



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

***Helicobacter pylori* e Polimorfismos em Enzimas de Reparo de DNA
e de Síntese de Óxido Nítrico no Câncer Gástrico**

ISABELLE JOYCE DE LIMA SILVA FERNANDES

**Fortaleza-CE
2010**



ISABELLE JOYCE DE LIMA SILVA FERNANDES

***Helicobacter pylori* e Polimorfismos em Enzimas de Reparo de DNA
e de Síntese de Óxido Nítrico no Câncer Gástrico**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Microbiologia Médica do
Departamento de Patologia e Medicina
Legal da Universidade Federal do Ceará
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Microbiologia Médica**

Orientadora: Professora Dr^a. Sílvia Helena Barem Rabenhorst

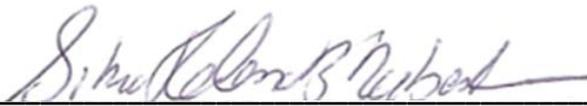
**Fortaleza-CE
2010**

ISABELLE JOYCE DE LIMA SILVA FERNANDES

***Helicobacter pylori* e Polimorfismos em Enzimas de Reparo de DNA
e de Síntese de Óxido Nítrico no Câncer Gástrico**

Aprovada em 02 de agosto de 2010

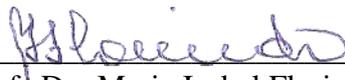
Banca Examinadora



Profa Dra Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa Dra Lucymara Fassarela Agnez Lima
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN



Profa Dra Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará - UFC



Profa Dra Márcia Valéria Pitombeira Ferreira
Universidade Federal do Ceará - UFC

**Ao meu marido, meus pais
e irmã, minha família, que
sempre me apoiou,
incentivou e entendeu todas
as minhas ausências...**

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, pela presença, por me capacitar e me conceder conforto espiritual em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais, José Alves e Francisca, dois exemplos vivos de trabalho e dedicação. Duas pessoas lindas que quanto mais eu conheço, mais amo.

A Maria do Socorro Pereira da Cruz Miatti, um pouco mãe (brava) e um pouco irmã (cúmplice). Agradeço pela sua dedicação e pelo que sua presença significou e significa em minha vida!

A minha irmã Isabel, pela doçura, pela amizade e por sempre ter um tempinho pra me ouvir com palavras de conforto.

Aos meus sogros, Marcos e Margaret, pela presença e pela incalculável ajuda para a execução deste trabalho.

À testemunha ocular da minha vida, meu companheiro e marido, Frederico Brito Fernandes, pela sua incalculável contribuição com o Excel, com a formatação, com o Powerpoint. Por me apoiar diariamente na elaboração desse trabalho (E eu sei que não foi fácil...). Enfim, um agradecimento sincero, que não cabe em palavras.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica representado pelos professores e demais funcionários pelo empenho na formação científica dos pós graduandos.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Aos pacientes incluídos nesse estudo e seus familiares, pela atenção concedida e por nos olharem com olhos de esperança;

A professora Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst, pela dedicada e primorosa orientação, pelos cafés em tardes de domingo, na leitura desse trabalho e pela incansável busca de extrair o que nós temos de melhor;

A Profa. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira e ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes por sempre nos receberem com atenção e por todas as análises anátomo-patológicas e histológicas dos tumores;

Ao laboratório PATHUS[®] no nome da patologista Luciana Gomes Rocha de Arruda, pela prontidão no fornecimento do material clínico oriundo da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza;

Ao Hospital Universitário Walter Cantídeo, à Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza e ao Hospital Geral Cesar Cals por permitir a nos permitir acesso para a execução desse estudo;

Aos participantes da banca, pela presteza em aceitar o convite, pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições;

A Profa. Dra. Lucymara Fassarela Agnez Lima, por ter aceitado me receber em seu laboratório, viabilizando parte desse estudo, e por ter aceitado participar da avaliação desse estudo;

Ao Cirurgião Marco Aurélio Pessoa Barros, pela contribuição no desenvolvimento desse estudo;

A doutoranda Rita de Cássia Barbosa, por sua doçura, por ultrapassar a relação profissional e conseguir reacender a nossa criança interior, e também pela agradável sensação de bem estar que sentimos quando nos aproximamos;

A doutoranda Valeska Portela Lima, por sua dedicação à pesquisa, por sempre compartilhar seus muitos conhecimentos com humildade e por sempre estar pronta para ajudar alguém; Amiga, você ensina pelo exemplo!

