

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

**Avaliação do padrão e número de sítios de fosforilação
(EPIYA) da proteína CagA de *H. pylori* e risco de
carcinoma gástrico e úlcera duodenal**

Sérgio de Assis Batista

BELO HORIZONTE
2010

Sérgio de Assis Batista

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

Orientadora: Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Departamento de Microbiologia / Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Prof^a. Andreia Maria Camargos Rocha

Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia / Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2010

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.
- À minha co-orientadora Prof^a. Andreia Maria Camargos Rocha.
- Ao Prof. Gifone Aguiar Rocha.
- À Dr^a. Luciana Inácia Gomes.
- À Dr^a. Juliana Becattini Guerra.
- À Prof^a. Taciana de Figueiredo Soares.
- À Prof^a. Silvia Beleza de Moura.
- À Prof^a. Patrícia Silva Cisalpino.
- À Maria Luíza, Regina, Marina, Kenya e Jaíza.
- Ao Fabrício, Adriana e Rafaella, colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia/UFMG.
- Aos colegas de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia/UFMG.
- Aos amigos Otávio, Millan e ao Víctor.
- Aos funcionários, bolsistas de Apoio Técnico e de Iniciação Científica do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia.
- À Lucélia, Silvinha e Isadora.
- 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.

Resumo

A infecção crônica pelo *H. pylori* é um fator essencial na patogênese do carcinoma gástrico e úlcera duodenal. O gene *cagA*, que codifica o fator de virulência CagA, é considerado um fator de risco para as duas doenças. Recentemente foram descritos sítios de fosforilação na proteína CagA denominados EPIYA. Número aumentado do sítio EPIYA C tem sido associado com fenômenos celulares que predispõem à oncogênese. Portanto, no presente estudo foram avaliados o padrão e número de sítios de fosforilação EPIYA da proteína CagA de amostras de *H. pylori* isoladas de pacientes com carcinoma gástrico, úlcera duodenal e gastrite. Foram estudados 436 pacientes infectados por amostras de *H. pylori cagA*-positivas: 188 com carcinoma gástrico, 112 com úlcera duodenal e 136 com gastrite. Os sítios EPIYA foram determinados por PCR e os resultados confirmados por sequenciamento. Para análise estatística os pacientes foram divididos em dois grupos: no primeiro foram incluídos os que eram colonizados por amostras de *H. pylori* com até um sítio EPIYA C e, no segundo, os pacientes que eram colonizados por amostras com dois ou mais sítios EPIYA C. Os dados foram analisados em modelos logísticos ajustando para idade e sexo. Foi visto que os pacientes com carcinoma gástrico (41,5%) eram colonizados mais frequentemente por amostras de *H. pylori* contendo dois ou mais sítios EPIYA C na proteína CagA que os pacientes com gastrite (18,4%) ou úlcera duodenal (13,4%). Na análise logística, número aumentado de sítios EPIYA C permaneceu independentemente associado ao carcinoma gástrico tanto quando a comparação foi feita com gastrite (OR = 2,81; IC 95% = 1,64 – 4,82; $p < 10^{-3}$) quanto com úlcera

duodenal (OR = 1,79; IC 95% = 1,27 – 2,52; $p = 0,001$). Entretanto, quando os pacientes com úlcera duodenal foram comparados com os pacientes com gastrite, quanto ao número de sítios EPIYA C, não se observaram associações ($p = 0,29$). Em conclusão, os resultados desse estudo demonstraram que a infecção por amostras de *H. pylori* contendo dois ou mais sítios de fosforilação EPIYA C na proteína CagA está associada com risco aumentado de carcinoma gástrico, mas não de úlcera duodenal.

Abstract

Helicobacter pylori infection is considered to play an important role in the pathogenesis of gastric carcinoma and duodenal ulcer. Among the virulence factors, CagA protein has been associated with both diseases. Recently, it was described that phosphorylation of CagA occurs within tyrosine phosphorylation motifs containing EPIYA sequence. *H. pylori* CagA protein with higher number of EPIYA C segments has been associated with precancerous lesions and gastric carcinoma. Therefore, in this study we evaluated the number of CagA-EPIYA C segments in *H. pylori* strains isolated from patients with gastric carcinoma, duodenal ulcer and gastritis. We included 436 *H. pylori cagA*-positive patients: 188 with gastric carcinoma, 112 with duodenal ulcer and 136 with gastritis. *cagA* 3' variable region was PCR amplified and the results were confirmed by sequencing. Differences in the number of CagA EPIYA C segments and associations with clinical outcomes were analyzed by logistic models adjusting for age and gender. The analysis was performed by stratifying the patients into two groups: one consisted of patients colonized by *cagA*-positive strains with at least one EPIYA C segment and the second one included patients colonized by strains with two or more segments. Patients with gastric carcinoma were more often infected with *H. pylori* strains possessing more than one EPIYA C segments (41.5%) than those with gastritis (18.4%) or duodenal ulcer (13.4%). In the logistic analyses the number of EPIYA C segments remained independently associated with gastric carcinoma when patients with gastric carcinoma were compared with those with gastritis (OR = 2.81; CI 95% = 1.64 – 4.82; $p < 10^{-3}$) or duodenal ulcer (OR = 1.79; CI 95% = 1.27 – 2.52; $p = 0.001$). However, no significant difference was observed in the number of EPIYA C segments between strains isolated from patients with duodenal ulcer and gastritis ($p = 0.29$). In conclusion, the results of this study showed that CagA *H. pylori* strains possessing higher number of EPIYA C segments were associated with increased risk of gastric carcinoma, but not of duodenal ulcer.