UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Kelly Cristina Rodrigues de Moura

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO *rs12979860* C/T NO GENE *IL28B* EM PACIENTES ACOMETIDOS POR CÂNCER GÁSTRICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2015

Kelly Cristina Rodrigues de Moura

Análise da frequência do polimorfismo r*s12979860* C/T no gene *IL28B* em pacientes acometidos por câncer gástrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Moura, Kelly Cristina Rodrigues de.
Análise da frequência do polimorismo rs12979860 C/T no gene IL28B em pacientes acometidos por câncer gástrico / Kelly Cristina Rodrigues de Moura. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Adriana Camargo Ferrasi
Capes: 20205007

1. Câncer - Diagnóstico - Tratamento. 2. Aparelho digestivo - Câncer. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Genes.

Palavras-chave: IL28B; câncer gástrico; polimorfismo.

Kelly Cristina Rodrigues de Moura

Análise da frequência do polimorfismo r*s12979860* C/T no gene *IL28B* em pacientes acometidos por câncer gástrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Comissão examinadora

_____
Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi
UNESP / Campus Botucatu

_____
Profa. Dra. Maria Inês de Campos Moura Pardini
UNESP / Campus Botucatu

_____
Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira
Universidade do Sagrado Coração

Botucatu, _____ de _____de ____

DEDICATÓRIA

A ***Deus***, pelo dom da vida.

Aos ***meus pais***, pela oportunidade de viver, pela minha educação e por sempre acreditarem nos meus sonhos, me possibilitando chegar onde cheguei.

Ao ***meu filho Pedro***, por me presentear como sua vinda, com seu olhar, com seu carinho e com o seu amor, me dando a oportunidade de ser mãe.

E ao ***meu amor Patrício***, por fazer parte da minha história, por me fazer sorrir e por contribuir na minha evolução.

AGRADECIMENTOS

À ***Professora Doutora Adriana Camargo Ferrasi***, minha orientadora, pela confiança depositada em mim e pela competência e paciência prestadas durante a realização deste trabalho.

À ***Professora Doutora Maria Inês Campos de Moura Pardini***, por primeiramente me receber, acreditar no meu desejo e me encaminhar dentro do laboratório de pesquisa em Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu.

À ***querida Aline Faria Galvani***, por ser fundamental no desenvolvimento da parte prática desta pesquisa.

Aos alunos de Iniciação científica e de Aprimoramento do Laboratório de Biologia Molecular, ***Kelly Colussi, Michele e Renatinha*****,** que auxiliaram nas várias etapas das amplificações e restrições.

Aos ***colegas*** do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital Estadual de Bauru, por me apoiarem e auxiliarem nas atividades durante às vezes que estava em Botucatu.

À ***direção do Hospital Estadual de Bauru*** por me liberar sempre que necessário para estar presente nas disciplinas e atividades laboratoriais do mestrado.

Aos ***pacientes*** que contribuiram para este estudo através da autorização para uso de suas amostras.

A ***todos*** que de alguma forma tenha contribuído direta ou indiretamente para a realização da minha dissertação, o meu obrigado!

Oração da Serenidade

Deus, concedei-me,
A serenidade para aceitar as coisas que eu não posso modificar;
Coragem para modificar as coisas que posso, e
Sabedoria para saber a diferença.
Vivendo um dia de cada vez;
Desfrutando um momento por vez;
Aceitando as dificuldades como o caminho da paz;
Tomando, como ele fez, este mundo pecaminoso como ele e, não como eu gostaria que fosse;
Confiando em que ele fará todas as coisas certas se eu submeter-me a sua vontade.
Que eu possa ser razoavelmente feliz nesta vida;
E infinitamente feliz com ele para sempre na próxima.
Amém.

RESUMO

MOURA, K. C. R. **Análise da frequência do polimorfismo *rs12979860* C/T no gene da *IL28B* em pacientes acometidos por câncer gástrico**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2015.

O câncer gástrico é um dos tipos de câncer mais comum e está associado com uma alta frequência de mortalidade. Embora nas últimas décadas tenha ocorrido um decréscimo na incidência mundial, o prognóstico desta patologia permanece ruim, principalmente quando o diagnóstico é feito em estágios avançados. A etiologia é complexa e multifatorial, onde a combinação de fatores genéticos e ambientais parecem estar envolvidos na carcinogênese e progressão da doença. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a frequência do polimorfismo *rs12979860* C/T no gene *IL28B* em amostras de carcinoma gástrico provenientes de dois estados brasileiros, São Paulo e Ceará, associando às características clínicas e epidemiológicas desses pacientes. Os resultados demonstraram que 29,7% dos pacientes apresentam o genótipo CC, enquanto a frequência dos indivíduos heterozigotos e (CT) e homozigotos (TT) foram 56,3% e 9%, respectivamente. Em comparação com dados descritos na literatura e do dBSNP de populações usadas como controle, a frequência do alelo T foi mais alta nos pacientes acometidos por câncer gástrico (tumor difuso: 45,5%, tumor intestinal: 39%, literatura: 11 a 35 e dBSNP: 36%). Ainda neste contexto, encontramos uma significante menor frequência do genótipo CC entre os pacientes acometidos por tumores difusos (22,7%), quando comparados aos indivíduos saudáveis (44 a 51%). Nos casos provenientes da população cearense o alelo C foi significativamente mais elevado no tipo intestinal (67%) quando comparado ao tipo difuso (50%), ressaltando a maior frequência do alelo T nos casos difusos. Analisando-se a frequência do polimorfismo *rs*12979860 C/T e a genotipagem de *Helicobacter pylori* foi observada uma forte associação entre o genótipo e a infecção pela bactéria *Cag*A+, onde pacientes portadores da cepa mais patogênica (*Cag*A+) apresentaram frequência maior do genótipo menos protetor (TT), principalmente no histotipo difuso (p=0,001). Além disso, este mesmo alelo apresentou significante associação com a ocorrência de metástases em linfonodos regionais em tumores de mesmo tipo histológico. Baseados nos resultados aqui obtidos, concluímos que parece haver uma relação do alelo T aliado à infecção pela cepa mais patogênica (*Cag*A+) do *Helicobacter pylori* na progressão tumoral gástrica em carcinomas do tipo difuso.

Palavras-chave: Câncer gástrico*; IL28B*; Polimorfismo.

ABSTRACT

Moura, K. C. R. **Analysis of frequency of polymorphism *rs12979860* C/T in the *IL28B* gene in patients suffering from gastric cancer**. 2015. 72 l. Dissertation (Master) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2015.

Gastric cancer is one of the most common types of cancer and is associated with a high mortality rate. Although in recent decades there has been a decrease in the global incidence, prognosis of this condition remains poor, especially when the diagnosis is made in advanced stages. The etiology is complex and multifactorial, where the combination of genetic and environmental factors appear to be involved in carcinogenesis and progression of the disease. Thus, the aim of this study was to determine the frequency of the polymorphism rs12979860 C / T in the IL28B gene in gastric carcinoma samples from two Brazilian states, São Paulo and Ceará, associating the clinical and epidemiological characteristics of these patients. The results showed that 29.7% of patients present with the CC genotype, while the frequency of heterozygotes and (TC) and homozygous (TT) were 56.3% and 9%, respectively. Compared to data reported in the literature and used as control populations of dbSNP, the frequency of the T allele was higher in patients affected by gastric cancer (diffuse tumor: 45.5%, intestinal tumor: 39%, literature: 11-35 and dbSNP: 36%). Also in this context, we found a significant lower frequency of the CC genotype among patients affected by diffuse tumors (22.7%) when compared to healthy subjects (44-51%). In cases from Ceará population the C allele was significantly higher in the intestinal type (67%) compared to the diffuse type (50%), emphasizing the greater frequency of the T allele in diffuse cases. Analyzing the frequency of polymorphism rs12979860 C / T and genotyping of Helicobacter pylori was observed a strong association between genotype and infection with CagA + bacteria, where patients with the most pathogenic strain (CagA +) had a frequency higher than genotype less protective (TT), particularly in diffuse histotype ($p = 0.001$). In addition, this same allele was significantly associated with the occurrence of metastases in regional lymph nodes in tumor same histological type. Based on the present results, we conclude that there seems to be a T allele compared ally to infection by the most pathogenic strain (CagA +) of Helicobacter pylori in gastric tumor progression in the diffuse type carcinomas.

Keywords: Gastric cancer; IL28B; Polymorphism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 REVISÃO DE LITERATURA 14

3 OBJETIVOS 27
3.1 Objetivos Gerais 27
3.2 Objetivos Específicos 27

4 MATERIAL E MÉTODOS 30
4.1 Casuística 30
4.2 Coletas, processamento inicial e armazenamento dos materiais biológicos 30
4.3 Extração de ácidos nucléicos (DNA) 30
4.4 Detecção do polimorfismo rs12979860 C/T no gene da IL28B 31
4.5 Genotipagem de *Helicobacter pylori* 31
4.6 Análise de Resultados 35

5 RESULTADOS 38

6 DISCUSSÃO 49

7 CONCLUSÕES 58

REFERÊNCIAS 60

ANEXOS 66

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer gástrico ainda constitui um problema mundial grave de saúde, sendo a quarta neoplasia mais frequente no mundo.

No Brasil, o câncer gástrico ainda representa importante causa de óbito e se coloca entre as cinco localizações primárias mais comuns de mortes e de casos novos de câncer, em ambos os sexos (TEIXEIRA & NOGUEIRA, 2003). Para o país, o número estimado de casos novos para o ano de 2014 foi de 20.390, acometendo 12.670 homens e 7.520 mulheres. Quanto ao número de óbitos, no ano de 2011 ocorreram 13.328 mortes por câncer gástrico, sendo 8.608 homens e 4.720 mulheres (INCA, 2014).

É um câncer duas vezes mais comum em homens, colocando-se como o segundo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste e o quarto nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Para as mulheres ocupa a quarta posição na região Norte, a quinta na região Centro-Oeste e a sexta nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste (INCA,

Trata-se de uma patologia rara antes dos 40 anos de idade, com seu pico máximo de incidência registrado na sétima década de vida.

A incidência e a mortalidade do câncer gástrico têm diminuído nas últimas décadas no mundo inteiro, principalmente nos países desenvolvidos. A alta mortalidade é registrada atualmente na América Latina, principalmente na Costa Rica, Chile e Colômbia. Porém, o maior número de casos ocorre no Japão, onde são encontrados 780 doentes por 100.000 habitantes (INCA, 2014). Com exceção do Japão, a prevalência do CG é maior nas populações de baixo nível socioeconômico. As causas do declínio da incidência estão provavelmente relacionadas a mudanças na exposição das populações dos países desenvolvidos a fatores de risco para a doença, em decorrência da melhoria das condições econômicas e sociais, tais como a mudança nos hábitos alimentares, as facilidades de conservação de alimentos e a diminuição da taxa de infecção por *Helicobacter pylori* (BOGLIOLO, 2006).

O diagnóstico geralmente é feito na fase avançada da progressão da doença, o que dificulta a eficácia dos procedimentos terapêuticos e o prognóstico dos pacientes. Tornando-se, portanto, relevante a identificação de fatores que

possam ser utilizados como biomarcadores de risco para essa doença (CUNHA, 2010).

Os fatores etiológicos envolvidos na gênese do câncer gástrico não são inteiramente conhecidos. Estudos epidemiológicos demonstram a importância de fatores ambientais, notadamente alimentares, na patogenia desta neoplasia (RODER, 2002).

A ocorrência de câncer gástrico vem sendo associada à exposição a fatores *extrínsecos*, como o uso de dietas com altas concentrações de cloreto de sódio, nitratos e nitritos contidos em alimentos defumados e frituras e a fatores *intrínsecos* decorrentes da constituição genética (ABREU, 1997; CARNEIRO *et al.,* 1997).

Outras vias podem ainda contribuir para carcinogênese gástrica. Neste contexto, o papel do sistema imunológico na prevenção ao surgimento e progressão de tumores tem sido alvo de uma grande quantidade de estudos no campo da imunologia tumoral.

