1 β , IL-8, IL-11 e TGF- β , ao passo que as células mononucleares secretaram todas as citocinas estudadas. A incapacidade de as células AGS secretarem IL-6, IL-17A e IL-23 pode ser explicada pelo fato de que células epiteliais da mucosa gástrica não são células especializadas da resposta imunológica, não apresentando; entre outros, todos os receptores de superfície celular capazes de reconhecer estímulos específicos para a produção das demais citocinas estudadas. Vale ressaltar que IL-6 e IL-23 são importantes citocinas da resposta inata, secretadas por células especializadas como monócitos e macrófagos e que IL-17A e IL-17F, consideradas as principais citocinas pró-inflamatórias das células da resposta adaptativa CD4 Th17 são também produzidas por células da imunidade inata (Jin & Dong, 2013) e por neutrófilos (Rocha *et al.*, 2014).

Avaliou-se a seguir o impacto do “*status*” *cagA* na secreção das citocinas, pela comparação dos resultados dos estímulos com a amostra *cagA*-negativa (Tx30A) e a amostra *cagA*-positiva com um sítio de fosforilação EPIYA C. Houve aumento de produção de acordo com o “*status*” *cagA*-positivo nos cocultivos com células AGS somente da IL-8. Nas células AGS, a via final foi vista ser NF-kB, mas houve 34% de inibição de transcrição e secreção da citocina quando a via ERK1/2 foi inibida, indicando que parte da ativação de NF-kB pode ter sido ativada via ERK1/2. Nas células mononucleares, a produção de IL-8 foi vista ser totalmente dependente de NF-kB. A participação direta da proteína CagA no estímulo de NF-kB e IL-8 foi questionada por muito tempo, mas Brandt e colaboradores (2005) demonstraram que o fenômeno ocorre via ras-raf-Mek-ERK-NF-kB, independentemente de SHP-2 e c-met. Já o mecanismo canônico é atribuído à integridade do SST4 e ao gene *cagE* (Backert *et al.*, 2010b). Nesse estudo foi demonstrada nas três cepas a presença dos genes da ilha *cag* (PAI) que são



relevantes na formação do SST4, e que o sistema é funcional. Também foi visto que a ativação da IL-8 se deu independentemente da fosforilação dos sítios EPIYA C, pois não foi constatado aumento progressivo da citocina com base no número de sítios. Esses resultados foram confirmados pela dosagem de NF-kBp65 fosforilado por ELISA no sobrenadante dos cocultivos. A concentração de NF-kBp65 fosforilado foi significativamente maior nos estímulos com as amostras isogênicas que com a amostra *cagA*-negativa (Tx30A), mas nenhuma diferença foi vista em função do número de sítios de fosforilação EPIYA C (Figura suplementar 2). Vale ressaltar ainda que os resultados desse estudo indicam que a fosforilação da proteína CagA e ativação de SHP-2 exercem controle negativo sobre a transcrição gênica de IL-8, que dobrou em quantidade na presença dos inibidores PP2 (Src) e NSC-87877 (SHP-2).

No que se refere à citocina IL-1 β , sabe-se que a principal via de ativação é NF-kB (Kim *et al.*, 2013), como visto nesse estudo, apesar de ainda não estarem totalmente esclarecidos quais componentes da bactéria regulam a produção da citocina em resposta à infecção. É possível que a ativação de IL-1 β se dê por outros componentes bacterianos, como LPS/lipoproteínas e peptidoglicano, agonistas de receptores do tipo TOLL e NOD. Outro resultado digno de nota demonstra que na presença dos inibidores Src e/ ou SHP-2 a transcrição de IL-1 β foi dobrada, confirmando que a produção da citocina não depende dos sítios de fosforilação EPIYA C, tendo sido inclusive inibida na presença dos sítios. A transcrição bem como a secreção de IL-1 β também aumentou na presença do inibidor da via ERK1/2, nos dois casos mais intensamente com a cepa de *H. pylori* com um sítio EPIYA C. Essa inibição exercida pela via ERK1/2 ocorre antes da transcrição gênica da IL-1 β . Um mecanismo possível para explicar o achado seria a regulação negativa

de SHP-2 sobre PI3K (Eulenfeld *et al.*, 2012) impedindo a ativação de AKT que é uma das vias alternativas para a ativação de NF- κ B. Portanto, investigou-se a seguir o efeito da inibição de AKT sobre a produção de IL-1 β . Observou-se diminuição da secreção (Figura suplementar 3) e da transcrição de IL-1 β em 50% nos cocultivos com células mononucleares e 30% nos cocultivos com células AGS. Assim, parece que os efeitos se devem parcialmente à inibição de AKT (em nível de transcrição) e inibições por outras vias em nível pós-transcricional.

O fato de não terem sido observadas diferenças na produção de IL-11 e TGF- β , quando foram comparadas as amostras *cagA*-negativa e *cagA*-positiva com apenas um sítio EPIYA C, mas ter ocorrido aumento proporcional ao número de sítios EPIYA C, indica que a produção dessas citocinas depende do estímulo de vias dependentes e independentes daquelas que são ativadas pela fosforilação dos sítios EPIYA C, como será discutido mais a frente.

Embora vários trabalhos demonstrem que a concentração de citocinas e quimiocinas está aumentada na mucosa gástrica de indivíduos infectados por amostras de *H. pylori cagA*-positivas, as vias de sinalização que levam à produção dessas citocinas/quimiocinas em células mononucleares não estimuladas e estimuladas com amostras de *H. pylori* com diferentes números de sítios EPIYA C não tinham sido avaliadas até então.

Passou-se, então, a investigar o efeito do número de sítios EPIYA C na secreção das citocinas bem como as vias de sinalização envolvidas. A secreção de todas as citocinas pelas células mononucleares, exceto IL-1 β e IL-8, aumentou progressivamente de acordo com o número de sítios EPIYA C. Porque a via principal de transcrição de IL-1 β e IL-8 é o NF- κ B, que não é transcrito pela ativação de tirosina mas de um resíduo de serina, o resultado observado era esperado.

Em conjunto, os resultados desse estudo demonstraram a importância da via das MAP cinases na transcrição das demais citocinas, decorrente da interação do CagA fosforilado com a fosfatase SHP-2. Ressalta-se que o nível de fosforilação da proteína CagA, tanto nas células AGS quanto nas células mononucleares, aumentou de acordo com o número de sítios EPIYA C e foi mantido por todo período de avaliação (24 horas). Vale ressaltar que nos cocultivos com amostras de *H. pylori* com três sítios de fosforilação EPIYA C, a ativação foi vista ser quase o dobro da observada nos cocultivos estimulados com amostra com um sítio EPIYA C nos tempos de 4, 6, 12 e 24 horas. Como a ligação entre SHP-2 e a proteína CagA fosforilada com mais de um sítio EPIYA C é mais forte, o aumento progressivo observado tanto na transcrição como na dosagem das citocinas deve-se a essa maior interação, com consequente maior ativação da via das MAP cinases.

A fosfatase SHP-2 é uma molécula adaptadora que pode ter efeito tanto positivo quanto negativo na regulação de diferentes vias de sinalização, como MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT3. Recentemente, foi sugerido por Howlett e colaboradores (2009) que na infecção por cepa *cagA*-positiva de *H. pylori* há um desequilíbrio no controle da via JAK/STAT3 pela via ERK1/2 em decorrência da ligação de SHP-2 à proteína CagA fosforilada. De acordo com os autores, SHP-2 ligada à proteína CagA perderia a propriedade de inibir a ativação de STAT3, ocorrendo como consequência super ativação das duas vias, hipótese que diverge totalmente do conceito consagrado de regulação recíproca entre as duas vias que são completamente integradas.

Nesse estudo demonstrou-se que a fosfatase SHP-2, mesmo ligada à proteína CagA, não perde a capacidade de inibir STAT3. A ativação da via STAT3 foi inversamente proporcional ao número de sítios de fosforilação EPIYA C,

independentemente do sistema celular. A maior ativação ocorreu nos cocultivos com a cepa de *H. pylori* com um sítio EPIYA C quando comparada com a obtida com três sítios EPIYA C, resultado inverso ao observado quando se avaliou a via ERK1/2. Para confirmar esse resultado, avaliou-se a inibição da fosforilação dos sítios EPIYA C com o inibidor PP2 (Src). Houve completa inibição de ERK1/2 e consequente ativação de STAT3, sempre mantendo o mesmo padrão; maior sob estímulo da cepa com um sítio de fosforilação EPIYA C. Resultado idêntico foi visto quando a via ERK1/2 foi bloqueada pelo inibidor PD98059 (ERK). Embora confirmada a regulação recíproca entre as duas vias, vale salientar que a proteína CagA fosforilada, ao se ligar à fosfatase SHP-2, desorganiza as duas vias, que se mantêm ativadas, ainda que em intensidades diferentes, por período de tempo prolongado: ERK1/2 na dependência dos sítios de fosforilação EPIYA C e STAT3 inversamente proporcional ao número de sítios de fosforilação EPIYA C.