A doutoranda Markênia Kélia Santos Alves, por sua alegria, dedicação à pesquisa e presteza em fazer as coisas acontecerem.

A mestranda Ana Paula Santos do Carmo, por seu incansável dinamismo e pelo seu comprometimento com a pesquisa;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular-LABGEM: Débora, Denise, Patrícia, Vilena, Marcos, Pedro, Igor, Eduardo, Francivandi, Renata, pelo apoio, ensinamentos e pela agradabilíssima convivência.

A todos que fazem parte da minha vida, ainda que distantes, a minha sincera gratidão.

**Para ganhar conhecimento, adicione
coisas todos os dias.
Para ganhar sabedoria, elimine
coisas todos os dias.**

Lao-Tsé

RESUMO

O câncer gástrico apresenta, mundialmente, uma elevada taxa de mortalidade, com alta incidência no Brasil, sendo a infecção com *Helicobacter pylori* um fator de risco bem estabelecido. Dependendo da presença de genes de virulência como *cagA*, *cagE*, *vacA* e *virB11*, *H. pylori* pode causar respostas inflamatórias diferenciadas, apresentando grande quantidade de óxido nítrico (ON) gerado principalmente por iNOS. Quantidade elevada de ON resulta em acúmulo de espécies reativas do oxigênio cuja instabilidade causa danos oxidativos no DNA. A integridade genômica é garantida por enzimas de reparo importantes como: APE-1, OGG-1, e PARP-1. Polimorfismos genéticos que modifiquem a atividade dessas enzimas podem influenciar a capacidade de reparo e, portanto, a susceptibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento do câncer gástrico associado à *H. pylori*. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a associação dos polimorfismos C150T em *iNOS*, T2197G em *APE-1*, C1245G em *OGG-1* e A40676G em *PARP-1* com o genótipo de *H. pylori* em 109 amostra de pacientes diagnosticados com adenocarcinomas gástricos atendidos em hospitais de Fortaleza, Ceará. A identificação dos polimorfismos foi feita por PCR-RFLP e a detecção e genotipagem de *H. pylori* foram feitas por PCR. Os polimorfismos estudados apresentaram as seguintes frequências: iNOS - 78% CC, 21,1% CT e 0,9% TT; PARP-1- 69,7% AA, 26,6% AG e 3,7% GG, para OGG-1 56% CC, 39,4% CG, e 4,6% GG e para APE-1 38,5%TT, 47,7%TG e 13,8% GG. Salienta-se a baixa frequência do genótipo polimórfico (TT) de iNOS e alta frequência do heterozigoto (TG) de APE. Os alelos variantes de iNOS e de PARP-1 foram correlacionadas com indivíduos ≤ 55 anos, sugerindo que estes polimorfismos estariam associados ao desenvolvimento precoce da neoplasia. Os tumores intestinais localizados na região não-antro correlacionaram-se com o genótipo OGG-1 CG; enquanto que os difusos, localizados no corpo com o genótipo AA de PARP-1. *H. pylori* foi detectada em 92,6% dos casos. Os genes *cagA*, *cagE* e *virB11* foram detectados em 65,3%, 50,4% e 60,3% dos casos, respectivamente e *vacAs1m1* detectado em 72,2%. Os casos foram agrupados considerando os alelos de *vacA* e a integridade da ilha de patogenicidade *cag*, sendo os grupos A1 e A2, composto por cepas mais patogênicas, o qual foi observado em 33,6% e 13,8% dos pacientes, respectivamente. Na análise individual de cada enzima, observou-se que os indivíduos portadores dos alelos variantes de APE-1 (TG+GG) estavam infectados com cepas pouco patogênicas ($p=0,0422$). Essas cepas pouco patogênicas também foram associadas aos pacientes portadores do genótipo selvagem (AA) de PARP-1 ($p=0,0396$). Esses dados foram confirmados quando os pacientes infectados por cepas mais virulentas foram comparadas aos infectados por cepas menos virulentas ($p=0,046$). Analisando apenas o grupo A1 observou-se também uma correlação de APE-1 (TG) com OGG-1(CC). Quando os genótipos foram combinados considerando somente as enzimas de reparo estudadas ou duas a duas, verificou-se que parte dos pacientes infectados com o genótipo selvagem de PARP-1 eram portadores do alelo variante para pelo menos uma das enzimas e que parte dos pacientes infectados com cepas menos patogênicas possuíam o alelo polimórfico de APE-1, independente do genótipo da enzima de reparo associada. Somados, esses dados indicam a relevância do polimorfismo da APE-1 no desenvolvimento do câncer gástrico em indivíduos infectados com cepas menos virulentas e corroboram com a importância do genótipo bacteriano, uma vez que, de maneira geral, indivíduos com genótipo selvagem para as enzimas de reparo estudadas desenvolveram câncer gástrico quando infectados por cepas virulentas.