Assim considerando os diversos fatores envolvidos no desenvolvimento da neoplasia gástrica, cujas vias ainda não estão bem elucidadas, aliados aos dados que descrevem a participação de mediadores imunológicos nos processos tumorais, a proposta deste projeto se resume ao interesse em determinar a freqüência do polimorfismo *rs12979860* C/T em pacientes acometidos por carcinoma gástrico, buscando correlações entre a frequência desta variação gênica, a genotipagem de *Helicobacter pylori* e características clínicas, anatomopatológicas e epidemiológicas desses pacientes.

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Histopatologia

O câncer gástrico (CG) pode se iniciar em qualquer parte do estômago. Ele pode se espalhar pelos linfonodos próximos e para outras áreas do corpo como fígado, pâncreas, intestino grosso (cólon), pulmões e ovários. Apresenta-se, predominantemente, na forma de três tipos histológicos: adenocarcinoma (responsável por 95% dos tumores), linfoma, diagnosticado em cerca de 3% dos casos, e leiomiossarcoma, iniciado em tecidos que dão origem aos músculos e aos ossos (INCA, 2014). A maioria dos tumores que atingem o estômago é do tipo adenocarcinoma, ou seja, originam-se a partir da camada que reveste internamente o estômago (DE VITA, 1997).

A anatomia do estômago permite a classificação da carcinogênese gástrica por estadiamento. Os sistemas de estadiamento mais utilizados atualmente são o de Borrmann, baseado no aspecto macroscópico do tumor, os sistemas de Laurén e o da Organização Mundial da Saúde, OMS, baseados em achados microscópicos.

O sistema proposto pela OMS considera o padrão histológico encontrado e classifica os tumores de acordo com o predominante. O adenocarcinoma subdivide-se em quatro tipos, de acordo com o seu padrão de crescimento (papilar, tubular, mucinose e anel de sinete) (WATANABE *et al.,* 1997).

Com base no aspecto macroscópico, os tumores gástricos podem ser classificados de acordo com a classificação de Borrmann (1926) da seguinte forma: Tipo I – lesão vegetante ou polipóide, que cresce em direção à luz gástrica (Borrmann I); Tipo II – lesão ulcerada e delimitada, de crescimento predominantemente expansivo (Borrmann II); Tipo III – lesão úlcero-infiltrante, que tem crescimento predominantemente na parede do órgão, com limites imprecisos (Borrmann III) e do tipo IV – lesão infiltrativa, de limites imprecisos, que cresce na parede, espessando-a e que, quando atinge o órgão, é chamada de linite plástica (Borrmann IV).

Quanto aos achados microscópicos, Laurén (1965) propôs uma classificação em que existem duas formas de CG com aspectos epidemiológicos,

patogênicos e morfológicos distintos. O carcinoma do tipo intestinal, comum nas populações de alto risco para CG, acomete preferencialmente homens (relação masculino / feminino de 1,8-2:1), com média de idade em torno de 60 anos, associa-se a gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal e é constituído por glândulas mais ou menos diferenciadas, com escassa secreção de muco. Nos países desenvolvidos, queda das taxas de mortalidade por CG deve-se à redução da prevalência desse tipo de neoplasia. O carcinoma do tipo difuso é mais freqüente nas populações de baixo risco, nas quais corresponde a cerca de 50% dos casos; acomete igualmente ambos os sexos, na faixa etária em torno de 50 anos, não tem relação com a gastrite crônica atrófica ou metaplasia intestinal, origina-se provavelmente no epitélio gástrico normal e é constituído por células isoladas e com tendência a produzir e acumular muco intracelular. Sua prevalência não se alterou significativamente nas últimas décadas (BOGLIOLO, 2006).

Diagnóstico

A maior parte dos casos de câncer gástrico é diagnosticada em estádios avançados da doença, comprometendo a eficácia dos procedimentos terapêuticos e contribuindo para o mau prognóstico. Nos países ocidentais não há estratégias de rastreamento. Na maior parte dos casos os pacientes apresentam quadro clínico assintomático ou inespecífico, dificultando o diagnóstico precoce. Os sintomas cursam de acordo com a localização anatômica do tumor, podendo incluir emagrecimento, anemia, vômitos, náuseas, anorexia, plenitude pós prandial e em alguns casos hematêmese (INCA, 2010).

O diagnóstico é realizado principalmente através de endoscopia digestiva alta, que permite visualizar a lesão em uma análise macroscópica auxiliando no planejamento cirúrgico. O exame permite ainda, a realização de biópsia para obtenção de material para estudo histológico e pode ser associado a tomografias computadorizadas, ultrassonografias endoscópicas, exames radiológicos de duplo contraste e avaliações bioquímicas (INCA, 2010; MINCIS e POSSIK, 2002).

Estadiamento

Uma vez diagnosticado, a terapêutica deve ser instituída baseada no estadiamento do tumor.

Clinicamente a ecoendoscopia e a tomografia axial computadorizada (TAC) apresentam-se como os principais meios para estabelecer o estadiamento. Através destes exames pode-se determinar o número de camadas do estômago atingidas e analisar o comprometimento dos órgãos, vasos e gânglios adjacentes. A análise da presença de metástases e de acometimento ganglionar é dificultada por estes meios devido à capacidade limitada da penetração das sondas (MOTOO *et al.*, 1994).

A ressonância magnética nuclear apresenta alta sensibilidade na identificação de doença metastática e lesões hepáticas suspeitas, sendo ainda uma alternativa nas situações em que há contra-indicação à TAC por alergia ao contraste ou insuficiência renal. PET-CT Scan (*Scan Positron Emition Tomography*) permite identificar locais de metástases com alta sensibilidade devido à detecção de anormalidades metabólicas através da tomografia por emissões de *pósitrons*. Pode ainda auxiliar no estadiamento, detectar precocemente a recidiva de tumores e verificar resposta à terapêutica. A laparoscopia e a videolaparoscopia podem auxiliar no estadiamento contribuindo para selecionar de forma mais efetiva pacientes candidatos à ressecção cirúrgica, contra indicando uma possível laparotomia (MINCIS e MINCIS, 2008).

O estadiamento patológico é realizado através da análise microscópica proveniente da ressecção cirúrgica. Atualmente existem dois principais sistemas de estadiamento que levam em conta critérios como o tamanho do tumor, invasão ganglionar com linfonodos acometidos e presença de metástases. Nos países orientais, o sistema utilizado foi instituído pela JCGC (*Japanese Classification of Gastric Carcinoma*). No Brasil utiliza-se a classificação pTNM (Tabela 1), estabelecido pela AJCC (A*merican Joint Committee on Cancer*) para compor o estadiamento tumoral (Tabela 2).

Tabela 1: TNM Patológico, classificação baseada na observação microscópica do material proveniente da ressecção cirúrgica, visando avaliar a profundidade do tumor (T), presença de linfonodos comprometidos (N) e ocorrência de metástase à distância (M).

Tumor Primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma *in situ*
T1	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
T2a	Tumor invade a muscular própria
T2b	Tumor invade subserosa
T3	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
N2	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais
Metástase à Distância (pM)	
Mx	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Sem metástase à distância
M1	Com metástase à distância

Fonte: Adaptado do Cancer Staging Handbook, 2002.

Tabela 2: Estadiamento pTNM baseado nos dados obtidos na análise pTNM (tabela 1).

Estadiamento		pTNM	
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N1	M0
II	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3		
IIIA	T1	N0	M0
	T2a/b	N1	M0
IIIB	T3	N2	M0
IV	T4	N1-3	M0
	T1-3	N3	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: Adaptado do Cancer Staging Handbook, 2002.

Tratamento e Sobrevida

Atualmente o sucesso cirúrgico e terapêutico para um paciente diagnosticado com câncer gástrico é relatado como uma sobrevida global de cinco anos. Os números variam mundialmente, chegando a 21% em indivíduos europeus (Berrino et al., 1999; Akoh e Macintyre, 1992) e até 47% no Japão (Hisamichi e Sugawara, 1984), retratando efeitos benéficos que programas rastreamento podem apresentar. No Brasil, poucos estudos relatam estes dados. Observa-se uma sobrevida global em 5 anos muito inferior aos países desenvolvidos, atingindo uma taxa de apenas 9% (Bustamante-Teixeira et al., 2006). O tratamento padrão para pacientes com câncer gástrico é a gastrectomia, que pode ser total ou parcial. A opção cirúrgica baseia-se na localização, tamanho e estadiamento do tumor. Naqueles localizados na porção alta e média do corpo gástrico, indica-se a gastrectomia total, e nos situados

abaixo dessa regiäo, a ressecçäo parcial. De acordo com o estadiamento da doença, a abordagem cirúrgica poderá ser estendida a uma linfadenectomia, que pode ser orientada por marcadores através da técnica de linfonodo sentinela. Outros tratamentos incluem a quimioterapia e a radioterapia, que podem ser realizadas em diversos esquemas terapêuticos, de acordo com as características clínico-patológicas do paciente (Hiratsuka et al., 2001).

Para pacientes em estadios avançados da doença existem ainda os tratamentos paliativos, que podem incluir todas as abordagens relatadas anteriormente, porém, sem a intenção curativa. Os critérios para realização de cirurgias de ressecção paliativa ou tratamento paliativo endoscópico levam em conta, dentre outros fatores, o alívio de sintomas e melhora da qualidade de vida do paciente. Comumente são realizadas abordagens cirúrgicas de derivação para prolongar o uso do trato gastrointestinal ou apenas para tratamento de complicações como perfurações e hemorragias (Bandoh et al., 1991).

Etiologia

A ocorrência de câncer gástrico vem sendo associada à exposição a fatores *extrínsecos*, como o uso de dietas com altas concentrações de cloreto de sódio, nitratos e nitritos contidos em alimentos defumados e frituras e a fatores *intrínsecos* decorrentes da constituição genética (ABREU, 1997; CARNEIRO *et al.,* 1997). Estudos epidemiológicos comprovam a relação entre nutrição e câncer de estômago, indicando que a associação entre fator protetor com dieta composta por legumes frescos e frutas é altamente consistente em numerosos estudos e sugere que a vitamina C e o caroteno diminuem o risco de câncer de estômago (LATORE, 1997; KONO & HIROHATA, 1996).

Ainda considerando os fatores extrínsecos, encontra-se a infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori* (HP), classificada como carcinógeno de classe I, no câncer gástrico, pela Organização Mundial da Saúde (IARC, 1994). Essa bactéria é aceita como a principal causa de características histológicas que levam às doenças gastroduodenais, incluindo a úlcera péptica, gastrite crônica e linfoma de MALT (*mucosa associated lymphoid tissue)*.

Vários mecanismos têm sido implicados no papel do *H. pylori* no processo de carcinogênese gástrica. A ação do microorganismo na mucosa

gástrica leva à esfoliação do epitélio, o que provoca um aumento da proliferação celular, normalmente acompanhada de células precursoras imaturas. Desta forma a produção de mucina é alterada, prejudicando a integridade e função protetora da mucosa gástrica. Adicionalmente, durante a resposta inflamatória do hospedeiro, ocorre estímulo de citocinas, IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-α e atração de neutrófilos e células inflamatórias mononucleares, as quais causam danos na superfície epitelial gástrica (GO & CROWE, 2000; MONTECUCCO & RAPPUOLI, 2001). Essas alterações podem levar a perda das células parietais (atrofia), metaplasia intestinal e adenocarcinoma (BJÖRKHOLM *et al.*, 2003). Notadamente, a inflamação causada por HP pode gerar radicais livres que podem contribuir para a ocorrência de mutações. A infecção causa gastrite crônica em quase todos os indivíduos infectados (KUIPERS *et al.*, 1995; VALLE *et al.*, 1996) e a gastrite crônica está presente na grande maioria dos casos de câncer gástrico e está associada com um aumento do risco para essa condição (SIPPONEN, 1994). Contudo, somente uma pequena porcentagem das pessoas infectadas com HP desenvolverá qualquer das complicações gástricas associadas à infecção, sugerindo que o desenvolvimento das doenças parece ser determinado pela combinação de vários fatores relacionados ao hospedeiro e ao micro-organismo (ATHERTON, 1998).