A produção de IL-6, IL-11, IL-17A e IL-23 foi vista ser depende da fosforilação da proteína CagA, aumentar de acordo com o número de sítios EPIYA C da proteína, e também depender mutuamente das vias MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT3. Para investigar se a ativação das vias era dependente de JAK, foram feitos experimentos usando o inibidor SD-1029. Foi demonstrada completa inibição das citocinas IL-6, IL-11, IL-17A e quase completa inibição de IL-23 (Figura suplementar 4). É importante registrar; entretanto, que a inibição da via NF- κ B foi seguida de 80%, 50% e 100% de inibição da expressão de IL-6, IL-11 e IL-23, respectivamente. IL-6 e IL-11 pertencem a um grupo de moléculas que estimulam o receptor da glicoproteína gp130, distribuído na superfície de uma variedade de células, responsável pela ativação das vias SHP-2/MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT3. Como as células sem estímulo não secretaram espontaneamente essas citocinas a ativação

inicial das vias pode ter ocorrido pela produção precoce de IL-6 ou IL-11 estimulada pela via NF-kB. De fato com 24 horas de incubação não havia diferença na secreção de IL-6 e IL-11 quanto aos sítios de fosforilação EPIYA C e a concentração de IL-6 diminuiu com 48 horas de incubação, quando comparada com os resultados de 24 horas de incubação, indicando consumo da citocina.

Um achado interessante do estudo refere-se à produção de IL-17A que só foi observada nos sobrenadantes dos cocultivos estimulados com amostras contendo dois ou três sítios EPIYA C. Ainda, foi visto que IL-17A é totalmente dependente da ativação das vias JAK/STAT3 e MAP cinases. STAT3 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação das células Th17. Esta via está mais ativada nos estímulos com amostras com um sítio de fosforilação EPIYA C. Entretanto, a via das MAP cinases é também essencial para a transcrição e estabilização pós transcricional de citocinas envolvidas na diferenciação de Th17 como IL-6, IL-23 e TGF- β . Vale ressaltar que ERK1/2 e p38 estão mais ativadas nos cocultivos com amostras contendo dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C, o que explicaria o fato de não ter havido secreção de IL-17 sob o estímulo com amostras contendo um só sítio de fosforilação EPIYA C.

Nas células mononucleares a transcrição e secreção do TGF- β dependem da ativação de NF-kB e de ERK1/2, valendo ressaltar, com base nos resultados de inibição de transcrição gênica, a relevância da proteína CagA fosforilada e de SHP-2 na ativação da via ERK1/2. Resultados semelhantes foram vistos nas células AGS; entretanto, com participações diferentes das MAP cinases e NF-kB bem como a falta de associação com o número de sítios de fosforilação EPIYA C, evidenciando as particularidades no comportamento dos dois sistemas celulares estimulados.

Concluindo, foi demonstrado pela primeira vez que amostras de *H. pylori* secretoras da proteína CagA com diferentes números de sítios de fosforilação EPIYA C são injetadas no citoplasma de células da resposta imunológica onde são clivadas, fosforiladas e induzem a secreção de citocinas associadas à resposta Th17 (IL-6, IL-17A, IL-23 e TGF- β) e IL-11 proporcionalmente ao número de sítios EPIYA C, à semelhança do observado “*in vivo*”.

6. Resumos/Conclusões

Os resultados desse estudo demonstraram que:

- A proteína CagA de amostras de *H. pylori* cagA-positivas é translocada para o interior do citoplasma de células específicas da resposta imunológica onde é clivada e fosforilada.
- A fosforilação dos sítios EPIYA C da proteína CagA de amostras isogênicas de *H. pylori* desencadeia a ativação das vias ERK1/2 e p38 induzindo o fenótipo “Beija-flor” nas células AGS, bem como a transcrição e secreção de citocinas relevantes na carcinogênese gástrica.
- A ativação de STAT3 foi vista ser inversamente proporcional ao número de sítios de fosforilação EPIYA C. Inicialmente a via STAT3 é ativada pelas citocinas IL-6 ou IL-11 induzidas precocemente sob a ação de outros estímulos bacterianos (cagE). A via se mantém ativada por todo período avaliado, (embora sob constante supressão da via ERK1/2) pela produção de IL-6 ou IL-11 dependente da via ERK1/2 ativada pelos sítios de fosforilação EPIYA C.
- A ativação de outras vias de sinalização não dependentes dos sítios de fosforilação desencadeia o fenótipo de grupos celulares nas células mononucleares.
- A secreção das citocinas IL-6, IL-11, IL-17A, IL-23 e TGF- β por células mononucleares do sangue periférico e IL-11 por células AGS estimuladas “*in vitro*” com amostras isogênicas de *H. pylori* foi proporcional ao número de sítios de fosforilação EPIYA C da amostra. Por outro lado, a produção de IL-1 β e IL-8 pelas células mononucleares e IL-1 β , IL-8 e TGF- β pelas células AGS foi vista ser independente do número de sítios de fosforilação EPIYA C das amostras usadas como estímulo “*in vitro*”.

- Em adição aos efeitos, já conhecidos, induzidos nas células epiteliais gástricas, quando estimuladas com amostras de *H. pylori* contendo sítios de fosforilação EPIYA C, como proliferação, morfogênese e motilidade celular, importantes na transformação maligna gástrica, somam-se os achados desse estudo, demonstrando a participação de células da resposta imunológica quando estimuladas, na secreção de citocinas associadas à carcinogênese.

7. Referências bibliográficas

Achtman M, Azuma T, Berg DE, *et al.* Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* 1999; 32:459-70.

Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, *et al.* DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1992; 19:5137-42.

Argent RH, Kidd HM, Owen RJ, *et al.* Determination and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2004; 127:514-23.

Argent RH, Thomas RJ, Aviles-Jimenez F, *et al.* Toxigenic *Helicobacter pylori* infection precedes gastric hypochlorhydria in cancer relatives, and *H. pylori* virulence evolves in these families. *Clin Cancer* 2008; 14:2227-35.

Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International Immunology* 2009; 21:489-98.

Backert S, Ziska E, Brinkmann V, *et al.* Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2000; 2:155-64.

Backert S, Moese S, Selbach M, *et al.* Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001; 42:631-44.

Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2008; 10:1573-81.

Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* 2010a; 15:163-76.

Backert S, Naumann M. What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 2010b; 18:479-86.

Bardwell AJ, Frankson E, Bardwell L. Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *Biol Chem* 2009; 284:13165-73.

Batista SA. Avaliação do padrão e número de sítios de fosforilação (EPIYA) da proteína CagA de *H. pylori* e risco de carcinoma gástrico e úlcera duodenal. Dissertação de mestrado, 2010. 93 páginas.

Batista SA, Rocha GA, Rocha AMC, *et al.* Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiology* 2011; 11:61.

Bauer B, Moese S, Bartfeld S, Meyer TF, Selbach M. Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 2005; 73:4643-52.

Bhuiyan TR, Islam MM, Uddin T, Chowdhury MI, Janzon A, Adamsson J, Lundin SB, Qadri F, Lundgren A. Th1 and Th17 responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi infants, children and adults. *PLoS One.* 2014; 9:e93943.

Bradford MM. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Braga AB, Fialho AM, Rodrigues MN, *et al.* *Helicobacter pylori* colonization among children up to 6 years: results of a community-based study from northeastern Brazil. *J Trop Pediatr* 2007; 53:393-97.

Brandt S, Kwok T, Hartig R, *et al.* NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:9300-05.

Brenner H, Arndt V, Stürmer T, *et al.* Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. Cancer 2000; 88:274-79.

Bromberg JF. Activation of STAT proteins and growth control. Bioessays 2001; 23:161-69.

Censini S, Lange C, Xiang Z, *et al.* *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes types I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:14648-53.

Chang YW, Han YS, Lee DK, *et al.* Role of *Helicobacter pylori* infection among offspring or siblings of gastric cancer patients. Int J Cancer 2002, 101:469-74.

Chen B, Bronson RT, Klamann LD, *et al.* Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis. Nat Genet 2000; 24:296-99.

Chen Z, Laurence A, Kanno Y, *et al.* Selective regulatory function of SOCs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:8137-42.

Chen J, Wang J, Lin L, *et al.* Inhibition of STAT3 signaling pathway by nitidine chloride suppressed the angiogenesis and growth of human gastric cancer. Mol Cancer Ther 2012; 11:277-87.

Cinque SM, Queiroz DM, Rocha GA, Soares TF, Nogueira AM, Faria AM, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R. Cellular immune responses in *Helicobacter heilmannii* infection: evaluation of the role of the host and the bacterium. Dig Dis Sci. 2002; 47:823-30.

Covacci A, Censini S, Bugnoli M, *et al.* Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated to cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5791-95.

Covacci A, Telford JL, Giudice GD, *et al.* *Helicobacter pylori* *cagA* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284:1328-39.

Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv Intern Med* 1996; 41: 85-117.

Crabtree JE, Farmery SM, Lindley IJ, *et al.* CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J Clin Pathol* 1994; 44:768-71.

Cunha RP, Alves FP, Rocha AMC, *et al.* Prevalence and risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in native population from Brazilian Western Amazon. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2003; 97:382-86.

Dauer DJ, Ferraro B, Song L, *et al.* Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene* 2005; 24:3397-408.

de carvalho LCC, Rocha GA, Rocha AMC, *et al.* Evaluation of (¹³C) urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3334-35.

Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:720-41.

El-Omar EM, Oien K, Murray LS, *et al.* Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118:22-30.

El-Omar EM. The importance of interleukin 1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48:743-47.

Enslin H, Davis RJ. Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell* 2001; 93:5-14.

Eulenfeld R, Dittrich A, Khouri C, *et al.* Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol* 2012; 91:486-95.

Feng G, Hui C, Pawson T. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* 1993; 259:1607-11.

