

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Pós-Graduação em Microbiologia

**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**

Fernanda Diniz Prates

Belo Horizonte

2012

Fernanda Diniz Prates

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 apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Co-orientador: Prof^o. 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

2012

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes neste trabalho, em 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

À Prof^a. Luciana Diniz

À Prof^a. Silvia Beleza de Moura

Ao Prof^o. Marcus Vinicius Melo de Andrade

À Prof^a. Adriana dos Santos

Ao Fabrício

Aos Pós-doutorandos do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia

Aos colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia

Aos funcionários, bolsistas de Apoio Técnico e de Iniciação Científica do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia

Aos médicos e aos funcionários do Serviço de Endoscopia Digestiva/Cirurgia do Hospital das Clínicas/UFMG

Aos médicos e aos funcionários do Hospital Luxemburgo e do Hospital Mário Penna

Ao corpo docente do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro

Aos meu pais

Aos meus familiares

Ao Lucas

Aos meus amigos

Aos pacientes que generosamente aceitaram participar desse estudo

Resumo

A infecção crônica pelo *Helicobacter pylori* é um fator essencial na patogênese do carcinoma gástrico. O gene *cagA*, que codifica o fator de virulência CagA, é considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento do tumor. Na região carboxi-terminal da proteína CagA existem sequências repetidas, sítios de fosforilação, denominadas EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala). Esses sítios são fosforilados por quinases da célula do hospedeiro e ativam a via de sinalização SHP2/MAPK/ERK, o que leva a alterações celulares que predispõem à carcinogênese. Ainda, o controle negativo exercido pela via MAPK/ERK 1/2 na via STAT3 é perdido quando SHP-2 se encontra ligada à proteína CagA, favorecendo assim, também, o aumento da expressão de STAT3. Embora a transcrição de citocinas possa ser ativada pelas duas vias, não existem trabalhos avaliando a influência do número de sítios de fosforilação EPIYA-C na concentração gástrica de citocinas associadas à resposta Th17, que tem sido considerada relevante na carcinogênese em geral e na gástrica em particular. Portanto, nós avaliamos o efeito da infecção por amostras de *H. pylori* com maior número de sítios de fosforilação EPIYA-C da proteína CagA na concentração gástrica de citocinas representativas da resposta Th17 (IL-1 , IL-6, IL-17, IL-23 e TGF-), bem como de IL-8 e IL-11 em pacientes com gastrite e carcinoma gástrico. Foram incluídos no estudo 206 pacientes: 105 com gastrite e 101 com carcinoma gástrico. Os números de EPIYA-C da

proteína CagA foram determinados por PCR e os perfis foram confirmados por sequenciamento. As concentrações gástricas das citocinas foram avaliadas por método imunoenzimático (BioSource, Camarillo, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações das citocinas estudadas foram significativamente maiores na mucosa gástrica não tumoral dos pacientes com carcinoma gástrico que na mucosa gástrica dos pacientes com gastrite. Nos pacientes com gastrite, as concentrações gástricas de IL-11, IL-17 e IL-23 foram significativamente maiores no grupo colonizado por amostras contendo mais de um sítio de fosforilação EPIYA-C que no grupo infectado por amostras contendo até um sítio de fosforilação EPIYA-C. Nos pacientes com carcinoma gástrico, além das citocinas IL-11, IL-17, IL-23, as concentrações gástricas de IL-6 e TGF- também se associaram com infecção por amostras contendo maior número de sítios de fosforilação EPIYA-C. Nos pacientes com câncer gástrico, as concentrações de IL-1 , IL-6, IL-11, IL-17, IL-23 e TGF- foram significativamente maiores nos fragmentos de tumor que na mucosa gástrica não tumoral. Concluindo, demonstramos pela primeira vez que os sítios de fosforilação EPIYA-C da proteína CagA de *H. pylori* participam na ativação de citocinas associadas com a carcinogênese gástrica.

Abstract

Helicobacter pylori infection is considered to play an important role in the pathogenesis of gastric carcinoma. The *cagA* gene, which encodes the virulence factor CagA, is considered an important risk factor for the development of gastric cancer. CagA is translocated into the gastric epithelial cell, localizes to the inner surface of the plasmatic membrane and is phosphorylated by multiple members of the Src kinase family. Phosphorylation of CagA occurs within tyrosine phosphorylation motifs containing five sequence aminoacids (EPIYA). Phosphorylated CagA forms a physical complex with SHP-2 triggering the SHP2/MAPK/ERK 1/2 signaling pathway, which leads to cellular changes that predispose to carcinogenesis. Further, the MAPK/ERK 1/2 pathway negative control of STAT3 is thought to be lost when SHP-2 is linked to the EPIYA-C motifs, thereby also increasing the expression of STAT3. Although both pathways may induce cytokine transcription, we are unaware of studies evaluating the effect of infection with CagA strains with different number of EPIYA-C phosphorylation site on the concentration of gastric cytokines associated with commitment of Th17 cell, which has been associated with carcinogenesis. Therefore, we determined the gastric concentrations of IL-1 , IL-6, IL-17, IL-23 e TGF- , as well as IL-8 e IL-11 in the gastric mucosa of patients with gastritis and gastric carcinoma, infected by CagA strains with different number of EPIYA-C motifs. A total of 206 patients (105 with gastritis and 101 with gastric carcinoma) were included. *cagA*-EPIYA-C motifs were determined by PCR and the profiles were confirmed by sequencing. The cytokine gastric concentrations were evaluated by ELISA. The concentrations of

all cytokines were significantly higher in the non-tumoral gastric mucosa of patients with gastric carcinoma than in the gastric mucosa of patients with gastritis. The gastric levels of IL-8 and IL-23 were significantly higher in patients colonized by *cagA*-positive strains than in those colonized by *cagA*-negative strains. When we analyzed only *cagA*-positive strain, the gastric levels of IL-11, IL-17 and IL-23 were significantly higher in patients colonized by *cagA*-positive strains with two or more EPIYA-C segments than in those infected with strains containing less than two EPIYA-C segments. In the gastric carcinoma patients, higher gastric levels of IL-6, IL-11, IL-17, IL-23 and TGF- β were significantly associated with increased number of EPIYA-C segments. By comparing gastric areas with and without tumor in the patients with gastric cancer, the concentrations of all cytokines were higher in the former. The findings of this study provide further evidence of the relevance of CagA protein in the pathogenesis of gastric cancer and in understanding the mechanisms by which CagA protein participates in the gastric carcinogenesis induced by *H. pylori*.