A suscetibilidade genética individual, na realidade, deve ter um papel crítico em uma variedade de processos relevantes para a carcinogênese gástrica, incluindo a proteção da mucosa em face da infecção por HP e outros carcinógenos; a resposta inflamatória, que condiciona a manutenção, severidade e resultado da infecção por HP; o funcionamento da desintoxicação dos carcinógenos e proteção antioxidante; a variabilidade intrínseca dos processos de reparo do DNA e o controle da proliferação celular (GONZALEZ *et al*., 2002).

À parte dos fatores relacionados ao hospedeiro, há determinantes específicos de virulência das cepas de HP que influenciam os resultados clínicos da infecção. Dois importantes fatores de virulência, a citotoxina vacuolizante (*vacuolating cytotoxin, VacA*) e a proteína associada à citotoxina (*cytotoxin-associated protein, CagA*) foram identificados. Essas proteínas são codificadas respectivamente pelos genes VacA e CagA (COVER *et al.*, 1990). A citotoxina vacuolizante (VacA) induz a formação de vacúolos em células epiteliais gástricas

in vitro (RUDI *et al.,* 1999) e está associada com úlcera péptica. Todas as cepas de *H. pylori* possuem o gene vacA, no entanto, foi observada uma variação considerável entre as linhagens, na atividade vacuolizante da toxina. A heterogeneidade dos alelos de VacA pode ser um fator determinante nas variações das doenças entre pacientes infectados por HP. Existem duas regiões variáveis no gene VacA: uma região de aproximadamente 50 pares de bases (pb), denominada s, localizada na região 5' terminal, que codifica um peptídeo sinal, onde são identificados os tipos s1 (com subtipos s1a, s1b e s1c) e s2, e uma região mediana do gene, em torno de 700 pb que apresenta os subtipos m1 e m2 (ATHERTON *et al.,* 1995).

A combinação em mosaico desses tipos alélicos distintos (s e m) determina a produção e a especificidade da atividade da citotoxina e está associada à patogenicidade bacteriana. Todas as linhagens possuem um dos tipos de sequência sinal e um dos tipos da região mediana, desta forma as possíveis variantes seriam s1m1, s1m2, s2m2 e cepas com s2m1 não foram encontradas. As cepas do tipo s1m1 produzem altos níveis da toxina, o tipo s1m2 produz níveis de moderados a baixos da toxina, enquanto que s2m2 não produzem citotoxina ativa (DOORN *et al.,* 1998; ATHERTON *et al.,* 1997).

A sequência sinal do tipo s1, mas não a do tipo s2, está fortemente associada à atividade de citotoxina *in vitro*, à úlcera péptica e à presença do gene cagA (RUDI *et al.,* 1999).

O gene cagA representa um possível marcador de virulência. Faz parte da ilha de patogenicidade cag (PAI), um segmento de 40 quilobases com aproximadamente 30 genes que desempenham papéis importantes na indução da inflamação (principalmente IL-8) e possuem homologia a genes que codificam proteínas do sistema secretor do tipo IV, os quais exportam proteínas das células bacterianas (PEEK & BLASER, 2002; TUMMURU et al., 1993). O gene cagA está presente em aproximadamente 60 a 70% das cepas de *H. pylori* e codifica uma proteína de alto peso molecular (120 a 140 quilodáltons) (TUMMURU et al., 1995). O fator de virulência CagA é fortemente associado ao risco de carcinoma, enquanto que sua ausência implica, quando muito, em um baixo risco para adenocarcinomas difusos (PONZETTO *et al.,* 1996; PARSONNET *et al.,* 1997; COVER *et al.,* 1990). O gene cagA é terminal na ilha de patogenicidade e é

utilizado como marcador para o *locus* cag inteiro (PEEK & BLASER, 2002).

Embora haja uma forte correlação entre a atividade da citotoxina vacuolizante e a presença de cagA, os dois genes, cagA e vacA, localizam-se em *loci* distintos no genoma do *H. pylori* e mutações de cagA que resultem na perda da expressão da proteína CagA, não afetará a produção da toxina, sugerindo que a expressão das duas proteínas seja independente (ISRAEL & PEEK, 2001).

As populações de HP são extremamente diferentes, devido a mutações pontuais, substituições, inserções e/ou deleções em seu genoma. Um único hospedeiro pode abrigar várias cepas que, com o decorrer do tempo, podem sofrer mutações endógenas, rearranjos cromossômicos ou recombinações entre as cepas (ISRAEL & PEEK, 2001) e a genotipagem de vacA e a detecção de cagA poderá permitir a identificação de pessoas infectadas em diferentes níveis de riscos (RUDI *et al.,* 1999).

Dentre os fatores intrínsecos, as alterações cromossômicas e outros defeitos genéticos têm sido associados ao câncer gástrico e estudos têm demonstrado evidências de predisposição genética a esta neoplasia. A maioria dos carcinomas gástricos ocorre esporadicamente e somente uma pequena proporção dos casos (8-10%) parece estar associada a fatores familiais (LA VECCHIA *et al.,* 1992), entretanto, parentes em primeiro grau de pacientes com câncer gástrico parecem ter duas ou três vezes mais chances de serem acometidos pela mesma doença (BEVAN & HOULSTON, 1999; LA VECCHIA *et al.,* 1992).

Outras vias podem ainda contribuir para carcinogênese gástrica. Neste contexto, o papel do sistema imunológico na prevenção ao surgimento e progressão de tumores tem sido alvo de uma grande quantidade de estudos no campo da imunologia tumoral.

Estudos em humanos e animais de experimentação imunocomprometidos, têm evidenciado maior incidência de tumores, comprovando a importância da resposta imune natural e adaptativa na progressão tumoral. Contudo, os resultados são ainda controversos e carecem de maiores esclarecimentos (de VISSER *et al.,* 2006). Inicialmente, esperava-se que todas as células tumorais expressassem proteínas estranhas ao organismo,

porém, essa é a realidade de poucos tumores, frequentemente aqueles induzidos por vírus oncogênicos, nos quais as proteínas virais são antígenos estranhos e tumores induzidos em animais por carcinógenos potentes (como o metilcolantreno) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Embora muitos tumores espontâneos provoquem imunidade fraca ou mesmo indetectável, o conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares de várias células pré-tumorais tornou evidente que a vigilância imunológica e a imunidade tumoral variam conforme o tipo de tumor, condições orgânicas, ambientais e o perfil genético do organismo, o que pode torná-las ineficazes ou até mesmo favoráveis ao tumor (PIEMONT; ZERBI; DI CARLO, 2003).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, sintetizadas durante a fase de ativação e efetora da imunidade inata e específica. A resposta imune é mediada pela liberação de diferentes citocinas, que influenciam a produção e atividade umas das outras, formando um sistema de inter-relação dessas proteínas imunorregulatórias (DRANOFF, 2004).

Os intérferons (IFNs) são glicoproteínas pertencente à família das citocinas, classificados em três grupos distintos: Tipo I (IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ e IFN-ω); Tipo II (IFN-γ) e Tipo III (IFN-λ: IL- 28A, IL-28B, IL-29) interagindo *via* receptores celulares específicos, controlando a homeostasia do organismo (VÁZQUEZ; GÓMES; DAFNY, 2012). Tais proteínas são produzidas em situações fisiológicas por diversos tipos celulares como macrófagos, monócitos, linfócitos T, células da glia e neurônios, atuando na adesão celular, metabolismo, controle de crescimento e diferenciação celular, com efeito antiproliferativo (LIN *et al.,* 2012; YANG, 2005).

Inicialmente, os IFNs foram associados à resposta antiviral, contudo, estudos posteriores evidenciaram o seu envolvimento na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório (GOODBOURN *et al.,* 2000; STARK *et al.,* 1998).

egativa sobre células em crescimento, com ação antagônica à

natural killer (NK), l

via MHC classe I na membrana celular (WITTE *et al.,* 2010; PIEMONT; ZERBI; DI CARLO, 2003).

Um membro da família de IFNs do tipo III, subfamília de IFN-λ3 (*lambda*), a Interleucina 28B (IL28B), parece ter um papel fundamental nas respostas imunes antivirais e antitumorais (KOTENKO *et al.,* 2003). Essa proteína é codificada pelo gene *IFNL3* (*interferon, lambda 3*), localizado no *locus* 19q13 e possui seis *exons* (SHEPPARD *et al.,* 2003; LI *et al.,* 2009; WITTE *et al.,* 2010).

Semelhante aos IFNs do tipo I (IFN-α, IFN-β), o INF do tipo III age aumentando a expressão de MHC I pelas células tumorais ou infectadas por vírus, auxiliando o reconhecimento pelos linfócitos TCD8+, conferindo maior citotoxicidade às células NK e mediando a apoptose celular (LI *et al.,* 2009; WITTE *et al.,* 2009; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; BELLANTI *et al.,* 2012).

Nas últimas décadas, o IFN-α têm sido utilizado como adjuvante ao tratamento das hepatites B e C (MONDELLI *et al.,* 2012) e, mais recentemente, em algumas tentativas na terapia contra melanomas, tumores de rim e algumas leucemias (KIRKWOOD *et al.,* 2001; TARHINI; GOGAS; KIRKWOOD, 2012). Entretanto, os efeitos colaterais do tratamento são tóxicos e severos, o que torna difícil a sua continuidade (HEIM, 2012; PESTKA, 2007; FUNG; LOK, 2004).

Quando as sequências nucleotídicas e/ou peptídicas de IFNs I e IFNs III são comparadas, nota-se pouca similaridade, algo em torno de 12% de identidade (FOX *et al.,* 2009). Contudo, ambas citocinas exercem ação antiviral pelo desencadeamento da mesma cascata de sinalização intracelular, via JAK1 e TYK2 (TAGAWA *et al.,* 2011; DUMOUNTIER *et al.,* 2004) e a alta similaridade funcional entre os IFNs tipo I e tipo III sugere que ambos possuam funções sobrepostas e redundantes na resposta antiviral e, possivelmente, antitumoral.

Baseados nesse conhecimento, vários estudos estão sendo dirigidos para investigar o potencial antitumoral dos IFN-λ (STEEN; GAMERO, 2010), principalmente devido à menor toxicidade desta citocina (MILLER *et al.,* 2009).

Resultados encorajadores tem sido apresentados para certos tipos de cânceres como carcinomas de esôfago (LI et al., 2010), tumores intestinais

(BRAND *et al.,* 2005), hepatocarcinomas (ANK et al., 2006; DOYLE et al., 2006; MARCELLO *et al.,* 2006), adenocarcinomas de pulmão (MEAGER *et al.,* 2005), linfoma de Burkitt (ZHOU *et al.,* 2009), tumores neuroendócrinos (ZITZMANN *et al.,* 2006) e melanoma (GUENTERBERG *et al.,* 2010).

Recentemente foi descoberto que o SNP *rs12979860* C/T localizado 3 mil bases antes do gene *IL28B* prediz o resultado do tratamento com IFN-α peguilado associado com ribavirina (RBV) contra o vírus da hepatite C. Indivíduos com o genótipo CC apresentaram maiores chances de depuração espontânea viral (80%), quando comparados àqueles com genótipo TT (25%) e CT (razão intermediária) (BIBERT *et al.,* 2013; FABRIS *et al.,* 2011). Este polimorfismo parece estar associado ao aumento da expressão no RNA mensageiro (RNAm) do *IL28B* (XIE *et al.,* 2012; BELLANTI *et al.,* 2012), contudo, a literatura científica carece de estudos sobre a importância desse polimorfismo na carcinogênese ou progressão tumoral.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Analisar a frequência do polimorfismo *rs12979860* C/T no gene *IL28B* em pacientes acometidos por câncer gástrico.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar a frequência do polimorfismo *rs12979860* C/T em amostras de adenocarcinoma gástrico;

Comparar os dados obtidos com a genotipagem de *Helicobacter pylori* e características clínicas, anatomopatológicas e epidemiológicas desses pacientes.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

A casuística a ser analisada será composta por 64 amostras (tumor e contrapartida normal do mesmo paciente) coletadas por ocasião do projeto de doutorado “Análise de Tumores Gástricos Infectados pelos Agentes Tumorigênicos *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein Barr" de Adriana Camargo Ferrasi sob número de aprovação no CEP 1891/2004 (Anexo 1).