Ferrero RL. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori*. *Mol Immunol* 2005; 42:879-85.

Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, *et al.* *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma in associated disease. *J Nat Cancer Inst* 2002; 94:1680-87.

Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, *et al.* Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 2001; 42:1337-48.

Franco AT, Johnston E, Krishna U, *et al.* Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res* 2008; 68:379-87.

Fujioka T, Honda S, Tokieda M. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma in animal models. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:55-59.

Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, *et al.* Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol* 1985; 19:257-67.

Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. *Eur J Microbiol* 1990; 9:1-13.

Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* (suppl) 1989; 96:615-25.

Hadari YR, Kouhara H, Lax I, *et al.* Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3966-73.

Hamilton-Miller JM. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Inter J Antimicrobiol Agents* 2003; 4 :360-66.

Hashimoto M, Hirota K, Yoshitomi H, *et al.* Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2010; 207:1135-43.

Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96:835-43.

Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2009; 44:239-48.

Hatakeyama M. Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cancer Sci.* 2011; 102:36-43.

Hayashi T, Senda M, Morohashi H, Higashi H, Horio M, Kashiba Y, Nagase L, Sasaya D, Shimizu T, Venugopalan N, Kumeta H, Noda NN, Inagaki F, Senda T, Hatakeyama M. Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe.* 2012; 12:20-33.

Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, *et al.* Biological activity of the *Helicobacter* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proced Natl Acad Sci USA* 2002a; 99:14428-33.

Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, *et al.* SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002b; 295:683-86.

Howlett M, Menheniott TR, Judd LM, *et al.* Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 11:1623-33.

Howlett M, Chalinor HV, Buzzelli JN, *et al.* IL-11 is a parietal cell cytokine that induces atrophic gastritis. *Gut* 2012; 61:1398-409.

IARC - International Agency for Research of Cancer. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, IARC/WHO 1994; 61:177-241.

Ilver D, Arnqvist A, Frick I, *et al.* *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279:373-77.

Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2014). Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp>> acesso em: 23 maio 2014.

Jackson CB, Judd LM, Menheniott TR, *et al.* Augmented gp130-mediated cytokine signalling accompanies human gastric cancer progression. *J Pathol* 2007; 213:140-51.

Jackson CB, Giraud AS. STAT3 as a prognostic marker in human gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24:505-07

Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Microbes & Infections* 2013; 2.

Judd LM, Alderman BM, Howlett M, *et al.* Gastric cancer development in mice lacking the SHP2 binding site on the IL-6 family co-receptor gp130. *Gastroenterology* 2004; 126:196-207.

Kanda N, Seno H, Konda Y, *et al.* STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 2004; 23:4921-29.

Katagiri M, Asaka M, Kobayashi M, *et al.* Increased cytokine production by gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25:211-14.

Kawaguchi M, Akagi M, Gray MJ, *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1beta. *Surgery* 2004; 136:686-92.

Kim DJ, Park JH, Franchi L, Backert S, Núñez G. The Cag pathogenicity island and interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 regulate IL-1 β production in *Helicobacter pylori* infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 2013; 43:2650-58.

Kim SY, Lee YC, Kim HK, *et al.* *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cell Microbiol* 2006; 8:97-106.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351:289-305.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:485-517.

Lamb A, Yang XD, Tsang YH, *et al.* *Helicobacter pylori* CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination. *EMBO Rep* 2009; 10:1242-49.

Lay V, Yap J, Sonderegger S, *et al.* Interleukin 11 regulates endometrial cancer cell adhesion and migration via STAT3. *Int J Oncol* 2012; 41:759-64.

Lee IO, Kim JH, Choi YJ, *et al.* *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2010; 285:16042-50.

Lin MT, Juan CY, Chang KJ, *et al.* IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis* 2001; 22:1947-53.

Lin WC, Tsai HF, Kuo SH, *et al.* Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res* 2010; 1514:5740-48.

Lindholm C, Quiding-Jarbring M, Lonroth H, *et al.* Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun* 1998; 66:5564-71.

Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010; 140:845-58.

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

Mansour-Ghanaei F, Joukar F, Baghaei SM, *et al.* Gastric precancerous lesions in first degree relatives of patients with known gastric cancer: a cross-sectional prospective study in Guilan Province, north of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13:1779-82.

Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 4:1273-75.

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, *et al.* TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007; 8:1390-97.

Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007; 26:3227-39.

Merchant JL. What lurks beneath: IL-11, via Stat3, promotes inflammation-associated gastric tumorigenesis. *J Clin Invest* 2008; 118:1628-31.

Moese S, Selbach M, Zimny-Arndt U, *et al.* Identification of a tyrosine-phosphorylated 35 kDa carboxy-terminal fragment (p35CagA) of the *Helicobacter pylori* CagA protein in phagocytic cells: processing or breakage? *Proteomics* 2001; 1:618-29.

Moese S, Selbach M, Meyer TF, Backert S. *cag+* *Helicobacter pylori* induces homotypic aggregation of macrophage-like cells by up-regulation and recruitment of intracellular adhesion molecule 1 to the cell surface. *Infect Immun* 2002; 70:4687-91.

Moese S, Selbach M, Kwok T, Brinkmann V, König W, Meyer TF, Backert S. *Helicobacter pylori* Induces AGS Cell Motility and Elongation via Independent Signaling Pathways. *Infect Immun*. 2004; 72:3646-49.

Motiwala T, Jacob ST: Role of protein tyrosine phosphatases in cancer. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2006; 81:297-329.

Motta CR, Cunha MP, Queiroz DM, *et al.* Gastric precancerous lesions and *Helicobacter pylori* infection in relatives of gastric cancer patients from Northeastern Brazil. *Digestion* 2008; 78:3-8.

Mueller D, Tegtmeyer N, Brandt S, *et al.* c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Invest* 2012; 122:1553-66.

Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, *et al.* Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 2006; 130:1181-90.

Nakayama T, Yoshizaki A, Izumida S, *et al.* Expression of interleukin-11 (IL-11) and IL-11 receptor alpha in human gastric carcinoma and IL-11 upregulates the invasive activity of human gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007; 30:825-33.

Necula LG, Chivu-Economescu M, Stanciulescu EL, *et al.* IL-6 and IL-11 as markers for tumor aggressiveness and prognosis in gastric adenocarcinoma patients without mutations in Gp130 subunits. *J Gastrointestin Liver Dis* 2012; 21:23-29.

Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem* 2003; 28:284-93.

Nishihara M, Ogura H, Ueda N, *et al.* IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol* 2007;19:695-702.

Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, *et al.* Translocation of *Helicobacter pylori* *cagA* into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287:1497-500.

Odenbreit S, Gebert B, Püls J, *et al.* Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol* 2001; 3:21-31.

Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:1003-08.

Oliveira A, Rocha GA, Queiroz DMM, *et al.* Evaluation of ELISA for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. *J Pediatr Gast Nutr* 1999; 2:157-61.

Ostman A, Hellberg C, Böhmer FD: Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:307-20.

Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, *et al.* Presence of terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats. *PLoS One* 2013; 8:e56291.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325:1127-31.

Pelz C, Steininger S, Weiss C, Coscia F, Vogelmann R. A novel inhibitory domain of *Helicobacter pylori* protein CagA reduces CagA effects on host cell biology. *J Biol Chem.* 2011; 8:8999-9008.

Peters M, Muller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998; 92:3495-504.

Poppe M, Feller SM, Römer G, *et al.* Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 2007; 26:3462-72.

Prates FD. Efeito do número de EPIYA-C da proteína CagA de *Helicobacter pylori* na concentração gástrica de citocinas associadas à resposta Th17 em pacientes com gastrite e carcinoma gástrico. Dissertação de mestrado, 2012. 106 páginas.

Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1987; 25:2378-79.

Queiroz DM, Guerra JB, Rocha GA, *et al.* *IL1B* and *IL1RN* polymorphic genes and *Helicobacter pylori cagA* strains decrease the risk of reflux esophagitis. *Gastroenterology* 2004; 1:73-79.

Rocha AM, Souza C, Melo FF, Clementino NC, Marino MC, Rocha GA, Queiroz DM. Cytokine profile of patients with chronic immune thrombocytopenia affects platelet count recovery after *Helicobacter pylori* eradication. *Br J Haematol.* 2014; 26.

Rocha GA, Guerra JB, Rocha AM, *et al.* *IL1RN* polymorphic gene and *cagA*-positive status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 115:678-83.

Rodrigues M, Queiroz DMM, Rodrigues RT, *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev de Saúde Pública* 2005a; 39:847-49.

Rodrigues M, Queiroz DMM, Rodrigues RT, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in adults from a poor urban community in northeastern Brazil: demographic, lifestyle and environmental factors. *Braz J infect Dis* 2005b; 5:405-10.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol* 2004; 68:320-44.

Saadat I, Higashi H, Obuse C, *et al.* *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelia cell polarity. *Nature* 2007; 447:330-34.

Sacks DB. The role of scaffold proteins in MEK/ERK signalling. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:833-36.

Segal EF, Falkow S, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1259-64.

Segal ED, Cha J, Lo J, *et al.* Altered states involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:14559-64.

Selbach M, Moese S, Hauck CR, *et al.* Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2002; 277:6775-78.

Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, *et al.* c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002; 43:971-80.

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347:1175-79.

Suzuki M, Mimuro H, Kiga K, *et al.* *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe* 2009; 5:23-34.

Tammer I, Brandt S, Hartig R, *et al.* Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 2007; 132:1309-19.