Palavras-chave: câncer gástrico; enzimas de reparo; *Helicobacter pylori*; polimorfismo genético

ABSTRACT

Gastric cancer is the most deadly malignant neoplasia worldwide, with high incidence in Brazil and *Helicobacter pylori* infection is a well-established risk factor. Depending on the presence of virulence genes such as *cagA*, *cagE*, *vacA* and *virB11*, *H. pylori* can cause differentiated inflammatory responses, with large amounts of nitric oxide (NO) generated primarily by iNOS. High amount of NO resulting in accumulation of reactive oxygen species can cause DNA oxidative damage. The genomic integrity is guaranteed by important repair enzymes as: APE-1, OGG-1 and PARP-1. Genetic polymorphisms that modify the activity of these enzymes may influence the ability to repair and therefore the host susceptibility to the development of gastric cancer *H.pylori* associated. Therefore, the goal of this study was to evaluate the association of the C150T polymorphism in *iNOS*, T2197G in *APE-1*, C1245G in *OGG-1* and A40676G in *PARP-1* with *H.pylori* genotype in 109 cases of patients with gastric adenocarcinoma from hospitals in Fortaleza, Ceará. The identification of polymorphisms was performed by PCR-RFLP and the detection and genotyping of *H.pylori* were performed by PCR. The studied polymorphisms showed the following frequencies: *iNOS* 78% CC, 21.1% CT and 0.9% TT; *PARP-1* 69.7% AA 26.6% AG and 3.7% GG to *OGG-1* 56% CC, 39.4% CG and 4.6% GG and *APE-1* 38.5% TT, 47.7% TG and 13.8% GG. Valuable to note the low frequency of the homozygous polymorphic (TT) of *iNOS* and the high frequency of heterozygous (TG) from *APE-1*. The variant alleles of *iNOS* and *PARP-1* were correlated with subjects ≤ 55 years, suggesting that these polymorphisms were associated with early development of the neoplasia. Intestinal tumors located in the non-antrum were correlated with heterozygous genotype of *OGG-1* (CG), while diffuse, located on the body with the AA genotype of *PARP-1*. *H. pylori* was detected in 92.6% of cases. The genes *cagA*, *cagE* and *virB11* were detected in 65.3%, 50.4% and 60.3% of cases respectively and *vacAs1m1* was detected in 72.2%. The cases were also grouped considering the alleles of *vacA* and the integrity of the *cag*-pathogenicity island. Thus, the groups A1 and A2, consist of more pathogenic strains, were observed in 33.6% and 13.8% of patients, respectively. In the individual analysis of each enzyme, we observed that individuals carrying the variant alleles of *APE-1* (TG+GG) were infected with low pathogenic strains ($p=0.0422$). These low pathogenic strains were also associated with patients carrying the wild genotype (AA) of *PARP-1* ($p=0.0396$). These data were confirmed when patients infected with more virulent strains were compared to those infected with less virulent strains ($p = 0.046$). Analyzing only the group A1, it was also observed a correlation of *APE-1* (TG) with *OGG-1* (CC). When genotypes were combined by considering only the repair enzymes studied or two by two, it was found that most patients infected with the wild-type of *PARP-1* were carriers of the variant allele for at least one of the enzymes and that most patients infected with less pathogenic strains possess a polymorphic allele of *APE-1*, independent of the genotype associated with the repair enzyme. Taken together, these data indicate the relevance of the *APE-1* polymorphism in the development of gastric cancer in individuals infected with less virulent strains and corroborate the importance of the bacterial genotype, since; in general, individuals with wild-type for enzymes repair studied developed gastric cancer when infected with virulent strains.