Tais amostras foram obtidas de pacientes acometidos por tumores gástricos em acompanhamento e tratamento nos hospitais da Faculdade de Medicina de Botucatu e da Universidade Federal do Ceará. O critério de inclusão foi a positividade no exame de biópsia para câncer gástrico e o encaminhamento para o tratamento cirúrgico (gastrectomia parcial ou total). Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo foram informados quanto às características do projeto e procedimentos, tiveram todas as suas dúvidas esclarecidas, leram e assinaram o Termo de Consentimento, levando consigo uma cópia do mesmo.

4.2 Coletas, processamento inicial e armazenamento dos materiais biológicos

Os tecidos provenientes de gastrectomia por tumor (tumor e normal) foram coletados durante o procedimento cirúrgico e foram fragmentados em aproximadamente $3mm^3$, depositados imediatamente em criotubos contendo 500µL de conservante. Após, foram identificados através de códigos e, posteriormente, armazenados em freezer à -80°C, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu (UNESP)- Divisão Hemocentro.

4.3 Extração de ácidos nucléicos (DNA)

A extração de DNA foi realizada com o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation) segundo as especificações do fabricante. A concentração dos ácidos nucléicos, após a extração, foi determinada em espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000*) e cada amostra foi avaliada quanto a sua pureza pela razão de absorbância A260/A280nm.

Esse DNA está armazenado em freezer à -80°C, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu (UNESP)- Divisão Hemocentro.

4.4 Detecção do polimorfismo rs12979860 C/T no gene da IL28B

Para a análise germinativa do polimorfismo *rs12979860* C/T foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de uma região do gene *IL28B* em 100ng de DNA proveniente do tecido normal, com os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam especificamente fragmentos de tamanho de 242 pares de bases (Tabela 3).

Em 25µL, a mistura para PCR foi composta por: tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20mM (pH 8,4), KCl 50mM), 1,25U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen, 0,2mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100ng de DNA. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94ºC por 5 minutos, seguido de 40 ciclos (desnaturação a 94ºC por 45 segundos, anelamento a 62ºC por 1 minuto, extensão a 72ºC por 1 minuto) e extensão final a 72ºC por 7 minutos. O produto amplificado nessa reação (242pb) foi submetido a incubação a 60°C durante 6 horas com a enzima de restrição BSTU I (New England Bioloabs, Hitchin, UK) que reconhece e corta o sítio de restrição CGCG.

A análise da digestão será realizada pela visualização dos fragmentos em gel de poliacrilamida não desnaturante 7% (SAMBROOK *et al.*, 2001) corado por nitrato de prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

Esperou-se, como resultado da digestão, os padrões eletroforéticos a seguir:

- Indivíduo homozigoto para o alelo C (CC): 03 bandas (135pb, 82pb e 25pb);

- Indivíduo homozigoto para o alelo T (TT): 03 bandas (162pb, 82pb e 25pb);

- Indivíduo heterozigoto (CT): 04 bandas (162pb, 135pb, 82pb e 25pb).

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da região do SNP *rs12979860* C/T no gene da *IL28B*

Oligonucleotídeos	Sequência 5'-3'
Sense	GCTTATCGCATACGGCTAGG
Anti-Sense	AGGCTCAGGGTCAATCACAG

*Fabris et al., 2011.

4.5 Detecção da infecção por *H. pylori* pela amplificação do gene da UreaseC

A presença do *Helicobacter pylori* na amostra analisada foi verificada pela amplificação por PCR de 100 ng do DNA com os oligonucleotídeos iniciadores sense 5'- AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T -3' e anti sense 5'-AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC –3', que amplificam especificamente uma região de 294 pb do gene bacteriano da UreaseC (LAGE *et al*., 1995). Em 25 µL, a mistura para PCR era composta por: tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM), 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen, 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl2, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94ºC por 3 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 55ºC por 30 segundos, extensão a 72ºC por 2 minutos) e extensão final a 72ºC por 5 minutos.

O produto amplificado nessa reação foi visualizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK *et al.,* 2001) corado pelo nitrato de prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

Como controle positivo, foram utilizadas amostras cuja reação de PCR já havia sido positiva para este gene, submetidas ao sequenciamento de seu DNA em sequenciador automático ABI Prism 377 e comparadas às seqüências depositadas nos bancos de dados genômicos públicos para verificar sua autenticidade.

4.6 Genotipagem de *Helicobacter pylori*

A genotipagem e identificação de diferentes cepas de *H. pylori* foram realizadas pela amplificação por PCR dos genes de virulência *CagA* e *VacA* (subtipos s1 ou s2 e m1 ou m2). As reações de amplificação foram realizadas individualmente:

O gene *CagA* foi amplificado em 100 ng de DNA total com os oligonucleotídeos iniciadores *sens*e 5´- ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A - 3´ e *anti sense* 5´- TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATA ACG CCA T- 3´ (DOMINGO e colaboradores, 1999). A extensão esperada para o produto desta reação foi 297 pb. Em 25 µL, a mistura para PCR era composta por: tampão de

PCR 1x (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen, 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95ºC por 3 minutos, seguido de 40 ciclos (desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 54ºC por 45 segundos, extensão a 72ºC por 2 minutos) e extensão final a 72ºC por 5 minutos.

O produto amplificado nessa reação foi visualizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK *et al*., 2001) corado pelo nitrato de prata (SANGUINETTI *et al*., 1994).

Como controle positivo, foram utilizadas amostras cuja reação de PCR já havia sido positiva para este gene, submetidas ao seqüenciamento de seu DNA em seqüenciador automático ABI Prism 377 e comparadas às seqüências depositadas nos bancos de dados genômicos públicos para verificar sua autenticidade.

A região S do gene *VacA* (subtipo s1 ou s2) foi amplificada em 100ng de DNA com os oligonucleotídeos iniciadores *sens*e 5'- ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC –3' e *anti sense* 5'- CTG CTT GAA TGC GCC AAA C -3 (ATHERTON *et al.*, 1995). A extensão esperada para o produto desta reação foi 259 pb para o sítio s1 e 286 pb para o sítio s2. Em 25 µL, a mistura para PCR era composta por: tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20 mM (pH 9), KCl 100 mM), 1 U de Amplitaq Gold Applied Biosystems, 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 55ºC por 01 minuto, extensão a 68ºC por 2 minutos) e extensão final a 68ºC por 7 minutos.

O produto amplificado nessa reação foi visualizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK *et al*., 2001) corado pelo nitrato de prata (SANGUINETTI *et al*., 1994).

Como controle positivo, foram utilizadas amostras cuja reação de PCR já havia sido positiva para o gene, submetidas ao sequenciamento de seu DNA em sequenciador automático ABI Prism 377 e comparadas às sequências

depositadas nos bancos de dados genômicos públicos para verificar sua autenticidade.

A região M do gene *VacA* (subtipo m1 ou m2) foi amplificada em 100ng de DNA, em reações individuais: **M1,** com os oligonucleotídeos iniciadores *sens*e 5'-GGT CAA AAT GCG GTC ATG G –3' e *anti sense* 5'- CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC -3', cujos fragmentos esperados possuiam 290 pb (ATHERTON *et al.*, 1995). Em 25 µL, a mistura para PCR era composta por: tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM), 1U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen, 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 52ºC por 01 minuto, extensão a 68ºC por 2 minutos) e extensão final a 68ºC por 7 minutos; **M2**, com os oligonucleotídeos iniciadores *sens*e 5' – GAA CAT GTT TTA GTG AAA GC – 3' e *anti sense* 5' – ATG CTT TAA TAT CGT TGA GA – 3', cujos fragmentos esperados possuiam 192 pb. Em 25 µL, a mistura para PCR era composta por: tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen, 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 ng de cada oligonucleotídeo iniciador. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94ºC por 3 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturação a 94ºC por 40 segundos, anelamento a 57ºC por 40 segundos, extensão a 72ºC por 2 minutos) e extensão final a 72ºC por 7 minutos.

Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK *et al*., 2001) corado pelo nitrato de prata (SANGUINETTI *et al*., 1994).

Como controle positivo, foram utilizadas amostras cuja reação de PCR já havia sido positiva para as regiões estudadas, submetidas ao sequenciamento de seu DNA em sequenciador automático ABI Prism 377 e comparadas às sequências depositadas nos bancos de dados genômicos públicos para verificar sua autenticidade

4.6 Análise de Resultados

Os dados das análises obtidas foram tabulados em planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel® 2010 a partir das quais foram gerados tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada por profissional habilitado. As diferenças significantes estatisticamente foram avaliadas pelos testes do Qui-Quadrado (χ^2) e Exato de Fisher e demais análises que se fizeram necessárias. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando obtidos valores de p menores que 0,05.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da Casuística

Foram analisadas 64 amostras de tumores gástricos, pareadas com seu respectivo tecido normal adjacente, coletadas por ocasião do projeto de doutorado “Análise de Tumores Gástricos Infectados pelos Agentes Tumorigênicos *Helicobacter pylori* e Vírus Epstein Barr" (FERRASI, 2007).

Dentre os casos analisados, a mediana das idades foi 61,5 anos (variando entre 25 e 87 anos). Observou-se que 34,4% (22/64) dos pacientes pertenciam ao sexo masculino e 65,6% (42/64) ao sexo feminino, perfazendo uma razão masculino/feminino igual a 1,91.

Foram analisados pacientes provenientes de dois estados brasileiros, Ceará e São Paulo, 31 e 33 casos, respectivamente.

A tabela 04 apresenta os dados epidemiológicos distribuídos pela procedência de cada paciente.

Tabela 4. Dados Epidemiológicos de Pacientes com Adenocarcinoma Gástrico Distribuídos Distribuído pela Procedência Geográfica das Amostras.

	ESTADOS BRASILEIROS		
	SÃO PAULO (n=33)	CEARÁ (n=31)	*P-value**
Mediana das Idades	64 (37 a 87 anos)	60 (25 a 77 anos)	
Idade			
≤ 50	6 (18,2%)	6 (19,4%)	1.000
> 50	27 (81,8%)	25 (80,6%)	
Sexo			
Masculino	21 (63,6%)	21 (67,7%)	0.7960
Feminino	12 (36,4%)	10 (32,3%)	

*Considera-se P≤ 0.05 = relação estatisticamente significante

As 64 amostras coletadas foram avaliadas quanto à classificação histopatológica de Laurèn (1965). Destas, 41 (64%) casos foram

adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal, 22 (34,4%) foram do tipo difuso e 1 (1,6%) do tipo misto. A tabela 5 apresenta os dados clínico-anatomopatológicos da casuística, distribuída pela procedência geográfica das amostras.

Tabela 5. Dados dados clinico-anatomopatológicos da casuística distribuída pela procedência geográfica das amostras.

	ESTADOS BRASILEIROS		
	SÃO PAULO (n=33)	CEARÁ (n=31)	*P-value**
Classificação Laurèn			
Difuso	6 (18,17%)	6 (19,4%)	0.6249
Intestinal	27 (81,8%)	25 (80,6%)	
Misto	1 (0,03%)	0 (0%)	
Estadio			
0-I	6 (18,2%)	4 (12,9%)	0.1481
II	1 (3%)	6 (19,4%)	
III	16 (48,5%)	10 (32,3%)	
IV	10 (30,3%)	11 (35,5%)	
Metástase Linfonodo			
Ausente	7 (21%)	7 (23%)	1.000
Presente	26 (79%)	24 (77%)	

*Considera-se P≤ 0.05 = relação estatisticamente significante; Teste Exato de Fisher

Dentre os casos do tipo difuso (total de 22 amostras), 14 (63,6%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 8 (36,4%) ao sexo feminino e a mediana das idades foi 58,5 anos (de 25 a 87 anos), menor que para o tipo intestinal (total de 41 amostras), que apresentou mediana das idades igual a 63 anos (entre 37 e 82 anos); sendo 27 (65,85%) pacientes do sexo masculino e 14 (34,15%) do sexo feminino.