Tang TL, Freeman RM Jr., O'Reilly AM, *et al.* The SH2-containing protein-tyrosine phosphatase SH-PTP2 is required upstream of MAP kinase for early *Xenopus* development. *Cell* 1995; 80:473-83.

Taylor DN, Parsonnet J. The epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori*. En: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, *et al.* (eds.) Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven press 1995 pp. 551-64.

Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, *et al.* Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002; 8:1089-97.

Tegtmeyer N, Backert S. Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Europ J Cell Biology* 2011; 90:880-90.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388:539-47.

Viala J, Chaput C, Boneca IG, *et al.* Nod1 responds to peptidoglycan derived by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5:1166-74.

Vilaichone RK, Mahachai V, Tumwarsorn S, *et al.* Gastric mucosal cytokine levels in relation to host interleukin-1 polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA genotype. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:530-39.

Volpe E, Servant N, Zollinger R, *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008; 9:650-57.

Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology* 2007; 133:288-308.

Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, *et al.* *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991; 338:1175-76.

Wotherspoon AC, Path MRC. Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Med* 1998; 49:289-99.

Yaghoobi M, Bijarchi R, Narod SA. Family history and the risk of gastric cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:237-42.

Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, *et al.* Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* 1997; 41:442-51.

Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, *et al.* Variants of 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2258-63.

Yeh JJ, Tsai S, Wu DC, *et al.* P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during *Helicobacter pylori* infection. *Blood* 2010; 115:4247-53.

You M, Yu DH, Feng GS: Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19:2416-24.

Yu D, Qu C, Henegariu O, *et al.* Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J Biol Chem* 1998; 273:21125-31.

Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:97-105.

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:41-45.

8. Figuras suplementares

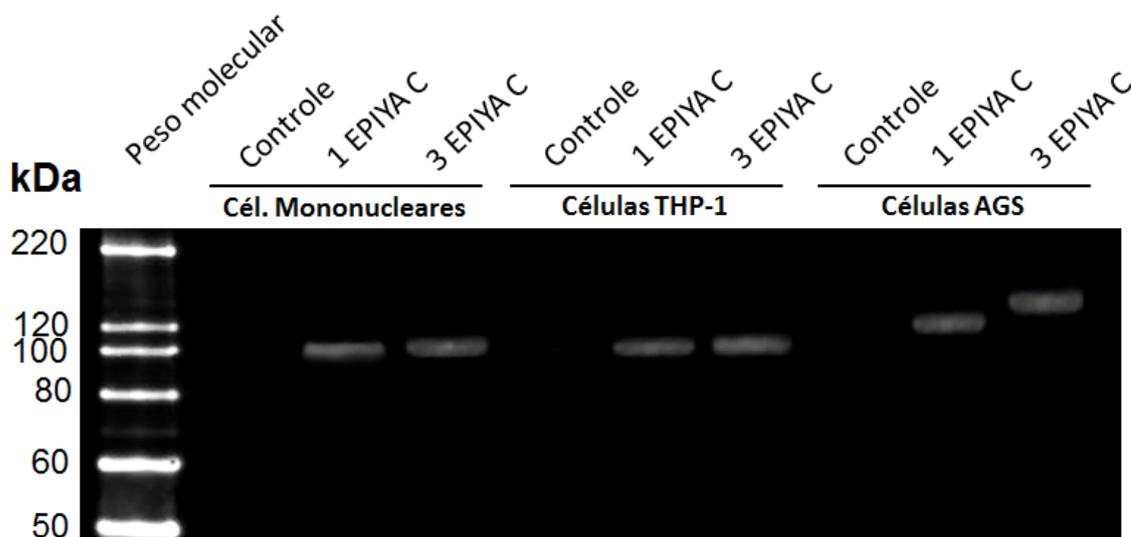


Figura suplementar 1: Lisado total de células mononucleares, células THP-1 e células AGS depois de cocultivo por 6 horas com amostras isogênicas de *H. pylori* com um e três sítios de fosforilação EPIYA C avaliado por “western blot” com anticorpo monoclonal Anti-CagA (Santa Cruz Biotechnology). Foram observados no “blot” peso molecular em torno de 100-105 kDa nos lisados totais dos cocultivos com células mononucleares e células THP-1. No lisado total das células AGS, como não há processamento da proteína CagA, o peso molecular da proteína variou de 120-140 kDa de acordo com o número de sítios de fosforilação EPIYA C.

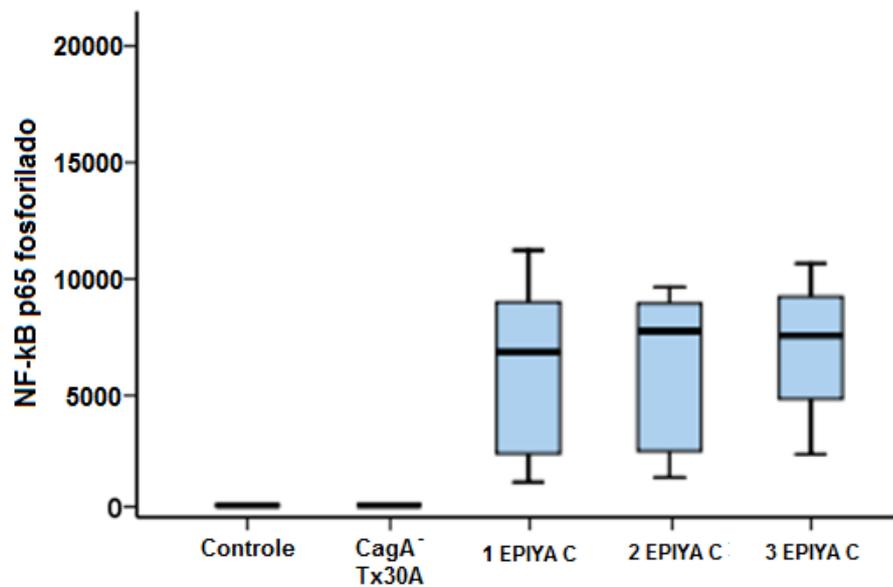


Figura suplementar 2: Concentração de NF-kB p65 fosforilado (Invitrogen) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares com amostra *cagA*-negativa (Tx30A) e nos cocultivos de células mononucleares com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C. Não houve diferença na concentração de NF-kB p65 em função do número de sítios de fosforilação EPIYA C ($p = 0,99$). Foi observada diferença significativa entre a amostra *cagA*-negativa e amostras *cagA*-positivas ($p \leq 0,001$). As condições e tempo de incubação foram feitas como descrito no item 3.4.1 e a determinação da concentração NF-kB p65 foi feita como descrito no item 3.10. Não houve produção no controle (células mononucleares sem estímulo) e nos estímulos com a amostra *cagA*-negativa (Tx30A).

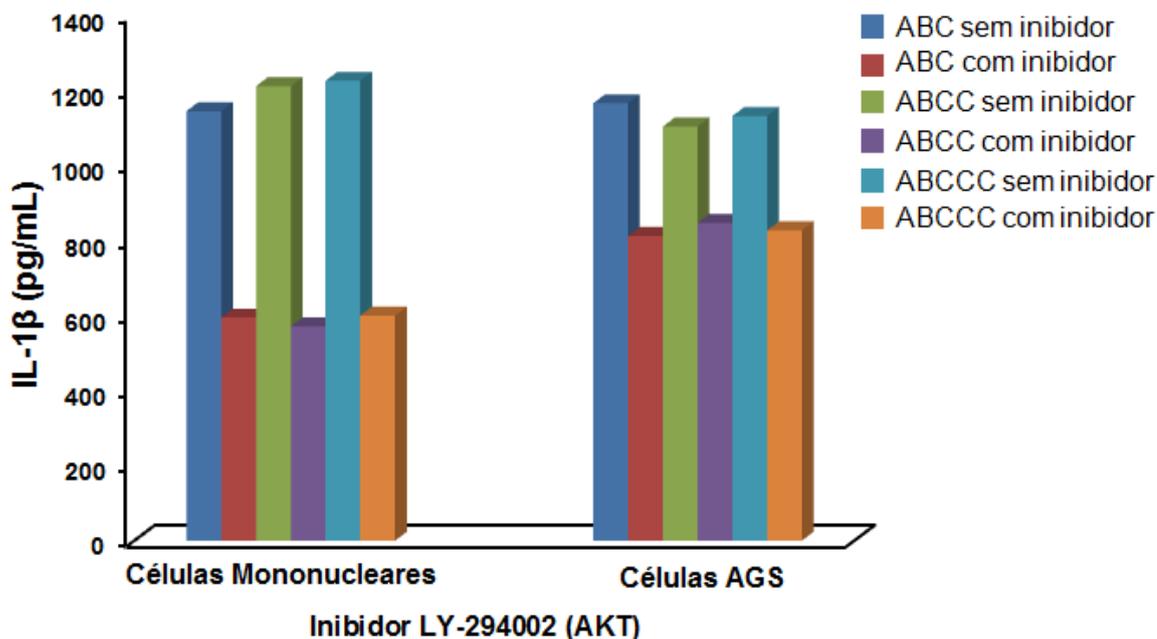


Figura suplementar 3: Concentração média de IL-1 β (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares e dos cocultivos de células AGS com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com o inibidor LY-294002 (AKT) demonstrando 50% de inibição de IL-1 β nos cocultivos com células mononucleares e 30% nos cocultivos com células AGS. Os estímulos foram feitos como descrito no item 3.9 usando o inibidor de AKT, 10 μ M Ly-294002 (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) diluído em DMSO. As condições e tempo de incubação foram feitos como descrito no item 3.4.1 e a determinação da concentração da citocina foi feita como descrito no item 3.10.