Keywords: gastric cancer; repair enzymes, *H. pylori*, genetic polymorphism

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| 8-oxo-G | 8-oxo-7,8-diidroguanina. (Produto da oxidação da guanina) |
| aa | Aminoácidos |
| Ala | Aminoácido Alanina |
| AP | apurínicos/apirimidínicos |
| APE-1 | Endonuclease apurínica/apirimidínica-1 |
| Asn | Aminoácido Asparagina |
| BER | Reparo por excisão de bases |
| Cag-PAI | Ilha de patogenicidade cag |
| CTAB | <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> |
| Cys | Aminoácido Cisteína |
| Da | Dalton |
| Glu | Aminoácido Ácido glutâmico |
| IL | Interleucina |
| iNOS | Enzima Óxido Nítrico Sintetase induzível |
| Leu | Aminoácido Leucina |
| NER | Reparo por excisão de nucleotídeos |
| OGG-1 | Enzima 8-oxoguanina DNA glicosilase |
| ON | Óxido Nítrico |
| PARP-1 | Enzima Poli (ADP-Ribose) Polimerase-1 |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| RFLP | Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) |
| ROS | Espécies reativas do oxigênio |
| Ser | Aminoácido Serina |
| SNP | Polimorfismo em um único de nucleotídeo |
| Val | Valina |

LISTA DE REAGENTES

| | |
|-----------------------------|--|
| 2-Mercaptoetanol | Amresco |
| Agarose | GibcoBRL |
| Álcool isoamílico | Synth |
| <i>Bfa</i> I | New England BioLabs® Inc. |
| BSA | New England BioLabs® Inc. |
| <i>Bst</i> UI | New England BioLabs® Inc. |
| Clorofórmio | Vetec |
| CTAB | Amresco |
| Deoxinucleotídeos | Invitrogen |
| DEPC | Sigma |
| EDTA | Invitrogen |
| <i>Fnu</i> 4HI | New England BioLabs® Inc. |
| Go Taq Flexi DNA Polimerase | Promega |
| Isopropanol | Vetec |
| KCl | Merck |
| MasterMix | Promega |
| MgCl ₂ | Invitrogen |
| NaCl | Amresco |
| Platinum Taq DNA polimerase | Invitrogen |
| Poliacrilamida | Bioamérica |
| <i>Primers</i> | Integrated DNA Technologies (IDT) - Prodimol |
| Tampão | Invitrogen |
| Tris-HCl | Bioamérica |
| <i>Tsp</i> 509I | New England BioLabs® Inc. |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| TABELA 1: DEFINIÇÃO DO TNP PATOLÓGICO ¹ | 12 |
| TABELA 2: AGRUPAMENTO POR ESTADIAMENTO ¹ | 12 |
| TABELA 3: EXEMPLOS DE DIFERENÇAS NA PREVALÊNCIA DE <i>H. PYLORI</i> DENTRO E ENTRE PAÍSES REPRESENTANDO PAÍSES DESENVOLVIDOS E EM DESENVOLVIMENTO ¹ | 15 |
| TABELA 4: VANTAGENS E DESVANTAGENS DE ALGUNS TESTES DIAGNÓSTICOS DE <i>H. PYLORI</i> | 16 |
| TABELA 5: DETALHES DAS PCR'S PARA OS GENES DE <i>H. PYLORI</i> | 41 |
| TABELA 6: DETALHES DAS PCR'S PARA OS GENES DAS ENZIMAS DE REPARO E DE SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO | 46 |
| TABELA 7: DETALHE DO POLIMORFISMO ÚNICO DE NUCLEOTÍDEO (SNP) DAS ENZIMAS ESTUDADAS | 47 |
| TABELA 8: CORRELAÇÃO ENTRE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS E OS GENÓTIPOS DAS ENZIMAS | 54 |
| TABELA 9: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS NOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS E SÍTIOS ANATÔMICOS | 55 |
| TABELA 10: FREQUÊNCIA DOS GENES DE <i>H. PYLORI</i> DISTRIBUÍDOS QUANTO AOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS | 56 |
| TABELA 11: DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS NOS GRUPOS DE <i>H. PYLORI</i> | 59 |
| TABELA 12: DISTRIBUIÇÃO DOS AGRUPAMENTOS POSSÍVEIS DOS GENES DAS ENZIMAS NOS GRUPOS DE <i>H. PYLORI</i> | 66 |
| TABELA 13: FREQUÊNCIA DAS ASSOCIAÇÕES DOS GENES DAS ENZIMAS DE REPARO COMPARADAS COM AS CEPAS MAIS E MENOS VIRULENTAS | 68 |
| TABELA 14: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DO POLIMORFISMO C150T DO GENE <i>INOS</i> | 72 |
| TABELA 15: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DO POLIMORFISMO A40676G DO GENE <i>PARP-1</i> | 76 |
| TABELA 16: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DO POLIMORFISMO C1245G DO GENE <i>OGG-1</i> | 77 |
| TABELA 17: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DO POLIMORFISMO T2197G DO GENE <i>APE-1</i> | 78 |