5.2 Detecção e Genotipagem de *Helicobacter pylori*

Neste estudo, a presença de *H. pylori* foi avaliada com a amplificação de uma região do gene da *UreaseC* por PCR e todas as amostras apresentaram-se

positivas. A figura 1 apresenta foto ilustrativa das amplificações obtidas com os oligonucleotideos específicos para o gene da UreaseC, utilizados neste trabalho.

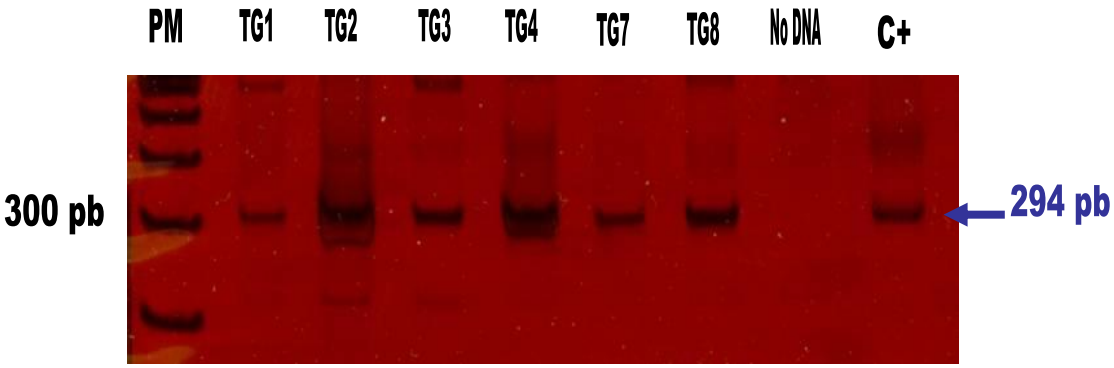


Figura 1 - Gel de poliacrilamida 6% corada por nitrato de prata. A seta indica a amplificação do fragmento do gene da *UreaseC* (294 pb). Marcador de peso molecular *ladder* 100pb (Invitrogen), TG1-TG7(amostras HP+), C+ = controle positivo reação, NoDNA = água + Mistura de PCR.

Dentre as amostras positivas para o gene da UreaseC, ou seja, que confirmavam a presença de *Helicobacter pylori*, 46 (71,8%) foram *Cag*A^{+}. A figura 2 apresenta os resultados da genotipagem *CagA* entre os histotipos intestinal e difuso.

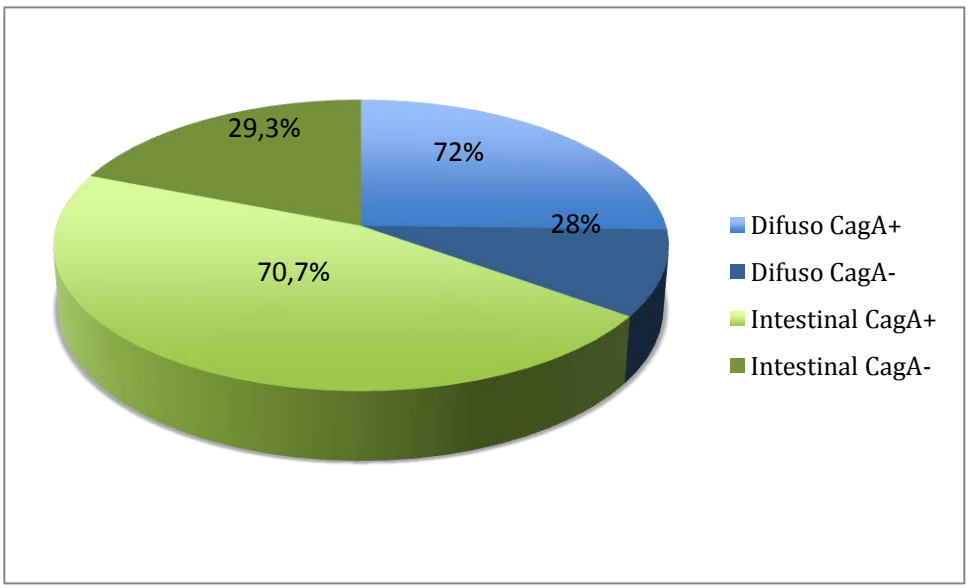


Figura 2: Dados relativos à genotipagem de *Helicobacter pylori* distribuídos por tipo histológico.

A figura 3 apresenta foto ilustrativa das amplificações obtidas com os oligonucleotídeos específicos para o gene *CagA*, utilizados neste trabalho.

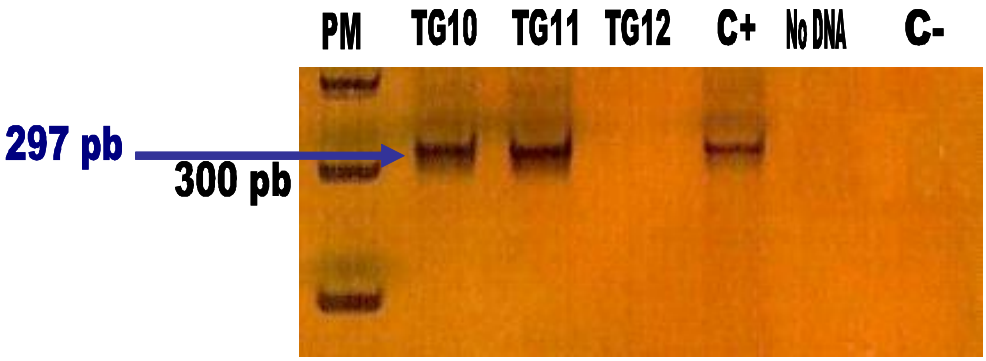


Figura 3. Gel de poliacrilamida 6% corado por nitrato de prata. A seta indica a banda de 297 pb (frag, amplificado do gene CagA). Marcador de peso molecular ladder 100pb (Invitrogen), TG10-TG11 (amostras CagA+), TG12 (amostra CagA), C+ = controle positivo da reação, NoDNA= água + Mistura de PCR, C- = controle negative da reação.

Quando a região do gene bacteriano *VacA* (citotoxina vacuolizante) foi avaliada, o genótipo *VacAs1m1* foi o mais prevalente na amostragem estudada (95,3%).

Evidências de múltipla infecção foram encontradas em 9 amostras, onde os alelos s1 e s2 ou m1 e m2 foram detectados no mesmo paciente; um indivíduo pode hospedar mais do que uma cepa do HP e achados similares são descritos na literatura.

5.3 Análise germinativa do polimorfismo *rs12979860* C/T no gene da IL28B

Em uma análise global, o genótipo CC foi encontrado em 29,7% dos pacientes analisados, já a frequência dos indivíduos heterozigotos (CT) e homozigotos (TT) foram 56,3% e 9%, respectivamente. A frequência alélica de C foi 58% e de T foi 42%.

Para comparação das frequências genotípicas e alélicas entre os casos de câncer gástrico analisados e indivíduos saudáveis, foram utilizadas

informações do banco de dados genômicos (dbSNP) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs12979860). Tais dados são baseados nos resultados provenientes do projeto internacional "Projeto 1000 Genomas" que realizou o sequenciamento do genoma completo de pelo menos 1.000 indivíduos estudados em todo o mundo.

Para a obtenção da frequência desses alelos na população brasileira, foi realizada uma revisão bibliográfica por artigos publicados nos últimos cinco anos que analisaram o polimorfismo em grupos controle compostos por brasileiros doadores de sangue. Foram obtidos somente dois trabalhos com essas características e, por isso, foram incluídos os dados de artigo que apresentava a genotipagem em europeus. A tabela 6 apresenta a frequência genotípica e alélica do polimorfismo nessas populações.

Tabela 6. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *rs12979860* do gene da IL28B em doadores de sangue.

Genótipos	Origem População	FREQUÊNCIA	REFERÊNCIA
CC	Brasil-SC (n=198)	47,4%	Garcia et al., 2014
	Brasil-SP (n=240)	43,8%	Ferreira, 2013
	Européia (n=105)	51,4%	Par et al., 2014
CT	Brasil-SC (n=198)	43,7%	Garcia et al., 2014
	Brasil-SP (n=240)	41,7%	Ferreira, 2013
	Européia (n=105)	37,1%	Par et al., 2014
TT	Brasil-SC (n=198)	8,9%	Garcia et al., 2014
	Brasil-SP (n=240)	14,6%	Ferreira, 2013
	Européia (n=105)	11,4%	Par et al., 2014
Alelos			
C	Brasil-SC (n=198)	69%	Garcia et al., 2014
	Brasil-SP (n=240)	64,6%	Ferreira, 2013
	Européia (n=105)	89%	Par et al., 2014
T	Brasil-SC (n=198)	31%	Garcia et al., 2014
	Brasil-SP (n=240)	35,4%	Ferreira, 2013
	Européia (n=105)	11%	Par et al., 2014

n = número de casos analisados; SC = Estado de Santa Catarina; SP = Estado de São Paulo

A análise comparativa entre as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *rs12979860*, obtidas com as análises do presente estudo e também

de dados disponíveis na literatura e no banco de dados dbSNP está representada na tabela 7.

Tabela 7. Análise comparativa entre as frequências genotípicas e alélicas dos casos de adenocarcinoma gástrico (difuso e intestinal), dos provenientes da literatura atual disponível e do banco de dados dbSNP.

	CÂNCER GÁSTRICO		LITERATURA*	dBSNP**
Genótipos	Difuso	Intestinal		
CC	22,7%	34,1%	44 a 51%	ND
CT	63,6%	53,7%	37 a 44%	ND
TT	13,7%	12,2%	9 a 14%	ND
Alelos				
C	54,5%	61%	65 a 89%	64%
T	45,5%	39%	11 a 35%	36%

* Garcia et al., 2014; Par et al., 2014; Ferreira, 2013; **dbSNP: www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP; ND:dados não disponíveis

Com os achados estatísticos, pode-se observar que a frequência do alelo T, que parece influenciar na diminuição da expressão do gene *IL28B* foi mais alta nos pacientes acometidos por câncer gástrico, em ambos os tipos histológicos, ao compará-la com a frequência observada nas populações usadas como controles.

Digno de nota foi a significante menor frequência do genótipo CC entre os pacientes acometidos por tumores difusos, quando comparados aos indivíduos saudáveis.

A casuística foi composta por pacientes provenientes de dois estados brasileiros, São Paulo e Ceará. As figuras 4 e 5 evidenciam as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo, similar nas duas populações.