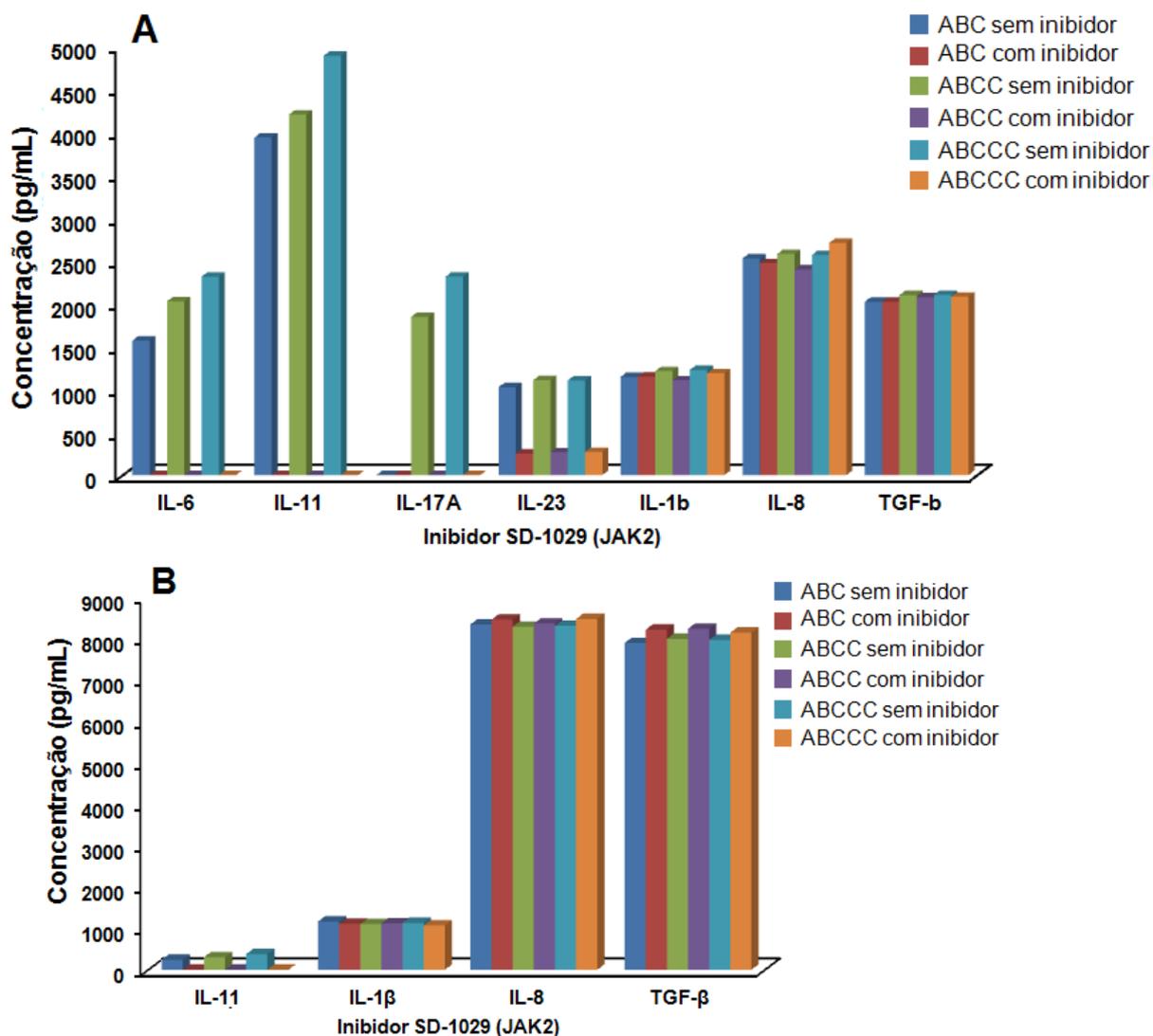


Figura suplementar 4: Concentração média das citocinas (pg/mL) nos sobrenadantes dos cocultivos de células mononucleares (A) e nos sobrenadantes dos cocultivos de células AGS (B) com amostras isogênicas de *H. pylori* com um, dois ou três sítios de fosforilação EPIYA C sem e com o inibidor SD-1029 (JAK2) demonstrando completa inibição de IL-6, IL-11, IL-17A e inibição quase completa de IL-23. Os estímulos foram feitos como descrito no item 3.9 usando o inibidor de JAK2, 10 μ M SD-1029 (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) diluído em DMSO. As condições e tempo de incubação foram feitos como descrito no item 3.4.1 e a determinação da concentração das citocinas foi feita como descrito no item 3.10.

Anexo1:

Queiroz et al. *BMC Gastroenterology* 2012, **12**:107
<http://www.biomedcentral.com/1471-230X/12/107>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Higher frequency of *cagA* EPIYA-C Phosphorylation Sites in *H. pylori* strains from first-degree relatives of gastric cancer patients

Dulciene MM Queiroz², Cícero ISM Silva¹, Maria HRB Goncalves¹, Manuel B Braga-Neto¹, Andréa BC Fialho¹, André MN Fialho², Gifone A Rocha², Andreia MC Rocha², Sérgio A Batista², Richard L Guerrant³, Aldo AM Lima⁴ and Lucia LBC Braga^{1*}

Abstract

Background: To evaluate the prevalence of more virulent *H. pylori* genotypes in relatives of gastric cancer patients and in patients without family histories of gastric cancer.

Methods: We evaluated prospectively the prevalence of the infection by more virulent *H. pylori* strains in 60 relatives of gastric cancer patients comparing the results with those obtained from 49 patients without family histories of gastric cancer. *H. pylori* status was determined by the urease test, histology and presence of *H. pylori ureA*. The cytotoxin associated gene (*cagA*), the *cagA*-EPIYA and vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) were typed by PCR and the *cagA* EPIYA typing was confirmed by sequencing.

Results: The gastric cancer relatives were significant and independently more frequently colonized by *H. pylori* strains with higher numbers of CagA-EPIYA-C segments (OR = 4.23, 95%CI = 1.53–11.69) and with the most virulent s1m1 *vacA* genotype (OR = 2.80, 95%CI = 1.04–7.51). Higher numbers of EPIYA-C segments were associated with increased gastric corpus inflammation, foveolar hyperplasia and atrophy. Infection by s1m1 *vacA* genotype was associated with increased antral and corpus gastritis.

Conclusions: We demonstrated that relatives of gastric cancer patients are more frequently colonized by the most virulent *H. pylori cagA* and *vacA* genotypes, which may contribute to increase the risk of gastric cancer.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Gastric cancer, *H. pylori* CagA-EPIYA, *H. pylori/vacA*

Background

Helicobacter pylori, a Gram-negative bacterium that infects the stomach of approximately half the world's population, is associated with the development of gastro-duodenal diseases including gastric and duodenal peptic ulcer, distal gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [1]. It is estimated that individuals infected with *H. pylori* have more than two-fold increased risk of developing gastric cancer compared with non-infected ones [2] although Japanese

studies might suggest that nearly all gastric cancer is related to *Helicobacter* [3]. Why only 1 to 5% of *H. pylori*-infected persons develop gastric cancer remains unknown and it seems to depend on the relationship between environmental, host genetics and bacterial virulence factors.

Several studies have shown an increased risk of developing gastric cancer in relatives of patients with the disease [2,4]. Similarly, an increased prevalence of precancerous gastric lesions has been observed in relatives of gastric cancer patients [5]. However, molecular mechanisms by which *H. pylori* triggers the process leading to gastric carcinoma remain largely unknown.

The most investigated *H. pylori* virulence determinant, the *cag*-PAI (cytotoxin associated gene pathogenicity island), encodes a type IV secretion system (T4SS) that is responsible for the entrance of an effector protein,

* Correspondence: lucialb@terra.com.br

¹Clinical Research Unity – Department of Internal Medicine, University Hospital Walter Cantídio – Federal University of Ceará, P.O. Box: 60430270, Fortaleza, Ceará, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

CagA, into host gastric epithelial cells [6,7]. Once translocated, CagA localizes to the inner surface of the plasma membrane where it is phosphorylated on the tyrosine residues within phosphorylation motifs in carboxy-terminal variable region of the protein by multiple members of the src-family tyrosine kinases. Once phosphorylated, CagA forms a physical complex with SHP-2 phosphatase and triggers abnormal cellular signals, which enhance the risk of damaged cells acquiring precancerous genetic changes [8,9].

The phosphorylation motifs, defined as a sequence of five amino acids (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), are classified as EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C and EPIYA-D, according to amino acid sequences flanking the motifs. CagA proteins nearly always possess EPIYA-A and -B segments, that are followed by none, one, two or three C segments in strains circulating in the Western countries, or a D segment, in East Asia strains [10,11]. It has also been shown that infection with CagA strains having high number of EPIYA-C segments imparts a greater risk of precancerous gastric lesions and cancer [12-15].

