

HELICOBACTER PYLORI E EPSTEIN BARR VIRUS NELLA PATOLOGIA GASTRICA: CORRELAZIONI CON MUTAZIONI DI P53, METILAZIONE DEL DNA E INSTABILITA' DEI MICROSATELLITI.

INTRODUZIONE

Il 20% dei tumori umani è strettamente associato ad agenti infettivi con un tasso del 26% nei paesi in via di sviluppo e dell'8% nei paesi industrializzati [1]. Uno dei tumori più diffusi nel mondo è il carcinoma gastrico e nonostante un calo della sua incidenza nei paesi sviluppati rimane un problema di sanità pubblica [2].

L'ambiente gastro-intestinale è considerato una barriera dinamica che ha il ruolo di impedire il passaggio dei microrganismi in altri distretti [3]. Lo stomaco in particolare è protetto dall'attacco dei microrganismi oltre che dal pH acido anche dalla produzione di peptidi antimicrobici tra cui le β defensine umane, con specifico riferimento alle h β D2 e h β D3 che agiscono nei confronti di *H. pylori*; uno dei pochi microrganismi in grado di resistere al pH acido. Interazioni irregolari tra le cellule e i microrganismi possono essere responsabili di un processo infiammatorio della mucosa e se tale rapporto diventa persistente si può avviare il processo di cancerogenesi [4-5].

La trasformazione neoplastica si deve comunque considerare un processo multifasico e multifattoriale che coinvolge oltre all'agente infettivo anche co-fattori ambientali e/o genetici e/o condizioni permissive dell'ospite [6].

Tra i fattori genetici dell'ospite possiamo ritrovare i polimorfismi genici delle IL-1 β , IL-10 tra i fattori ambientali ritroviamo invece lo stato socio-economico e gli stili di vita quali alimentazioni, uso di alcool, fumo e droghe [7].

Tra i principali agenti infettivi coinvolti nel processo di cancerogenesi gastrica ritroviamo il virus di Epstein-Barr (EBV) ed *Helicobacter pylori* [8-9].

L'EBV è associato a circa il 10% dei tumori gastrici mentre *H. pylori* è correlato al 3% dei quadri di carcinoma gastrico e all' 1% dei casi di MALT-linfoma [8-9].

Lo sviluppo di patologie gastriche correlate ai due microrganismi sembra essere associato per *H. pylori* alla capacità di esprimere determinati fattori di patogenicità mentre per EBV alla carica virale presente nelle cellule gastriche

Entrambi i microrganismi vengono acquisiti nelle prime fasi dell'infanzia e l'infezione può persistere in maniera asintomatica con elevate percentuali di circolazione nella popolazione mondiale determinando quella condizione preliminare che è associata all'instaurarsi dello stato infiammatorio e che può evolvere verso condizioni tumorali. E' stata anche documentata la modalità di trasmissione intra-familiare che assume un ruolo importante. E' ovviamente fondamentale, ai fini predittivi, la valutazione di eventuali positività ai sopramenzionati microrganismi anche nei figli di soggetti che hanno sviluppato patologie gastriche [10-11].

Nel tentativo di comprendere come questi due microrganismi siano coinvolti nella carcinogenesi, e quali siano i fattori che ne influenzano l'evoluzione, sono stati ricercati geni e proteine che possano essere stati eletti dai due microrganismi come bersaglio e sono state osservate possibili interazioni con la proteina p53 [12].

Ambedue i microrganismi, inoltre, sono stati correlati positivamente a due dei fenomeni coinvolti nella cancerogenesi gastrica; i processi di metilazione e l'instabilità dei microsatelliti (MSI) [13].

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è quello di definire i casi di co-infezione *H. pylori*/EBV in soggetti con carcinoma gastrico e gastrite cronica nella popolazione adulta Siciliana come possibili responsabili della evoluzione del carcinoma.

Saranno in particolare valutati mutazioni presenti nella proteina P53, eventuali metilazioni del DNA e l'instabilità dei microsatelliti coinvolti nell'attivazione del processo oncogeno.

MATERIALI E METODI

CAMPIONAMENTO E INDAGINI

Prima della raccolta del campione i pazienti verranno informati sullo studio in corso e verrà chiesto loro di firmare un consenso informato.

Verrà inoltre fornito un questionario da compilare al fine di avere dati riguardanti il paziente quali: età, sesso, stato socio-economico, uso di alcool, droghe, fumo, sintomatologia, familiarità per carcinoma gastrico, familiarità per altri tumori, eventuale pregressa positività ad *H. pylori* e EBV, farmaci utilizzati nell'ultimo mese, n° di figli.

Lo studio includerà n° 50 pazienti adulti, maschi e femmine con carcinoma gastrico e n° 50 senza carcinoma.

Da ogni paziente verranno prelevate n° 2 biopsie dall'antro e n°2 dal corpo gastrico, nei pazienti con carcinoma verranno prelevati pezzi provenienti dalla mucosa tumorale e dalla mucosa sana.