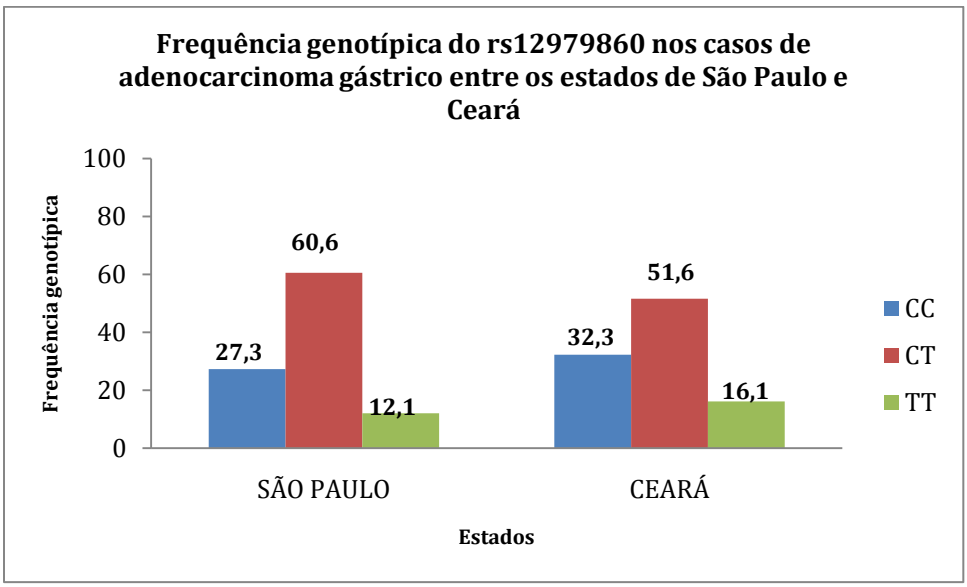
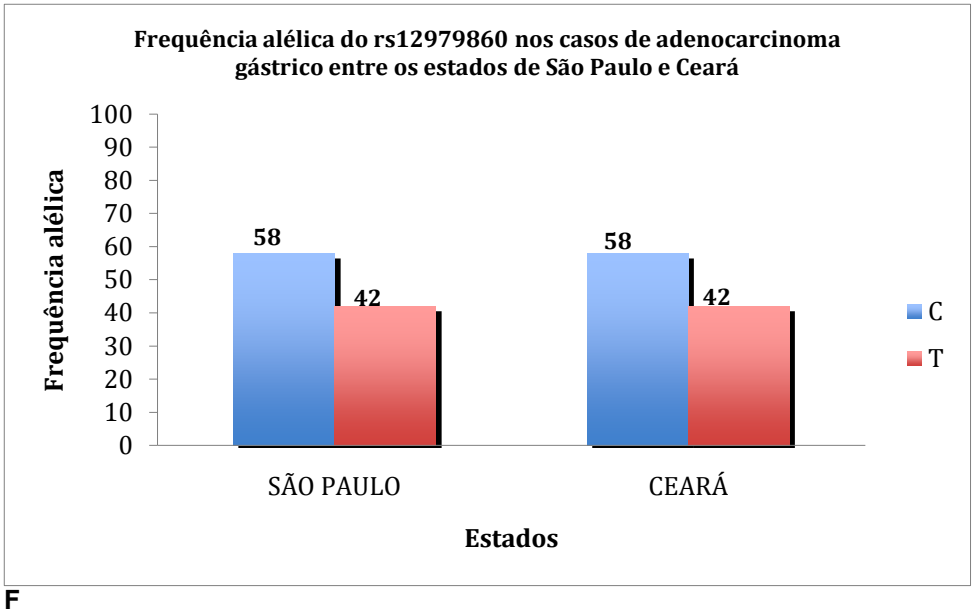


Figura 4 - Distribuição da frequência genotípica de rs12979860 entre os casos de adenocarcinoma gástrico dos estados de São Paulo e Ceará.



F

Figura 5. Distribuição da frequência alélica de rs12979860 entre os casos de adenocarcinoma gástrico dos estados de São Paulo e Ceará.

A tabela 8 demonstra os resultados da genotipagem de rs12979860 distribuídos entre os tipos histológicos de câncer gástrico nos dois estados estudados.

Tabela 8. Frequências Genotípica e Alélica nos Tipos Intestinal e Difuso distribuídas entre os Estados.

	ESTADOS BRASILEIROS					
	SÃO PAULO		*P-value*	CEARÁ		*P-value*
	Intestinal	Difuso		Intestinal	Difuso	
Freq. Genotípica						
CC	30%	20%	0.2337	39%	25%	0.2865
CT	52%	80%		56%	50%	
TT	17%	0%		6%	25%	
Freq. Alélica						
C	57%	58%	0.7742	67%	50%	0.0214*
T	43%	42%		33%	50%	

*Significância Estatística (P≤ 0.05); Teste Exato de *Fisher*

Nos casos provenientes da população cearense, houve associação entre a frequência alélica e o histotipo. O alelo C foi significantemente mais elevado no tipo intestinal quando comparado ao tipo difuso, ressaltando a maior frequência do alelo T nos casos difusos do que nos intestinais.

A relação entre a frequência do polimorfismo rs12989760 e a genotipagem de *Helicobacter pylori* pode ser observada na tabela 9.

Tabela 9. Frequências Genotípica e Alélica nos Tipos Intestinal e Difuso distribuídas pela genotipagem *CagA* de *Helicobacter pylori*.

	CLASSIFICAÇÃO LAURÈN					
	INTESTINAL		*P-value*	DIFUSO		*P-value*
	CagA+	CagA-		CagA+	CagA-	
Freq. Genotípica						
CC	38%	25%	0.024*	25%	17%	0.001*
CT	48%	67%		56%	83%	
TT	14%	8%		19%	0%	
Freq. Alélica						
C	62%	58%	0.6651	53%	58%	0.5694
T	38%	42%		47%	42%	

A análise observada na tabela 9 sugere a importância da relação entre genótipo e infecção por HP *Cag*A^{+}, onde os pacientes portadores da cepa mais patogênica (*Cag*A^{+}) apresentaram frequência maior do genótipo menos protetor (TT), principalmente no histotipo difuso. Essa relação apresentou significância estatística.

Tabela 10. Frequências Genotípica e Alélica nos Tipos Intestinal e Difuso distribuídas pela presença ou ausência de metástases em linfonodos.

	CLASSIFICAÇÃO LAURÈN					
	INTESTINAL		*P-value*	DIFUSO		*P-value*
	MLN+	MLN-		MLN+	MLN-	
Freq. Genotípica						
CC	11 (35%)	3 (30%)	0.8967	3 (16%)	2 (66%)	0.1404
CT	16 (52%)	6 (60%)		13 (68%)	1 (34%)	
TT	4 (13%)	1 (10%)		3 (16%)	0%	
Freq. Alélica						
C	19(62%	58%	0.6651	19 (50%)	5 (83%)	<0.0001*
T	38%	42%		19 (50%)	1 (17%)	

*P value < 0.0001, considerado extremamente significante; Teste Exato de *Fisher*

A frequência alélica foi significantemente associada a ocorrência de metástases nos linfonodos. O alelo C parece proteger da disseminação de células tumorais para os linfonodos no histotipo difuso. Contudo essa relação deve ser interpretada com muita cautela devido ao reduzido número amostral dos casos difusos (n=22).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer gástrico ainda constitui uma neoplasia maligna de relevância na prática clínica e nas políticas públicas de gestão de saúde. Além de possuir uma alta incidência na população em geral, caracteriza-se por um prognóstico ruim, com alta taxa de mortalidade. Com isso, desenvolver estudos que possam contribuir para elucidação dos eventos patológicos que levam ao diagnóstico mais precoce, a tratamento mais específico e benéfico e consequentemente com um melhor prognóstico, torna-se fundamental para alcançarmos uma população com uma melhor qualidade de vida frente às doenças oncológicas que acometem indivíduos em todo o mundo.

Neste contexto, os nossos resultados evidenciaram que a neoplasia maligna de estômago está presente tanto em homens e mulheres, em uma proporção de 1,91, sendo que 34,4% (22/64) dos pacientes pertenciam ao sexo masculino e 65,6% (42/64) ao sexo feminino. Quanto à faixa etária dos mesmos, as idades variaram entre 25 e 87 anos, com valor mediano de 61,5 anos. Analisando-se separadamente os grupos conforme o gênero, detectamos que a faixa etária das pacientes acometidas foi de 25-83 anos (mediana de 60,5 anos) e dos pacientes de sexo masculino, 37-87 anos com mediana de 63,5 anos. Estes dados estão em concordância com os achados epidemiológicos tanto do Brasil como de outros países em que apontam uma maior incidência do câncer gástrico em homens, com idade acima de 50 anos.

Analisando-se a casuística quanto à procedência, os pacientes do estado de São Paulo apresentaram idade entre 37 e 87 anos (mediana de 64 anos), sendo 63% (21/33) do sexo masculino e 36,4% (12/33) do sexo feminino, com uma razão de 1,75 entre homens e mulheres. Os casos do estado do Ceará constituíram-se por pacientes com idade entre 25 e 77 anos (mediana de 60 anos), sendo 67,7% (21/31) homens e 32,3% (10/31) mulheres, perfazendo uma razão de 2,1 entre indivíduos do sexo masculino e feminino. Em ambos estados foi alta a porcentagem dos casos com idade maior que 50 anos, sendo 81,8% (27/33) em São Paulo e 80,6% (25/31) no Ceará, corroborando os dados da literatura quanto à incidência da neoplasia maligna do estômago que pode acometer tanto jovens como idosos, porém com uma maior ocorrência em pacientes em idade adulta.

Quanto à classificação histopatológica segundo Lauren, 41 (64%) dos casos foram adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal, 22 (34,4%) foram do tipo difuso e 1 (1,6%) do tipo misto. Considerando a distribuição das amostras conforme a procedência, no estado de São Paulo foi visualizado 6 (18,17%) do tipo difuso, 27 (81,8%) do tipo intestinal e 1 (0,03%) do tipo misto. No Ceará, em mesma ordem, obteve-se 6 (19,4%), 25 (80,6%) e 0 (%), respectivamente. Tais resultados mostram valores bem próximos quando comparados os dois estados. As lesões do tipo intestinal são as mais frequentes nas regiões de alta incidência de cancer gástrico, bem diferenciadas, dependentes de fatores ambientais e associadas com a presença de lesões pré-cancerosas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia (SHIAO *et al.*, 1997; LAUWERS, 2003; LOPES *et al.*, 2004).

Nos 22 casos de câncer gástrico difuso, 14 (63,6%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 8 (36,4%) ao sexo feminino e a mediana das idades foi 63 anos (variação de 25 a 87 anos), semelhante ao intestinal, que apresentou mediana das idades igual a 63 anos (entre 37 e 82 anos); 27 (65,85%) dos pacientes eram do sexo masculino e 14 (34,15%) do sexo feminino. Dados da literatura apontam que o histotipo intestinal é encontrado predominantemente em indivíduos do sexo masculino e em idades mais avançadas enquanto que o tipo difuso pode acometer pacientes mais jovens e apresentar uma frequência aumentada em mulheres (CÉSAR *et al*., 2002;; NARDONE, 2003; SHANG e PEÑA, 2005; PARKIN *et al.*, 2005). Entretanto, nossos resultados não apresentam diferenças significativas comparando-se as características quanto ao sexo, idade e tipo histológico tumoral dos indivíduos analisados; tendendo a uma certa homogeneidade dos grupos.

Ainda considerando variáveis clínico-anatomopatológicas, 78,8% dos pacientes do estado de São Paulo foram diagnosticados com estadio III e IV e 21,2% em estágio inicial da doença (I e II). No Ceará 67,8% dos pacientes apresentaram lesão tumoral em estádio III e IV e 32,3% em estádio I e II. Embora o estado nordestino tenha apresentado menor porcentagem de tumores mais avançados em comparação com São Paulo, ambos tiveram um alto número de casos em estágio III e IV, corroborando com outros estudos que evidenciam uma maior prevalência de indivíduos diagnosticados com tumores em estadio mais

avançado, com causa provável da detecção tardia da neoplasia.

Quanto à ocorrência de metástase em linfonodos regionais (N), 14/64 (21,88%) casos não tiveram acometimento linfonodal (N0), 25 (39,07%) apresentaram metástase em 1 a 6 linfonodos regionais (N1), 21 (32,8%) tiveram metástase em 7 a 17 linfonodos regionais (N2) e 4 (6,25%) tiveram mais do que 15 linfonodos acometidos. Avaliando-se separadamente cada estado, os números mostram-se distribuídos de forma semelhante, no estado de São Paulo 7/33 (21%) dos pacientes não apresentaram metástase linfonodal e 7/31 (23%) no estado do Ceará com mesma condição. As metástases mostraram-se presentes segundo a distribuição: São Paulo – 11/26 (42,31%) apresentaram metástases em 1 a 6 linfonodos regionais (N1), 14/26 (53,84%) tiveram metástase em 7 a 17 linfonodos regionais (N2) e 1/26 (3,85%) tiveram mais do que 15 linfonodos acometidos e no Ceará - 14/24 (58,34%) apresentaram metástase em 1 a 6 linfonodos regionais (N1), 7/24 (29,16%) tiveram metástase em 7 a 17 linfonodos regionais (N2) e 3/24 (12,50%) tiveram mais do que 15 linfonodos acometidos. A presença de disseminação neoplásica em nódulos linfáticos regionais é condizente com os resultados do estadio tumoral encontrado nos casos analisados; visto que 47/64 (70,15%) dos tumores analisados apresentaram estadio III e IV.