Another virulence factor of *H. pylori* is a protein known as vacuolating cytotoxin A (VacA), which causes cytoplasmic vacuolization in gastric epithelial cells, increasing the plasma cell and mitochondrial membrane permeability leading to apoptosis. The production of the cytotoxin is associated with the cag-PAI but depends on the *vacA* genotype [16-18]. The *vacA* is a polymorphic gene with two main signal region genotypes s1 and s2, and two different alleles in the mid region of the gene named m1 and m2. Infection with strains possessing the s1m1 genotype has been associated with precancerous gastric hypochlorhydria [17] and gastric carcinoma [19].

In a recent study conducted in Fortaleza, Northeastern, Brazil, in an area of high prevalence of gastric cancer and *H. pylori* infection, our group has shown a high prevalence of either pangastritis or precancerous lesions in relatives of gastric cancer patients infected with *H. pylori* [20].

Furthermore, Argent *et al.*, (2008) observed an association between *vacA* s1m1 genotype of *H. pylori* strains and low gastric acid secretion in first-degree relatives of gastric cancer patients from Scotland [21]. Otherwise, the authors did not find associations between CagA positive status and or number of tyrosine phosphorylated motifs and gastric lesions in that population.

Since geographical differences have been observed among studies that evaluated association between *H. pylori* virulence factors and diseases, the aim of this cross-sectional prospective study was to evaluate the CagA EPIYA motifs of *H. pylori* strains in first-degree relatives of gastric cancer patients comparing the results with those obtained from a control group composed of subjects with no family history of gastric cancer. Because the s1m1

genotype of the *vacA* *H. pylori* was seen to be more frequently observed in the strains of gastric cancer patients, we also evaluated the *vacA* mosaicism in the strains.

Methods

The study was approved by the Ethical Committee of Research of the University of Ceará, and informed consent was obtained from each subject.

Patients

Sixty *H. pylori*-positive first-degree relatives [42 female; mean age 40.42 ± 11.80 ; (4 brothers and 13 sisters; mean age 56.24 ± 11.80 years, 14 sons and 29 daughters; mean age 34.51 ± 7.66)] of gastric cancer patients from outpatient follow-up at Walter Cantídio Hospital were invited to participate. The control group was composed of 49 (32 female; mean age 43.20 ± 12.59) *H. pylori*-positive patients who concurrently underwent upper gastrointestinal endoscopy for investigation of dyspepsia at the same Hospital. They did not have family history of gastric cancer, and were social class matched with the study group. Patients with history of gastric surgery, active gastrointestinal bleeding, use of steroids, immunosuppressive drugs, NSAIDs, proton pump inhibitors or who were treated for *H. pylori* eradication were excluded from the study. Relatives and controls were not included if they were under 18 or above 81 years old.

Biopsy fragment collection

Gastric fragments were obtained during endoscopy from five different sites as recommended by the Updated Sydney System for classification of gastritis [22]. Additionally, two fragments were collected from the antral mucosa for the rapid urease test and for DNA to investigate the presence of *H. pylori* genes. *H. pylori* infection was confirmed by positive results in at least two tests including a rapid urease test, histological analysis and presence of *ureA* gene of *H. pylori*.

Histology

Endoscopic biopsy samples of the gastric mucosa were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax, and 4- μ m-sections were stained with hematoxylin-eosin for routine histology. Gastritis was classified according to the Updated Sydney system. The samples of the gastric mucosa were also stained with Giemsa for detection of *H. pylori*.

DNA extraction

The antral gastric DNA was extracted using the QIAmp (QIAGEN, Hilden, Germany) kit according to the manufacturer's recommendations with minor modifications [23]. The DNA concentration was determined by

spectrophotometry using NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC) and stored at -20°C until use.

The presence of *H. pylori* specific *ureA* gene was evaluated according to methodology reported by Clayton et al., [24]. The standard Tx30a *H. pylori* strain was used as a positive control, and an *Escherichia coli* strain and distilled water were both used as negative controls.

The thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for all reactions. The amplified products were electrophoresed in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and analyzed in an ultraviolet light transilluminator.

***vacA* and *cagA* detection**

PCR amplification of the *vacA* signal sequence and mid region was performed by using the oligonucleotide primers described by Atherton et al., [15]. The strains were initially classified as type s1 or s2 and type m1 or m2. All *H. pylori* strains with s1 were further characterized into s1a, s1b or s1c [25,26].

The *cagA* gene was amplified by means of two previously described set of primer pairs [27,28]. A *H. pylori* strain from our collection (1010-95), known to be *vacA* s1m1 and *cagA*-positive, was used as a positive control, and the s2m2 *vacA* genotype, *cagA*-negative standard Tx30a *H. pylori* strain and distilled water were both used as negative controls. The *H. pylori* strains were considered to be *cagA*-positive when at least one of the two reactions was positive.

Amplification of the 3' variable region of *cagA*

For the PCR amplification of the 3' variable region of the *cagA* gene (that contains the EPIYA sequences), 20 to 100 ng of DNA were added to 1% Taq DNA polymerase buffer solution (KCl 50 mM and Tris-HCl 10 mM, pH, 8.0), 1.5 mM MgCl_2 , 100 μM of each deoxynucleotide, 1.0 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), and 10 pmol of each primer, for a total solution volume of 20 μL . The primers used were previously described by Yamaoka et al. [29]. The reaction conditions were: 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute, 50°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, ending with 72°C for 7 minutes. The reaction yielded products of 500 to 850 bp as follows: EPIYA-AB: 500 bp; EPIYA-ABC: 640 bp; EPIYA-ABCC: 740 bp and EPIYA-ABCCC: 850 bp (Figure 1).

We also used the method described by Argent et al. [30] for the PCR amplification of the 3' variable region of the *cagA* gene that contains the EPIYA sequences in order to improve the accuracy of our results.

Sequencing of the 3' variable region of *cagA*

A subset of samples was randomly selected for sequencing in order to confirm the PCR results. PCR products

were purified with the Wizard SV Gel and PCR Cleanup System (Promega, Madison, MI) according to the manufacturer's recommendations. Purified products were sequenced using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequences obtained were aligned using the CAP3 Sequence Assembly Program (available from: <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). After alignment, nucleotide sequences were transformed into amino acid sequences using the Blastx program (available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and compared to sequences deposited into the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Statistical analysis

Data were analyzed with SPSS (Inc. Chicago, IL), version 17.0. The risk of relatives of gastric carcinoma to be infected by more virulent strains, with increased number of EPIYA-C motifs and s1m1 *vacA* genotype, was initially evaluated in univariate analysis. For that, *cagA* strains were stratified in those possessing at least one EPIYA-C segment and those with more than one EPIYA-C segment and the most virulent *vacA* s1m1 genotype was compared with s1m2 plus s2m2. Variables with a *p*-value less than or equal to 0.25 were included in the final model of logistic regression, controlling for the influences of age and sex. Odds Ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated. The logistic model fitness was evaluated with the Hosmer-Lemeshow test [31]. Association of the number of EPIYA-C segments and the presence of *vacA* virulent genotypes with the degree of gastric inflammation, atrophy and intestinal metaplasia was done by the two-tailed Mann-Whitney Test. The level of significance was set at a *p* value ≤ 0.05 .

Results

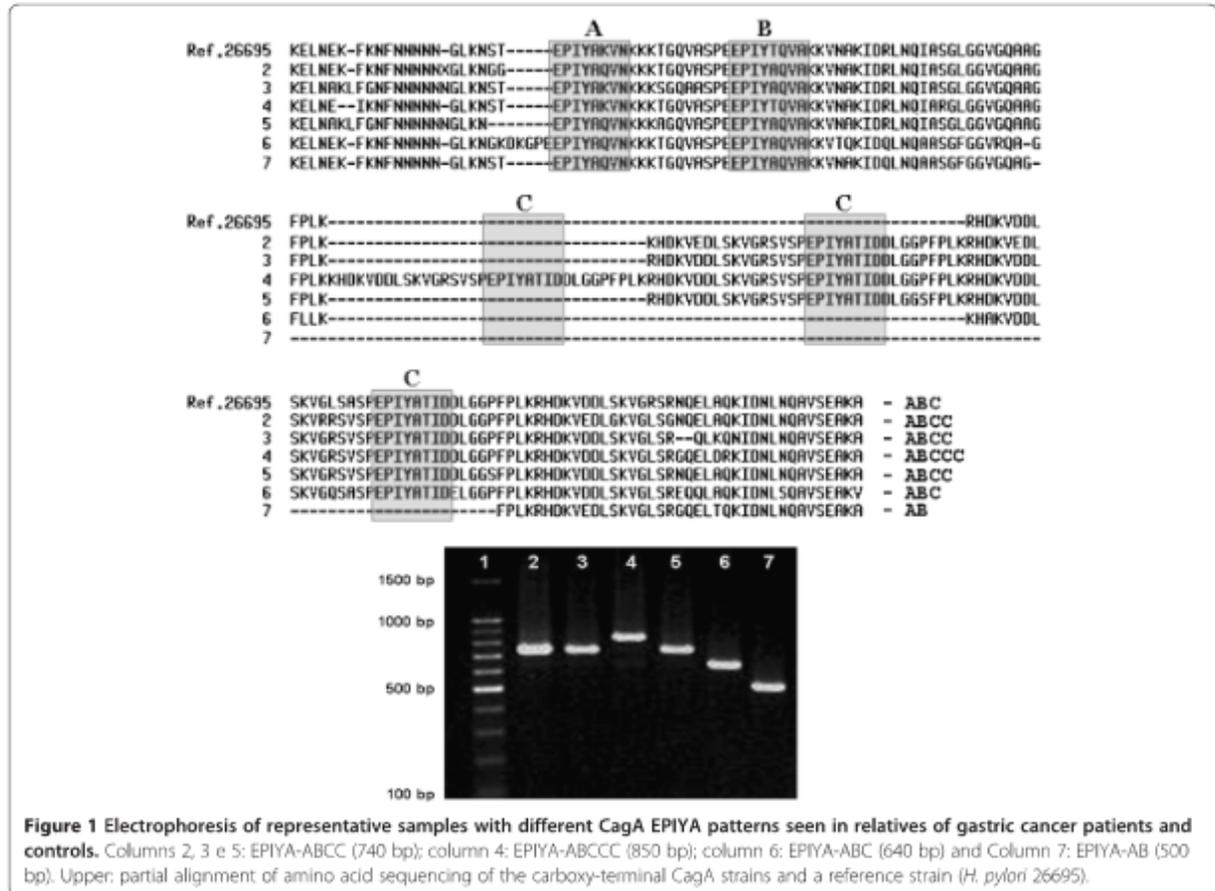
The presence of *H. pylori* specific *ureA* gene was detected in the gastric mucosa of all 109 studied subjects.