Lista de Quadros

| | |
|--|----|
| QUADRO 1: CORRELAÇÕES ENTRE OS GENES DE <i>H. PYLORI</i> E OS GENÓTIPOS DAS ENZIMAS | 57 |
| QUADRO 2: CORRELAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DE <i>H. PYLORI</i> E OS GENÓTIPOS DAS ENZIMAS | 61 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1: SÍTIOS ANATÔMICOS DO ESTÔMAGO. FONTE: SABERNAWEB | 10 |
| FIGURA 2: ADENOCARCINOMA GÁSTRICO [A] TIPO INTESTINAL FONTE: HARTGRINK, ET AL., 2009 E [B] TIPO DIFUSO FONTE: ESPEJO E NAVARRETE, 2003 | 11 |
| FIGURA 3: ESQUEMA DO MODELO DE CARCINOGENESE GÁSTRICA SUGERIDO POR CORREA (TRADUZIDO DE CORREA, 1992)..... | 13 |
| FIGURA 4: HELICOBACTER PYLORI A) MICROGRAFIA ELETRÔNICA B) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA MOSTRANDO A FORMA, FLAGELO POLAR, URÉASE, CANAL DE URÉIA E A PRODUÇÃO DE AMÔNIA, A QUAL NEUTRALIZA O AMBIENTE ACÍDICO EM AMARELO, O CITOSOL E O AMBIENTE IMEDIATAMENTE AO REDOR DA BACTÉRIA (AZUL). (TRADUZIDO DE MONTECUCCO E RAPPUOLI, 2001) | 18 |
| FIGURA 5: MODELO DAS ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS PELA CITITOXINA VACA. A) A TOXINA É UM OLIGÔMERO. B) ELA SE LIGA À PORÇÃO APICAL DAS CÉLULAS EPITELIAIS E SE INSERE NA MEMBRANA PLASMÁTICA, FORMANDO UM CANAL SELETIVO HEXAMÉRICO DE BAIXA CONDUTÂNCIA. ESTES CANAIS LIBERAM BICARBONATO E ÂNIONS ORGÂNICOS DO CITOSOL FAVORECENDO O CRESCIMENTO BACTERIANO. OS CANAIS DE TOXINA SÃO LENTAMENTE ENDOCITADOS E FORMAM O COMPARTIMENTO ENDOSSOMAL, AUMENTANDO A SUA PERMEABILIDADE A ÂNIONS QUE SE ACUMULAM NO ENDOSSOMO E FAVORECE O INFLUXO DE ÁGUA INCHAÇO DA VESÍCULA, UM PASSO ESSENCIAL NA FORMAÇÃO DO VACÚOLO. PO UM MECANISMO AINDA NÃO IDENTIFICADO, A TOXINA VACA ALTERA AS JUNÇÕES CELULARES E AUMENTA A PERMEABILIDADE A FERRO, NÍQUEL E OUTROS NUTRIENTES ESSENCIAS PARA O CRESCIMENTO DE <i>H. PYLORI</i> NA MUCOSA SUBJACENTE. (TRADUZIDO DE MONTECUCCO E RAPPUOLI, 2001)..... | 19 |
| FIGURA 6: ILHA DE PATOGENICIDADE CONTENDO GENES QUE MOSTRAM MARCANTE VARIAÇÃO DE SEQUÊNCIA. AS PROTEÍNAS CODIFICADAS PELOS GENES DA ILHA ESTÃO ENVOLVIDAS EM DOIS PROCESSOS PRINCIPAIS: A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-8 (IL-8) PELAS CÉLULAS EPITELIAIS GÁSTRICAS E A TRANSLOCAÇÃO DE CAGÁ DA BACTÉRIA PARA A CÉLULA DO HOSPEDEIRO. TODOS OS GENES REPRESENTADOS POR SETAS EM TONS ESCUROS DE VERMELHO E VERDE INDICAM GENES QUE SÃO ESSENCIAIS PARA INDUÇÃO DE IL-8; CONSIDERANDO OS TONS MAIS CLAROS DE VERMELHO E VERDE, INDICAM OS GENES QUE NÃO ESTÃO ENVOLVIDOS NESTE PROCESSO. AS SETAS MARCADAS COM UM PONTO VERMELHO INDICAM OS GENES QUE NÃO SÃO NECESSÁRIOS PARA A TRANSLOCAÇÃO DE CAGÁ, OS GENES NÃO MARCADOS, SÃO ESSENCIAIS PARA A TRANSLOCAÇÃO. TRADUZIDO DE SUERBAUM E JOSENHANS (2007)..... | 21 |