I pezzi biotipici verranno ulteriormente suddivisi in due parti, ciascuna delle quali verrà utilizzata per effettuare:

1. Valutazioni della coinfezione EBV/*H. pylori* al fine di supportare l'effetto oncogenico sinergico dei due microrganismi

Ricerca di *H. pylori* verrà effettuata mediante:

- Esame colturale per l'isolamento del microrganismo
- Indagine molecolare: dopo aver effettuato l'estrazione del DNA utilizzando Kit d'estrazione commerciale, verranno ricercati gli acidi nucleici di *H. pylori* mediante nested PCR.

Ricerca di EBV mediante:

- Ibridazione in situ, verrà ricercato, mediante l'uso di un prob, RNA di EBER 1, il più abbondante prodotto virale presente nelle cellule con infezione latente.

2. Valutazioni sui principali geni di patogenicità espressi da *H. pylori* da correlare ai casi arruolati per definire il ruolo dei fattori di patogenicità microbici

- Sui campioni che risultano positivi per *H. pylori* verrà effettuata la caratterizzazione molecolare dei principali geni microbici di virulenza, implicati nella cancerogenesi e non. Verranno ricercati i geni *vacA* e *cagA* implicati nella cancerogenesi e il gene *oipA* coinvolto nell' induzione della produzione di IL-8. Verranno anche effettuati valutazioni sulla farmaco resistenza del microrganismo, con particolare riferimento alla Claritromicina, al fine di poter indirizzare il clinico verso una terapia mirata.

3. Valutazione sul possibile ruolo svolto dalla carica virale nel carcinoma gastrico

Verrà effettuata mediante REAL TIME PCR su sequenze target specifiche del virus

4. Valutazioni dei polimorfismi genici delle IL-8, IL-10 e IL-1 β dei soggetti sani e dei soggetti con tumore al fine di stabilire la correlazione tra polimorfismi, sviluppo di carcinoma e infezione EBV e/o *H. pylori*, valutazioni dei livelli di espressione di geni per l'IL-8 e per le h β D2 e h β D3 per valutare la differente risposta dei soggetti al processo infettivo.

Mediante PCR verranno analizzati i polimorfismi dei geni per le interleuchine IL-8, IL-1 β e IL-10 e mediante analisi in Real time PCR verranno quantizzati i livelli di IL-8 e di h β D2 e h β D3

5. Valutazioni delle mutazioni in p53

Per il rilevamento delle mutazioni nella proteina p53 sarà utilizzato il test Single-Stranded Conformational Polymorphism (SSCP), verranno amplificati mediante PCR gli esoni 5-9 del gene p53.

6. Valutazioni sullo stato di metilazione di geni coinvolti nella cancerogenesi gastrica quali CDH1, DAPK, COX2, hMLH1 e CDKN2A

L'analisi sarà condotta mediante PCR utilizzando primer specifici per le sequenze metilate e non.

7. Valutazioni dei MSI

L'indagine verrà condotta mediante l'uso del primer BAT26 set, dove il primer senso è marcato con una sonda e la migrazione verrà effettuata mediante elettroforesi capillare, verranno utilizzati come controllo negativo la linea cellulare SW480 mentre come controllo negativo la linea HCT116.

8. Valutazione, mediante esame istologico, del processo infiammatorio e della stadiazione del carcinoma gastrico e dei tipi cellulari differentemente coinvolti in caso d' infezione associata EBV e/o *H. pylori*.

Il campione verrà conservato in formalina e dopo opportuni trattamenti verrà colorato con l'ematosilina e eosina e sottoposto ad indagini istopatologiche che andranno a valutare il stato infiammatorio secondo il sistema di Sidney.

Le indagini sopra descritte verranno condotte sia sui pezzi di mucosa sana che su quelli di mucosa tumorale al fine di effettuare valutazioni comparative volte a rendere più chiari i dati ottenuti.

Sugli stipiti di *H. pylori* isolati mediante esame colturale oltre alla caratterizzazione dei geni di virulenza verranno effettuate le seguenti valutazioni:

9. Antibiogramma al fine di valutare la sensibilità ai farmaci utilizzati per la terapia

10. Capacità di indurre la produzione di IL-8 mediante l'utilizzo di colture di linee cellulari AGS. La quantità di IL-8 verrà misurata mediante ELISA e i livelli di mRNA prodotti mediante qPCR.

Dopo la fine della somministrazione della terapia antibiotica nei confronti dei *H. pylori* per accertarne l'eradicazione sarà richiesto al paziente un campione fecale da utilizzare per la ricerca dell'antigene microbico mediante metodica ELISA.

Ai pazienti adulti, positivi ad entrambi o ad uno solo dei microrganismi, che hanno figli di età compresa tra i 0 e i 17 anni verrà chiesto di far pervenire i campione di feci per escludere l'infezione in corso da *H. pylori* e i campione di sangue venoso per valutare lo stato immunologico dei figli nei confronti dell'EBV e di *H. pylori*.

ANALISI STATISTICA

Le valutazioni statistiche tra i gruppi di pazienti saranno determinati con il test t di Student o con il test di Mann-Whitney U per le variabili non normalmente distribuite.