***cagA* status of the patients**

cagA positivity was observed in the gastric fragments from 51 (85.00%) of 60 gastric cancer relatives and in those from 43 (87.76%) of 49 controls, without difference between the groups ($p = 0.68$; OR = 1.26, 95%CI = 0.37 - 4.40).

The number of EPIYA-C segments

The EPIYA pattern of all *cagA*-positive strains from both relatives of gastric cancer patients and controls were successfully typed. The Yamaoka methodology allowed the detection of mixed strain infection. The concordance between the methods used was almost 100%. The results were confirmed by sequencing of the 3' variable region of *cagA* in 30 randomly selected PCR products.



Four patterns of EPIYA motifs were found: AB, ABC, ABCC, and ABCCC. No Asian EPIYA-D motif was observed. The distribution of the EPIYA genotypes is shown in the Table 1.

vacA mosaicism distribution

The distribution of *vacA* genotypes is shown in the Table 2. In 59 cases (54.13%) the *vacA* genotype was

s1m1, in 35 (32.11%) it was s1m2 and 6 (5.50%) s2m2. In three (2.75%) cases two *vacA* genotypes were observed and in six (5.50%) only the signal sequence (s1) was detected. DNA was not enough to genotype m allele in four among these cases and in two, m was not typable. In all cases with s1 strains they were genotyped as s1b, except in one case who was colonized by s1a and s1b strains.

Table 1 Distribution of EPIYA genotypes in the gastric cancer relatives (n = 51) and controls (n = 43) colonized by a *cagA*-positive strains

EPIYA Genotype	Control group n (%)	Gastric cancer relatives	
		Siblings n (%)	offspring n (%)
EPIYA-AB	03 (7.0)	0	0
EPIYA-ABC	32 (74.4)	09 (60.0)	20 (55.5)
EPIYA-ABCC	07 (16.3)	04 (26.7)	12 (33.2)
EPIYA-ABCCC	01 (2.3)	01 (6.7)	02 (5.6)
EPIYA-ABC + ABCC	0	01 (6.7)	02 (5.6)
Total	43 (100.0)	15 (100.0)	36 (100.0)

Table 2 Distribution of *vacA* alleles of *H. pylori* strains of relatives of gastric cancer patients (n = 55) and control group (n = 48)

<i>vacA</i> Genotypes ¹	Control group n (%)	Gastric cancer relatives	
		Siblings n (%)	Offspring n (%)
s1m1	23 (47.92)	10 (66.67)	26 (65.00)
s1m2	21 (43.75)	04 (26.67)	10 (25.00)
s2m2	03 (6.25)	01 (6.67)	02 (5.00)
Mixed ²	01 (2.08)	0	02 (5.00)
Total	48 (100)	15 (100)	40 (100)

¹Only *vacA* s1 genotype was identified in 6 cases (1 control, 2 siblings and 3 offsprings of gastric cancer relatives); ²Mixed infection by s1m1 and s2m2 or s1m1 and s1m2 (two cases).

Infection by the most toxigenic *vacA* genotype (s1m1) was more frequently observed in the gastric cancer relatives (65.45%) than in the controls (47.92%). When s and m alleles were individually evaluated, no difference in the frequency of s1 allele was observed between the groups, but m1 allele was more frequently observed in the gastric cancer relatives.

Association among the number of EPIYA-C motifs and the *vacA* s1m1 genotype and family history of gastric cancer

The relatives of gastric cancer patients were significantly and independently more frequently colonized by *H. pylori* strains with increased number CagA-EPIYA-C segments and with the most virulent s1m1 *vacA* genotype even after adjustment for age and gender (Table 3).

No difference was observed between siblings and offspring in respect to infection by strains containing an increased number of EPIYA-C motifs ($p = 0.98$; OR = 1.20, 95%CI = 0.30 – 4.86) and the *vacA* genotypes s1m1 vs. s1m2 and s2m2 ($p = 0.84$; OR = 0.92, 95%CI = 0.22 – 3.97) as shown in the Tables 1 and 2.

Associations among the number of EPIYA-C segments and *vacA* genotypes and gastric histological alterations

The degrees of corpus gastritis ($p = 0.04$), antrum activity ($p = 0.01$) and corpus activity were significantly higher in the relative of gastric cancer patients than in the control group.

A higher number of EPIYA-C segments was associated with gastric corpus inflammation ($p = 0.04$), gastric corpus foveolar hyperplasia ($p = 0.05$) and gastric corpus atrophy ($p = 0.05$) in the relatives of gastric cancer patients.

Infection by the most virulent *vacA* s1m1 genotype was associated with more marked antral ($p = 0.03$) and corpus ($p = 0.05$) gastritis, when both groups were evaluated together.

Discussion

H. pylori infection is recognized as the most important risk factor for distal gastric cancer. Furthermore, the increased rates of the disease in relatives of gastric

cancer points to host genetics and/or share of the most *H. pylori* virulence strains as risk factors.

In this study, we demonstrated that relatives of gastric cancer patients are more frequently colonized by *H. pylori* strains with the most virulent *vacA* genotype, s1m1, and by CagA-positive strains possessing a higher number of EPIYA-C segments than the *H. pylori* strains of the patients without a family history of the disease.

Although no previous study has demonstrated that gastric cancer relatives are more frequently colonized by more virulent *H. pylori* strains, infection by *vacA* s1m1 was associated with low gastric acid secretion, a precancerous condition, in first-degree relatives of Scottish gastric cancer patients [21]. Otherwise, no association between the gastric acid secretion and the number of CagA EPIYA-C segments was observed by the authors [21].

CagA is the first bacterial oncoprotein to be identified [32]. The protein is delivered into the gastric epithelial cell through a bacterial T4SS and localizes to the inside of the cell membrane, where it is phosphorylated by host cell kinases. Upon phosphorylation, the EPIYA-C segment interacts with SHP-2 phosphatase, a bona fide oncoprotein that is associated with a series of human cancers. The higher the number of EPIYA-C segments, the higher the affinity for SHP-2 which is required for a full activation of ERK/MAPK pathway.

Infection with CagA strains possessing higher number of EPIYA-C segments has been associated with precancerous gastric lesions and gastric cancer in Caucasian [11-13,30] and Brazilian populations [15].

It is well established that *H. pylori* infection is predominantly acquired in childhood and that the infection often persists for life unless treated. Epidemiological data and genetic analysis of *H. pylori* strains have demonstrated that the strains are usually acquired within the family. In fact, infected mother and infected siblings are the main risk factors for the acquisition of the infection [33,34] and genetic fingerprint methods have demonstrated genetic homogeneity in the *H. pylori* strains within the families. Based on these findings and the results of the present study, we may hypothesize that first degree relatives of gastric cancer patients may share more virulent *H. pylori* strains that may increase the risk of gastric cancer.

As noted above, first-degree relatives of gastric cancer patients also share the same or similar genetic background that may increase the risk of gastric cancer. Polymorphisms in genes coding pro-inflammatory cytokines, such as interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin-1 receptor antagonist (IL1Ra) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) are accepted as risk factors of gastric cancer, depending on the geographic region [35-39]. It has also been demonstrated that having increasing number of pro-inflammatory genotypes [36,37], as well as a

Table 3 Covariables associated with gastric cancer in the first-degree relatives of gastric cancer patients in comparison with subjects without family history of gastric cancer

Variables	Univariate analysis	Multivariate analysis		
	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>
Gender	0.27	-	-	-
Age	0.30	-	-	-
> 1 EPIYA-C motif	0.01	4.23	1.53 – 11.69	0.006
s1m1 <i>vacA</i> allele	0.17	2.80	1.04 – 7.51	0.04

The Hosmer-Lemeshow test was fit (8 degrees of freedom, $p > 0.20$, with 10 steps).

concomitant infection by more virulent *H. pylori* strains progressively increases the risk of gastric precancerous lesions and cancer [39].