| FIGURA 7: ENTREGA DE CAGÁ ÀS CÉLULAS EPITELIAIS GÁSTRICAS VIA SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO IV. AS PROTEÍNAS COMPONDO ESTE SISTEMA SÃO CODIFICADAS PELOS GENES PRESENTES NA CAG-PAI. NO INTERIOR DA CÉLULA EPITELIAL GÁSTRICA, CAGÁ É FOSFORILADA E PERTURBA A SINALIZAÇÃO INTRACELULAR (TRADUZIDO DE HATAKEYAMA, 2009) | 22 |
| FIGURA 8: IDEOGRAMA REPRESENTATIVO DA LOCALIZAÇÃO DO GENE [A] <i>PARP-1</i> , [B] <i>OGG-1</i> , [C] <i>APE-1</i> E [D] <i>iNOS</i> , NOS CROMOSSOMOS HUMANOS. FONTE: NCBI..... | 24 |
| FIGURA 9: ESQUEMA PATOGENÉTICO DA CARCINOGENESE GÁSTRICA (TRADUZIDO DE MONTECUCCO E RAPPUOLI, 2001)..... | 25 |
| FIGURA 10: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO REPARO POR EXCISÃO DE BASE (CASTRO-JUNIOR, 2009)..... | 27 |
| FIGURA 11: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA POLI(ADP)-RIBOSILAÇÃO NO REPARO DE DNA. [A] ESQUEMA DA COENZIMA RESPIRATÓRIA NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (NAD ⁺); [B] A FORMAÇÃO DE QUEBRAS NO DNA ATIVAM AS POLIADP-RIBOSE-POLIMERASES (PARP1 E PARP2) QUE CATALISAM A POLIMERIZAÇÃO DE ADP-RIBOSE (BOLHA AZUL) USANDO COMO SUBSTRATO O NAD ⁺ , COM A LIBERAÇÃO DA NICOTINAMIDA E POSTERIORMENTE FIXANDO VÁRIAS MOLÉCULAS DE ADP-RIBOSE EM PROTEÍNAS-ALVO (TRADUZIDO DE POURQUIER, 2006) | 30 |
| FIGURA 12: PADRÃO DE CLIVAGEM E DE CORRIDA DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DOS GENES <i>APE-1</i> E <i>OGG-143</i> | |
| FIGURA 13: PADRÃO DE CLIVAGEM E DE CORRIDA DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>PARP-1</i> | 44 |
| FIGURA 14: PADRÃO DE CLIVAGEM E DE CORRIDA DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO GENE <i>iNOS</i> | 45 |
| FIGURA 15: PERCENTUAL DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO DISTRIBUÍDO QUANTO [A] AO GÊNERO, [B] FAIXA ETÁRIA [C] GÊNERO E FAIXA ETÁRIA E [D] LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA DO TUMOR | 49 |
| FIGURA 16: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO QUANTO AO ESTADIAMENTO DO TUMOR | 49 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 17: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO QUANTO AO TAMANHO DO TUMOR | 49 |