Differenze tra tre o più variabili continue verranno confrontati con analisi ANOVA, seguita dal test di Bonferroni, oppure dal test unidirezionale Kruskal-Wallis, seguito dal Mann-Whitney Test U. Le differenze tra le variabili categoriche saranno stimate utilizzando il Chi quadro (X^2), mentre per i piccoli campioni verrà utilizzato il test di Fisher.

Singole associazioni verranno invece valutate con analisi di tipo univariata.

La significatività statistica verrà fissata a P-values \leq a 0.05.

TIMESHEET

Settembre 2015-Marzo 2016

- Arruolamento dei pazienti: prelievo pezzi bioptici e somministrazione questionario

Marzo 2016-Settembre 2016

- Estrazione dell'acido nucleico da pezzi bioptici,
- Valutazione della positività ai microrganismi,
- Isolamento di *H. pylori*, valutazione e caratterizzazione dei fattori di patogenicità di *H. pylori* (*vacA*, *cagA* e *oipA*)
- Valutazione direttamente dal campione bioptico della resistenza di *H. pylori* alla Claritromicina
- Valutazione dei livelli di espressione dei geni per l' IL-8 e delle h β D2 e h β D3 direttamente sul pezzo bioptico
- Valutazione dei polimorfismi genici dei pazienti
- Valutazioni isto-patologiche dei processi infiammatori in corso

Ottobre 2016- Giugno 2017

- Valutazione mediante antibiogramma delle percentuali di resistenza ai farmaci adoperati per la terapia di *H. pylori*
- Valutazione mediante dei livelli di IL-8 di hβD2 e hβD3 prodotte dopo infezione di linee cellulari AGS con gli stipiti di *H. pylori* isolati.
- Arruolamento dei figli di soggetti positivi a uno o ad entrambi i microrganismi
- Somministrazione della terapia anti-*H. pylori* ai soggetti positivi

Luglio 2017-Dicembre 2018

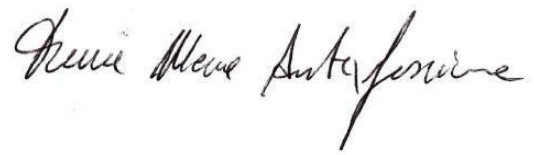
- Valutazione dell'avvenuta eradicazione di *H. pylori* nei soggetti sottoposti a terapia
- Valutazione di infezione in atto ad *H. pylori* e dello stato immunologico nei confronti di EBV nei figli di soggetti positivi
- Elaborazione dei dati
- Valutazioni statistiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: analysis of the European Cancer Registry database. *Eur J Cancer* 2013;
2. Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM (2010) The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis* 31: 100–110.
3. Moran AP, Gupta A, Joshi L. Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 2013; 60: 1412–1425.
4. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, et al. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *J Med Microbiol* 2009; 58: 509–516.
5. Bauer B, Wex T, Kuester D, Meyer T, Malfertheiner P. Differential expression of human beta defensin 2 and 3 in gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected individuals. *Helicobacter* 2013 Feb;18(1):6-12
6. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69–90.
7. Park MJ, Hyun MH, Yang JP, Yoon JM, Park S. Effects of the interleukin-1β-511 C/T gene polymorphism on the risk of gastric cancer in the context of the relationship between race and *H. pylori* infection: a meta-analysis of 20,000 subjects. *Mol Biol Rep.* 2014 Sep 26.
8. Lee HS, Chang MS, Yang HK, Lee BL, Kim WH. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with epstein-barr virus-negative carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1698-1705. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, et al. (2008)
9. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1003–1008.
10. Balfour HH Jr, Sifakis F, Sliman JA, Knight JA, Schmeling DO, Thomas W. Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6-19 years in the United States and factors affecting its acquisition. *J Infect Dis.* 2013 Oct 15;208(8):1286-93.
11. Hamed ME, Hussein HM, El Sadany HF, Elgobashy AA, Atta AH. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among family members of infected and non-infected symptomatic children. *J Egypt Soc Parasitol.* 2013 Dec;43(3):755-66
12. Valeska Portela Lima, Marcos Antonio Pereira de Lima, Angela Rosa André, Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, Marcos Aurélio Pessoa Barros and Sílvia Helena Barem Rabenhorst *H. pylori* (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: Correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. *World J Gastroenterol.* 2008 February 14; 14(6): 884-891
13. Adriana Camargo Ferrasi, Nídia Alice Pinheiro, Silvia Helena Barem Rabenhorst, Otávia Luisa Caballero, Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, Fabrício Carvalho, Celso Vieira

Souza Leite, Marcia Valéria Pitombeira Ferreira, Marcos Aurélio Pessoa Barros, and Maria Inês Moura Campos Pardini *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: Methylation status and microsatellite instability. *World J Gastroenterol.* Jan 21, 2010; 16(3): 312–319.

Palermo 15.08.2015

A handwritten signature in black ink, reading "Marcia Valéria Pitombeira Ferreira". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping tail on the last letter.