Analisando-se a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, todas as amostras submetidas ao teste da *Urease*C apresentaram-se positivas, sendo que 71,8% demonstraram genotipagem CagA^{+}, resultado próximo ao da literatura que aponta prevalência (60-70%) de cepas *CagA*$^{+}$ presentes em amostras de câncer gástrico (TUMMURU *et al.*, 1995). Evidências de múltipla infecção foram encontradas em 9 amostras, onde os alelos s1 e s2 ou m1 e m2 foram detectados na mesma amostra; um indivíduo pode hospedar mais do que uma cepa do HP e achados similares são descritos por Sicinschi e colaboradores (2003), indicando uma possível co-infecção por duas cepas diferentes do HP. O genótipo *CagA*$^{+}$*s1m1* foi prevalente na amostragem estudada (95,3%).

Nogueira e colaboradores (1993), analisou 19 casos de CG e HP foi detectado em 82,5% dos casos (Minas Gerais), Martins e colaboradores (2002) investigaram 55 pacientes com úlcera gástrica e observaram 93% das amostras infectadas por HP (Belém). Em um outro estudo realizado no estado de Minas

Gerais, Dolores e colaboradores (1998), encontraram 100% (n=16) das amostras de CG infectadas por HP. Yon e colaboradores (2002), analisou 33 casos de CG em pacientes coreanos e detectou 86% de cepas $CagA^+$ (Coréia). Segundo Dolores (1998), a presença de cepas HP $CagA^+$ varia de uma região geográfica a outra, observa-se Japão, Coréia e China (100%), EUA e Europa (~50%) e Canadá (41%). Segundo Domingos e colaboradores, (1999) cepas $CagA^+S1$ estão relacionadas a complicações gástricas mais severas do que $CagA^+S2$. Yon e colaboradores (2002) analisaram 22 amostras de CG e encontraram S1M1 (63,6%), S1M2 (18,2%), e não detectaram S2M1 ou S2M2. Matar e colaboradores (2000) analisaram 40 amostras de pacientes com úlcera duodenal (São Paulo) e observaram cepas 45% (18/40) CagA+S1M1, 5% (02/40) CagA+S1M2, 5% (02/40) CagA+S2M2 e 45% (17/40) Híbridos (tanto $CagA^-$ quanto $CagA^+$).

O modelo da carcinogênese gástrica é descrito como uma série de fases sequenciais, iniciando com uma inflamação ativa crônica em resposta à infecção pelo *Helicobacter pylori* (HP). Infiltração da mucosa gástrica pelos tecidos linfóides associados à mucosa e neutrofilia polimorfonuclear, assim como danos as células epiteliais, caracterizam esta fase. A fase seguinte é dominada por alterações dos ciclos das células epiteliais, especialmente taxas aumentadas de apoptose e proliferação celular. Essas mudanças podem ser responsáveis por uma atrofia multifocal que caracteriza o tipo de gastrite associada com um maior risco de câncer. A terceira fase, a mais avançada do modelo exibe anormalidades nos núcleos e da arquitetura celular, que podem ser representativas de progressivos eventos mutacionais, como seria de se esperar ao observarmos os modelos clássicos de carcinogênese (FEARON & VOLGESTEIN, 1990).

A infecção pelo *H. pylori* é reconhecida como um importante fator de risco para úlceras, adenocarcinomas gástricos e linfomas de MALT. Embora seja uma das bactérias que mais infecta o ser humano em todo o mundo, a maioria dos indivíduos infectada é assintomática e somente uma minoria deles desenvolvem doenças mais severas (CORREA, 2004). A infecção com certos genótipos de *H. pylor*i, entre eles $CagA^+$ e variantes de *VacAs1*, parecem estar associados com a progressão para doenças mais severas, como ulceração

péptica e carcinomas gástricos. O produto do gene *CagA* é uma proteína de membrana externa altamente imunogênica. Embora a presença de uma ilha de patogenicidade funcional *CagA* seja comprovadamente associada com uma maior virulência, medida pela resposta inflamatória do estômago, a função do gene *CagA* ainda permanece por ser descrita detalhadamente.

Relacionando o tipo histológico com a presença da cepa *Cag*A, ambos histotipos apresentaram uma porcentagem maior para a cepa *CagA*$^{+}$, conforme ilustrado na Figura 2. O fator de virulência *CagA*$^{+}$ é fortemente associado ao risco de carcinoma, enquanto que sua ausência implica, quando muito, em um baixo risco para adenocarcinomas difusos (PONZETTO *et al.,* 1996; PARSONNET *et al.*, 1997; COVER *et al.,* 1990).

O polimorfismo rs12979860 tem sido amplamente estudado em todo o mundo. Diversos estudos demonstraram grande associação entre a resposta ao tratamento da hepatite crônico pelo vírus C quanto com o clareamento viral espontâneo (THOMAS, 2009). Entretanto, quando buscamos estudos que relacionem a presença deste polimorfismo com grupos tumorais, poucos dados são encontrados publicados; restringindo-se a estudos com pacientes que desenvolveram hepatocarcinoma com diagnóstico prévio de hepatite viral.

Em relação aos grupos estudados, de forma global, a frequência do alelo C encontrada foi de 58% (tabela 4). Na população de doadores descrita na literatura, a frequência do alelo C verificada foi de 64,6% a 89%. Em contrapartida, a frequência do alelo T foi de 42%, valor maior que os encontrados na literatura em pacientes controles, que apresentaram números entre 11% e 35,4%. Estes resultados aliados aos relatos descritos na literatura sobre este polimorfismo na hepatite C sugerem possivelmente uma relação do alelo T no processo carcinogênico do tumor gástrico.

Quando analisamos a frequência genotípica para o genótipo CC entre os tipos histológicos (tabela 4), notamos em ambos os grupos uma frequência inferior aos dados de referência, sendo encontrados 22,7% no tipo difuso e 34,1% no intestinal. A frequência deste genótipo encontrada na literatura foi de 44 a 51%. Valendo ressaltar que a diferença entre os casos difusos e os dados da literatura foi altamente expressiva, os pacientes do tipo em questão

apresentaram frequência do genótipo CC 51,6% menor que o valor do grupo controle.

Quando analisamos a frequência genotípica do genótipo CT entre os grupos ainda separados pelo tipo histológico, observamos que os valores encontrados em ambos os grupos também mostram-se diferentes dos valores de referência. Nas amostras do tumor do tipo difuso, a frequência do genótipo CT está 69,2% maior que o valor de referência (amostras de câncer gástrico = CC = 63,6% e dados da literatura = CC = 37 a 44%).

Na análise do genótipo TT, os valores encontrados não desviaram do intervalo encontrado na literatura.

Avaliando-se as frequências dos genótipos entre os estados de São Paulo e Ceará, observamos no estado nordestino as frequência do genótipo CC e TT são superiores a de São Paulo e a do genótipo CT inferior. Porém na análise da frequência alélica de C e T, os valores são similares, não apresentando diferenças relevantes entre as regiões estudadas.

Na avaliação das frequências genotípicas e alélicas por tipo histológico nos dois estados estudados, encontramos diferença estatisticamente significativa quanto a distribuição do alelo C nos casos intestinais pertencentes ao estado do Ceará. Direcionando um olhar mais atento para este alelo nas análises realizadas, levando-se em conta o tipo histológico e a origem da população.

A correlação entre os genótipos e alelos avaliados e as cepas de *Helicobacter pylori* detectadas dentro dos tipos histológicos, evidenciou uma forte associação entre os pacientes portadores da cepa mais patogênica (*Cag*A^{+}) e o genótipo menos protetor (TT), inferindo que indivíduos com tumor gástrico do tipo difuso, em contato com cepas *Cag*A+, apresentam uma menor frequência do genótipo CC e uma frequência maior do genótipo TT. Corroborando os resultados vistos anteriormente que associam uma frequência maior deste alelo nas amostras de tumor difuso.

Na ocorrência de metástase em linfonodos regionais, a presença do alelo parece ser de relevância para a disseminação de células tumorais via linfática, principalmente nas amostras dos casos difusos. Entretanto, em vista do baixo número amostral do nosso estudo, torna-se necessário a avaliação de um

grupo com *n* amostral expandido a fim de confirmarmos os valores obtidos nesta pesquisa.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível concluir que:

1) A frequência do polimorfismo rs12979860 nos portadores de câncer gástrico é de 29,7% para o genótipo CC, 56,3% para o genótipo CT e de 9% para o genótipo TT;

2) Os pacientes com tumor do tipo difuso estão associados, independente do estado analisado, com uma maior frequência do alelo T;

3) A presença da cepa mais patogênica do *Helicobacter pylori* aliada ao tipo tumoral difuso está associado com uma maior frequência do alelo T.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Imunidade Tumoral. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, cap. 17, p. 300-315.

ABREU E. **A prevenção primária e detecção do câncer de estômago**. Cad Saúde Pública 1997; 13 (Supl 1):105-8.

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION (ABTA), Gliomas. Chicago, 2012. Disponível em:< http://www.abta.org/understanding-brain-tumors/types-of-tumors/gliomas.html>. Acesso em: 20 jul.2012.

ANK, N.; WEST, H.; PALUDAN, S. R. INF-λ: Novel Antiviral Cytokines. **Journal of Interferon & Cytokine Research,** 2006, v.26, p. 376-379.

ASAHINA, Y.. et al. **Association of Gene Expression Involving Innate Immunity and Genetic Variation in Interleukin 28B with Antiviral Response. Hepatology,** 2012**,** v.55, n.1, p.20-29.

ATHERTON, J. C., H. pylori virulence factors. Br Med Bull., v.54(1), p.105-20, 1998.

ATHERTON, J. C., PEEK, R. M., THAM, K. T., COVER, T. L., BLASER, M. J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolation cytotoxin gene of Helicobacter pylori. Gastroenterology., v.112, p.92-9, 1997.

ATHERTON, J. C., CAO, P., PEEK, R. M. JR., TUMMURU, M. K., BLASER, M. J., COVER, T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem., v.270, p.17771-7, 1995.

BELLANTI, F. et al. The Impact of Interferon Lambda 3 Gene Polymorphism on Natural Course and Treatment of Hepatitis C. **Clinical and Developmental Immunology,** 2012.

BEVAN, S., HOULSTON, R. S. Genetic predisposition to gastric cancer. QJM., v.92(1), p.5-10, 1999.

BIBERT, S. IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. **The Journal of Experimental Medicine,** 2013, v. 210, n.6, p. 1109-1116.

BJÖRKHOLM, B., FALK, P. ENGSTRAND, L. NYRÉN, O. Helicobacter pylori: resurrection of the cancer link. **J Int Med.**, v. 253, p.102-119, 2003.

BOGLIOLO, L. **Patologia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 7 ed., 2006.

BRAND, S. et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. **American Journal Physiology,** 2005**,** v. 289, p.960-968.

BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL. **WHO 2000 Classification of Meningiomas**. Boston, 2012. Disponível em: <http://www.brighamandwomens.org/Departments_and_Services/neurosurgery/meningioma/WHOclassification.aspx>. Acesso em 03 ago 2012.

CARNEIRO MRG, PINTO LFR, PAUMGARTTEN FJR. **Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão toxicologista**. Cad Saúde Publica 1997; 13 (supl 1):27-38.

COVER, T. L., DOOLEY, C. P., BLASER, M. J. Characterization of and human serologic response to proteins in Helicobacter pylori broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect Immun., v.58(3), p.603-10, 1990.

DAFNY, N.; YANG, P. B. **Interferon and the central nervous system. Science Direct, 2005, v. 523, p.1-15.**

de VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, 2006, v.6, p.24-37.

DE VITA VT JR, HELLMAN S, ROSENBERG SA. **Cancer – Principles and practice of oncology**. 5. ed. Philadelphia: *Lippincott-Raven*; v. 1, 1997.