| FIGURA 18: PERCENTUAL DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO DISTRIBUÍDO [A] QUANTO À CLASSIFICAÇÃO DE LAUREN, [B] QUANTO À FAIXA ETÁRIA NOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS, [C] QUANTO AO GÊNERO NOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS, [D] QUANTO AO ESTADIAMENTO NOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS | 50 |
| FIGURA 19: FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS ENZIMAS [A] <i>iNOS</i> , [B] <i>PARP-1</i> , [C] <i>OGG-1</i> E [D] <i>APE-1</i> NOS 109 CASOS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO ESTUDADOS | 51 |
| FIGURA 20: EXEMPLOS DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO EM GÊIS DE POLIACRILAMIDA: [A] <i>APE-1</i> (M) MARCADOR DE 50PB, (1) HOMOZIGOTO SELVAGEM, (2) HOMOZIGOTO PARA O ALELO VARIANTE E (3) HETEROZIGOTO [B] <i>iNOS</i> (M) MARCADOR DE 100PB, (1) PRODUTO DE PCR, (2) HOMOZIGOTO SELVAGEM, (3) HETEROZIGOTO E (4) HOMOZIGOTO PARA O ALELO VARIANTE [C] <i>PARP-1</i> (M) MARCADOR DE 100PB, (1) HOMOZIGOTO SELVAGEM, (2) HETEROZIGOTO, (3) HOMOZIGOTO PARA O ALELO VARIANTE [D] <i>OGG-1</i> (M) MARCADOR DE 100 PB (1) HOMOZIGOTO SELVAGEM, (2) HOMOZIGOTO PARA O ALELO VARIANTE, (3) HETEROZIGOTO..... | 52 |
| FIGURA 21: DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DAS ENZIMAS [A] <i>iNOS</i> , [B] <i>PARP-1</i> , [C] <i>OGG-1</i> E [D] <i>APE-1</i> NAS FAIXAS ETÁRIAS..... | 53 |
| FIGURA 22: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO SEGUNDO O GENÓTIPO DE <i>iNOS</i> E QUANTO À PATOGENICIDADE DAS CEPAS INFECTANTES | 61 |
| FIGURA 23: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO SEGUNDO O GENÓTIPO DE <i>PARP-1</i> E QUANTO À PATOGENICIDADE DAS CEPAS INFECTANTES. * $P < 0,05$ | 62 |
| FIGURA 24: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO SEGUNDO O GENÓTIPO DE <i>APE-1</i> E QUANTO À PATOGENICIDADE DAS CEPAS INFECTANTES. * $P < 0,05$ | 63 |
| FIGURA 25: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO SEGUNDO O GENÓTIPO DE <i>OGG-1</i> E QUANTO À PATOGENICIDADE DAS CEPAS INFECTANTES | 63 |
| FIGURA 26: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE CÂNCER GÁSTRICO SEGUNDO A PATOGENICIDADE DAS CEPAS INFECTANTES DE <i>H. PYLORI</i> NOS CASOS HOMOZIGOTO SELVAGEM PARA O GENE DE CADA ENZIMA DE REPARO ESTUDADA. * $P < 0,05$ | 64 |
| FIGURA 27: DISTRIBUIÇÃO DOS POSSÍVEIS GRUPOS FORMADOS A PARTIR DAS DIFERENTES COMBINAÇÕES POSSÍVEIS DOS GENÓTIPOS DAS ENZIMAS DE REPARO E DE SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO | 65 |