Conclusions

In conclusion, we demonstrated that relatives of gastric cancer patients are more frequently colonized by the most virulent *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes, which may, in addition to human genetic predispositions, further increase their risk of gastric cancer, thus providing additional reasons to better understand these infections and perhaps their targeted eradication treatment.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Authors' contributions

DMMQ supervised laboratory work and analyzed the data critical writing and reviewing manuscript, SAB performed DNA extraction, PCR and sequencing and statistical analysis, GAR and AMCR, participated in implementation of the study and wrote the manuscript, CISMS and MHB performed DNA extraction, PCR and database management, MBN, ABF and AMN participated in implementation of the study, data collection, database management and statistical analysis, RLG and AAML performed critical analysis of the data and reviewing of the manuscript, LLBCB participated in conception, design, implementation, coordination of the study and contributed to manuscript writing critical writing and reviewing. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Biomedicina do Semiárido Brasileiro (INCT) and CNPq, Brazil. We are grateful to Professor Barry J Marshall for critical reading of the manuscript. Results of the study was presented as abstract at Digestive Disease Week, DDW 2011, Chicago USA.

Author details

¹Clinical Research Unit – Department of Internal Medicine, University Hospital Walter Cantídio – Federal University of Ceará, P.O. Box: 60430270, Fortaleza, Ceará, Brazil. ²Laboratory of Research in Bacteriology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ³Center for Global Health, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA. ⁴Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Received: 29 February 2012 Accepted: 8 August 2012

Published: 14 August 2012

References

- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DO: *Helicobacter pylori* and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991, **25**:1127–1131.
- Brenner H, Amdt V, Stürmer T, Stegmaier C, Ziegler H, Dhom G: Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. *Cancer* 2000, **88**:274–279.
- Uemura N, Okamoto S: Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer in Japan. *Gastroenterol Clin North Am* 2000, **29**:819–827.
- Chang YW, Han YS, Lee DK, Kim HJ, Lim HS, Moon JS, et al: Role of *Helicobacter pylori* infection among offspring or siblings of gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2002, **101**:469–474.
- Jablonska M, Chlumská A: Genetic factors in the development of gastric precancerous lesions – a role of *Helicobacter pylori*? *Int J Cancer* 2001, **95**:477–481.
- Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS: Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:14559–14564.
- Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R: Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000, **287**:1497–1500.
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, et al: SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002, **295**:683–686.
- Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, et al: Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 2006, **130**:1181–1190.
- Hatakeyama M: Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:688–694.
- Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC: Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J of Med Microb* 2008, **57**:1062–1067.
- Yamaoka Y, El-Zimaity HMT, Gutierrez O, Figura N, Kim JK, Kodama T, et al: Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 1999, **117**:342–349.
- Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al: Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008, **135**:91–99.
- Sicinski LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazuelo MB, Romero-Gallo J, et al: CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**:369–378.
- Batista SA, Rocha GA, Rocha AM, Saraiva IE, Cabral MM, Oliveira RC, et al: Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol* 2011, **11**:61.
- 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**:17771–17777.
- Willhite DC, Blanke SR: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic enter cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* 2004, **6**:143–154.
- Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I, Funao J, Nakayama M, et al: *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem* 2006, **281**:11250–11259.
- Ashour AA, Magalhães PP, Mendes EN, Collares GB, de Gusmão VR, Queiroz DM, et al: Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002, **33**:173–178.
- Motta CR, Cunha MP, Queiroz DM, Cruz FW, Guerra EJ, Mota RM, et al: Gastric precancerous lesions and *Helicobacter pylori* infection in relatives of gastric cancer patients from northeastern Brazil. *Digestion* 2008, **78**:3–8.
- Argent RH, Thomas RJ, Aviles-Jimenez F, Letley DP, Limb MC, El-Omar EM, Atherton JC: Toxigenic *Helicobacter pylori* infection precedes hypochlorhydria in cancer relatives, and *H. pylori* evolves in these families. *Clin Canc Res* 2008, **14**:2227–2235.
- Dixon MF, 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* 1996, **20**:1161–1181.
- Monteiro MA, Chan KH, Rasko DA, Taylor DE, Zheng PY, Appelmelk BJ, et al: 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**:11533–11543.
- Clayton CL, Kleantous H, Coates PJ, Morgan DO, Tabaqchali S: Sensitive Detection of *Helicobacter-pylori* by Using Polymerase Chain-Reaction. *J Clin Microbiol* 1992, **30**:192–200.
- van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneberger P, de Boer W, et al: Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998, **115**:58–66.
- Atherton JC, Cover TL, Wells RJ, Morales MR, Hawley CJ, Blaser MJ: Simple accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1999, **37**:2979–2982.

27. 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**:1671–1674.
28. Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Cover TL, Atherton JC, et al: Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J Clin Microbiol* 1995, **33**:28–32.
29. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR: Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998, **36**:2258–2263.
30. Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC: Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2004, **127**:514–523.
31. Hosmer DW, Lemeshow S (Eds): *Applied Logistic Regression*, JH. New York: Wiley Interscience Publication; 2000.
32. Hatakeyama M: Anthropological and clinical implications for structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cancer Sci* 2011, **102**:36–43.
33. Rocha GA, Rocha AM, Silva LD, Santos A, Bocewicz AC, Queiroz R, Rde M, et al: Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. *Trop Med Int Health* 2003, **8**:987–991.
34. Kivi M, Johansson AL, Reilly M, Tindberg Y: *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. *Epidemiol Infect* 2005, **133**:645–652.
35. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Breem JH, Young HA, et al: Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000, **404**:398–402.
36. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al: Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine genes polymorphisms. *Gastroenterology* 2003, **124**:1193–1201.
37. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, et al: A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003, **125**:364–371.
38. Rocha GA, Guerra JB, Rocha AMC, Saraiva IEB, da Silva DA, de Oliveira CA, et al: IL1RN polymorphic gene and *cagA*-positive status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2005, **115**:678–683.
39. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al: *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**:1680–1687.

doi:10.1186/1471-230X-12-107

Cite this article as: Queiroz et al.: Higher frequency of *cagA* EPIYA-C Phosphorylation Sites in *H. pylori* strains from first-degree relatives of gastric cancer patients. *BMC Gastroenterology* 2012, **12**:107.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo 2:



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0578.0.203.000-10

**Interessado(a): Profa. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz
Departamento de Propedêutica Complementar
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de março de 2011, o projeto de pesquisa intitulado **"Efeito do número de EPIYA da proteína CagA de *H. pylori* na produção de citocinas representativas das respostas Th1, Th2, Th17 e Treg por células monucleadas do sangue periférico e células de mucosa gástrica"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

Anexo 3:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título: “Efeito do número de EPIYA C da proteína CagA de *Helicobacter pylori* na produção de citocinas representativas das respostas Th1, Th2, Th17 e T_{reg} por células mononucleadas do sangue periférico e células de mucosa gástrica”.

Introdução: Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda as explicações que serão apresentadas esclarecendo o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

Objetivo: Esse trabalho tem como objetivo investigar o efeito do número de sítios EPIYA C da proteína CagA de *Helicobacter pylori* na expressão gástrica de citocinas bem como identificar as fontes de produção das referidas citocinas .

Resumo: Mais da metade da população mundial tem infecção pelo *Helicobacter pylori*. Muitos indivíduos infectados apresentam úlcera do estômago e duodeno e alguns podem apresentar câncer do estômago. Recentemente tem sido demonstrado em alguns estudos que citocinas e suas respectivas vias de sinalização podem estar relacionadas ao desenvolvimento do câncer de estômago associado à infecção pelo *Helicobacter pylori*. Portanto, identificar fatores ligados ao microrganismo que predispõem à carcinogênese contribuirá de várias maneiras para o controle da doença. Além disso, os resultados poderão ainda fornecer informações relevantes para a compreensão de mecanismos ligados a controle de vias de sinalização que participam também na carcinogênese gástrica.

Procedimento: Se você concorda em participar deste estudo, será feito o teste do sopro. Nesse teste você sopra um balão, toma um suco de laranja com uréia marcada com ¹³C não radioativo e meia hora depois sopra novamente outro balão. Se o resultado for negativo para *H. pylori*, uma amostra de sangue periférico será colhida de uma veia em seu braço. Não haverá nenhum custo para você ser incluído no estudo, da mesma forma que você não receberá qualquer remuneração pela participação.

Desconfortos: A retirada de sangue será realizada por um profissional capacitado, com material estéril descartável; no entanto, como todo procedimento de coleta sanguínea, poderá ocorrer um pequeno desconforto passageiro e às vezes vermelhidão no local.

Benefícios: Para o doador não há nenhum benefício direto na participação no estudo, e não é prevista qualquer compensação financeira, porém os dados do estudo podem nos ajudar a melhor compreender como a produção de citocinas e suas vias de sinalização podem ser influenciadas por fatores do microrganismo. A recusa em participar desse estudo não implicará em prejuízo de relacionamento profissional ou pessoal.

Confidencialidade: Os seus dados serão mantidos em sigilo ate onde é permitido pela lei. O comitê de Ética em Pesquisa da UFMG poderá verificá-los. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário você autoriza o pesquisador a fornecer seus dados para o órgão financiador, para a instituição e para o Comitê de Ética em Pesquisa – COEP/UFMG.

Desligamento: Você poderá se afastar a qualquer momento da pesquisa sem nenhum prejuízo.

Novas Descobertas: Todos os novos dados desta pesquisa serão fornecidos a você.

Contato com o pesquisador: Pode ser feito pelo telefone (0xx31) 3274-2767 com a Professora Dulciene. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como voluntário da pesquisa, você poderá ligar para o Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP/UFMG no número (0xx31) 3409-4592.

Consentimento:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento na participação do estudo, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Nome do voluntário selecionado Idade

Assinatura do voluntário ou responsável Data

Assinatura de testemunha Data

Assinatura de testemunha Data