DOORN, L. J., FIGUEIREDO, C., ROSSAU, R., JANNES, R., ASBROECK, M., SOUSA, J. C., CARNEIRO, F., QUINT, W. G. V. Typing of Helicobacter pylori vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hibridization. J Clin Microb., v.36, p.1271-6, 1998

DOYLE, S.E. et al. Interleukin-29 Uses a Type 1 Interferon-Like Program to Promote Antiviral Responses in Human Hepatocytes. **Hepatology,** 2006, v. 44, n. 4.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 2004, v. 4, p.11-22.

DUMOUNTIER, L. et al. Role of the Interleukin (IL)-28 Receptor Tyrosine Residues for Antiviral and Antiproliferative Activity of IL-29/Interferon- λ1. **The Journal of Biological Chemistry,** 2004, v.279, n.31.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. **Cytokines and Advanced Cancer. Journal of Pain and Symptom Manage,** 2000, v.20, n.3, p.214-234.

FOX, B.A.; SHEPPARD, P.O.; O'HARA, P.J. The Role of Genomic Data in the Discovery, Annotation and Evolutionary Interpretation of the InterferonLambda Family. **PLoS ONE**, 2009, v. 4, n.3, 2009.

FUNG, S.K.; LOK, A.S. Treatment of chronic hepatitis B: who to treat, what to use, and for how long?. **Clinical Gastroenterology and. Hepatology,** 2004, v. 2, n. 10, p.839–848.

GO, M. F., CROWE, S. E. Virulence and pathogenicity of Helicobacter pylori. **Gastroenterol Clin North Am.** v. 29, p. 649-70, 2000.

GONZALEZ, C. A., SALA, N., CAPELLA, G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. Int J Cancer, v.100, p.249-260, 2002.

GOODBOURN, S.; DIDCOCK, L.; RANDAL, R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. **Journal of General Virology,** 2000, v.81, n. 10, p.2342-2364.

GUENTERBERG, K.D. et al. Interleukin-29 binds to melanoma cells inducing Jak-STAT signal transduction and apoptosis. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2010, v. 9, n.2, p. 510-520.

IARC, **Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Schistosomes, liver lukes and *Helicobacter pylori.*** Lyon, 1994, p. 1-241.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2012: **Incidência de Câncer no Brasil,** 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>. Acesso em: 28 jul 2014.

ISRAEL, D. A., PEEK, R. M. Review article: pathogenesis of Helicobacter pyloriinduced gastric inflammation. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**., v.15(9), p.1271-1290, 2001

KIRKWOOD, J. M. et al. High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: results of the multicenter eastern cooperative oncology group phase II trial E2696. **Journal of Clinical Oncology**, 2001, v.19, n.5, p.1430–1436.

KONO S, HIROHATA T. **Nutrition and Stomach cancer**. Cancer Causes Controle 1996; 7(1):41-55.

KOTENKO, S.V. et al. IFN-λs mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature Immunology,** 2003, v.4, n.1, p.69–77.

KUIPERS, E. J., PEREZ-PEREZ, G. I., MEUWISSEN, S. G., BLAZER, M. J. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status. J Natl Cancer Inst., v.87(23), p.1777-80, 1995.LATORRE MRDO. **A mortalidade por câncer de estômago no Brasil: análise do período de 1977 a 1989**. Cad Saúde Pública 1997; 13(Supl 1):67-78.

LA VECCHIA, C., NEGRI, E., FRANCESCHI, S., et al. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. Cancer., v.70, p.50–55, 1992.

LIN, S.C. et al. **Profiling the expression of interleukin (IL)-28 and IL-28 receptor a in systemic lupus erythematosus patients. European Journal of Clinical Investigation,** 2012, v.42, n.1, p.61-69.

LIU, T. C. et al. Epigenetic alteration of the *SOCS1* gene in chronic myeloid

leukaemia. **British Journal of Haematology,** 2003, v.123, n.4, p. 654-661.

LOMBARDI, I, A, S. et al. **Metilação e expressão do gene BRCA1 em meningiomas**. 2013. 71 f. Dissertação – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Botucatu, 2013.

MARCELLO, T. et al. Interferons α and λ Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics. **Gastroenterology,** 2006, v. 131, n.6.

MEAGER, A. et al. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. **Cytokine,** 2005, v. 31, n. 2, p. 109– 118.

MILLER, D.M. et al. Interferon lambda as a potential new therapeutic for hepatitis C. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009.

MONDELLI, M.U. et al.. Natural killer cell functional dichotomy: a feature of chronic viral hepatitis? **Frontiers in immunology**, 2012, v. 351, n. 3.

MONTECUCCO, C., RAPPUOLI, R. Living dangerously: How Helicobacter pylori survives in the human stomach. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 2, p. 457-66, 2001.

PARSONNET, J., FRIEDMAN, G. D., ORENTREICH, N., VOGELMAN, H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. Gut., v.40(3), p.297-301, 1997.

PEEK, R. M. JR, BLASER, M. J. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer., v.(1), p.28-37, 2002.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER M.R.. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, 2004,v.202, p.8–32.

PIEMONTI, L.; ZERBI, A.; DI CARLO, V. Strategies For Tumor Immune Escape. **Drugs of Today**, Barcelona, 2003, v. 39, n.9, p.709-724.

PONZETTO, A., DE GIULI, M., SOLDATI, T., SANSEVERINO, P., MORGANDO, A. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status. J Natl Cancer Inst., v.88, p.1000, 1996.

RUDI, J., RUDY, A., MAIWALD, M., KUCK, D., SIEG, A., STREMMEL, W. Direct determination of Helicobacter pylori vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. Am J Gastroenterol., v.94(6), p.1525-31, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2.344p.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques,**

1994, v.17, n.5, p.914-21.

SIPPONEN, P., KIMURA, K. Intestinal metaplasia, atrophic gastritis and stomach cancer: trends over time. Eur J Gastroenterol Hepatol., v.6 Suppl 1, p.S79-83, 1994.

STARK, G.R. et al. HOW CELLS RESPOND TO INTERFERONS. **Annual Review of Biochemistry**, 1998, v. 67, p. 227-264.

STEEN, H.C.; GAMERO, A.M.. Interferon-lambda as a Potential Therapeutic Agent in Cancer Treatment. **Journal of Interferon & Cytokine Research,** 2010, v. 30, n.8, p.579-602.

TAGAWA, M. et al. A Possible Anticancer Agent, Type III Interferon, Activates Cell Death Pathways and Produces Antitumor Effects. **Clinical and Developmental Immunology,** 2011.

TARHINI, A.A.; GOGAS, H., KIRKWOOD, J.M. IFN-α in the treatment of melanoma. **Journal of Immunology,** 2012, v. 189, n.8, p.3789-3793.

TEIXEIRA, J.; NOGUEIRA, M. **Câncer gástrico: fatores de risco em clientes atendidos nos serviços de atenção terciária em um município do interior paulista**. Rev. Latino-Am. Enfermagem, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, Fev. 2003.

TUMMURU, M. K., SHARMA, S. A., BLASER, M. J. Helicobacter pylori picB, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. Mol Microbiol., v.18(5), p.867-76, 1995.

TUMMURU, M. K., COVER, T. L., BLASER, M. J. Cloning and expression of a high- molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun. 1(5): 1799-809, 1993.

VALLE, J., KEKKI, M., SIPPONEN, P., IHAMAKI, T., SIURALA, M. Long-term course and consequences of Helicobacter pylori gastritis. Results of a 32-year follow-up study. Scand J Gastroenterol., v.31, p.546-50, 1996

VÁSQUEZ, C.R.; GÓMEZ, B.P.; DAFNY, N. **Interferon Modulates Central Nervous System Function. Brain Research,** 2012.

XIE, J.Q. et al**. Relationship between the genetic variation in interleukin 28B and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. Chinese Medical Journal,** 2012, v.125, n.13.

Anexos

unesp
Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Ética

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

01

Botucatu, 26 de maio de 2.004

OF 211/2004-CEP
MACAH/asc

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Maria Inês de Moura Campos Pardini
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Maria Inês

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Análise de tumores gástricos infectados pelos agentes tumorigênicos Helicobacter Pylori e e vírus Epstein Barr" a ser conduzido por Adriana Camargo Ferrasi, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Professores Nidia Alice Pinheiro, Silvia H. B. Rabonhorst e Raquel C. Montenegro, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 10 de maio de 2.004.

O CEP esclarece as pesquisadoras que o projeto em questão é parte integrante de outro projeto já aprovado por este CEP e pela CONEP com classificação de área temática especial "Genética Humana". Levando em conta essa informação entramos em contato com a CONEP, através da Drª Gelsha, e obtivemos a informação de que tal projeto também deve ser enviado para análise e parecer, o que estamos fazendo nesta data.

Diante desses esclarecimentos, este projeto somente poderá ser iniciado após a expedição de parecer pela CONEP.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO rs12979860 C/T NO GENE IL28B EM PACIENTES ACOMETIDOS POR CÂNCER GÁSTRICO

Pesquisador: Kelly Cristina Rodrigues de Moura

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37414214.8.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 874.667

Data da Relatoria: 15/11/2014

Apresentação do Projeto:

O câncer gástrico é um dos tipos de câncer mais comum e está associado com uma alta freqüência de mortalidade. A etiologia é complexa e multifatorial, onde a combinação de fatores genéticos e ambientais parecem estar envolvidos na carcinogênese e progressão da doença. A Interleucina 28B (IL28B) parece estar envolvida na resposta imune antiviral e antitumoral.Desta forma, o objetivo deste estudo é determinar a frequência do polimorfismo rs12979860 C/T no gene IL28B em amostras de carcinoma gástrico e associar às caracteristicas clínicas e epidemiológicas desses pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS GERAIS:

- Analisar a frequência do polimorfismo rs12979860 C/T no gene IL28B em pacientes acometidos por câncer gástrico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar a frequência do polimorfismo rs12979860 C/T em amostras de adenocarcinoma gástrico.

Endereço: Chácara Butignoli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** cepeliup@fmb.unesp.br

- Comparar os dados obtidos com a genotipagem de Helicobacter pylori e características clínicas,anatomopatológicas e epidemiológicas desses pacientes,

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: Não se aplica. As amostras já foram coletadas, sendo proposto neste projeto realizar novas análises para expandir o estudos de fatores genéticos.

BENEFÍCIOS: A realização do estudo pode contribuir para ampliar a compreensão de neoplasias gástricas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

METODOLOGIA:

A casuística a ser analisada será composta por 90 amostras (tumor e contrapartida normal do mesmo paciente) coletadas por ocasião do projeto de doutorado "Análise de Tumores Gástricos Infectados pelos Agentes Tumorigênicos Helicobacter pylori e Vírus Epstein Barr" (número de aprovação no CEP 18/01/2004).Tais amostras foram obtidas de pacientes acometidos por tumores gástricos em acompanhamento e tratamento nos hospitais da Faculdade de Medicina de Botucatu e da Universidade Federal do Ceará.

A extração de DNA foi realizada com o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation) segundo as especificações do fabricante. A concentração dos
ácidos nucléicos, após a extração, foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e cada amostra foi avaliada quanto a sua pureza pela razão de absorbância A260/A280nm.Para a análise germinativa do polimorfismo rs12979860 C/T será realizada a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de uma região do gene IL28B. As técnicas de análise estão detalhadamente descritas no texto do projeto.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:amostras suficiente para as análises necessários para o objetivo do estudo.

ORÇAMENTO FINANCEIRO: Serão utilizados insumos de outros projetos que já foram realizados no laboratório de pesquisa em Biologia Molecular do Hemocentro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os documentos exigidos por este colegiado:

- Folha de rosto
- Termo de Compromisso Resolução 466
- Autorização do Hemocentro
- Aprovação CEP Processo 1891/2004.

Os autores solicitam a dispensa do TCLE, pois essa material foi coletado anos atras e muitos desses pacientes perderam seguimento no serviço ou ja faleceram (devido ao mau prognóstico da doença).

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os autores, atendendo a solicitação deste colegiado, apresentaram justificativa plausivel para a dispensa do TCLE, a qual foi acatada. Sendo assim, recomendo a aprovação do estudo, sem necessidade de envio à CONEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião extraordinária do CEP de 17/11/2014, sem necessidade de envio à CONEP.

BOTUCATU, 17 de Novembro de 2014

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br