| FIGURA 28: GRÁFICO ILUSTRATIVO DA INFLUÊNCIA DO ALELO VARIANTE DE <i>iNOS</i> NA IDADE DO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER GÁSTRICO..... | 74 |
| FIGURA 29: GRÁFICO ILUSTRATIVO DA INFLUÊNCIA DO ALELO VARIANTE DE <i>PARP-1</i> NA IDADE DO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER GÁSTRICO. | 75 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 | EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER GÁSTRICO..... | 9 |
| 1.2 | CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS | 9 |
| 1.3 | <i>HELICOBACTER PYLORI (H. PYLORI)</i> | 14 |
| 1.3.1 | <i>Helicobacter pylori e a Colonização</i> | 17 |
| 1.3.2 | <i>Variabilidade Genética e Patogenicidade</i> | 18 |
| 1.4 | INFECÇÃO POR <i>H. PYLORI</i> E RESPOSTA DO HOSPEDEIRO | 22 |
| 1.4.1 | <i>O óxido nítrico como mediador da resposta do hospedeiro</i> | 23 |
| 1.4.2 | <i>Óxido Nítrico Sintetase induzível (iNOS)</i> | 23 |
| 1.4.3 | <i>Danos ao DNA e sistema de reparo na infecção por H. pylori</i> | 25 |
| 1.4.4 | <i>8-oxoguanina DNA glicosilase-1 (OGG-1)</i> | 27 |
| 1.4.5 | <i>Endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE-1)</i> | 27 |
| 1.4.6 | <i>Poli (ADP-ribose)polimerase-1 (PARP-1)</i> | 28 |
| 1.5 | POLIMORFISMOS DE UM ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS – SNPs) EM GENES DE REPARO E DE SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CÂNCER GÁSTRICO | 30 |
| 1.6 | PERGUNTAS DE PARTIDA..... | 33 |
| 1.7 | HIPÓTESE DE TRABALHO..... | 34 |
| 2 | OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 35 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 35 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 3.1 | CASUÍSTICA..... | 36 |
| 3.2 | ASPECTOS ÉTICOS | 36 |
| 3.3 | COLETA DE DADOS | 37 |
| 3.4 | AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA | 37 |
| 3.5 | EXTRAÇÃO DO DNA DE ESPÉCIMES CONGELADOS | 37 |
| 3.6 | DETECÇÃO DE <i>H. PYLORI</i> | 38 |
| 3.6.1 | <i>Presença e subtipos do gene vacA de H. pylori</i> | 39 |
| 3.6.1.1 | <i>vacA s1 e s2</i> | 39 |
| 3.6.1.2 | <i>vacA m1 e m2</i> | 39 |
| 3.6.2 | <i>Detecção do gene cagA</i> | 40 |
| 3.6.3 | <i>Detecção do gene cagE</i> | 40 |
| 3.6.4 | <i>Detecção do gene virB11</i> | 40 |
| 3.7 | DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO..... | 42 |
| 3.7.1 | <i>APE-1 e OGG-1</i> | 42 |
| 3.7.2 | <i>PARP-1</i> | 43 |
| 3.7.3 | <i>iNOS</i> | 44 |
| 3.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 47 |
| 4 | RESULTADOS | 48 |
| 4.1 | ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS | 48 |
| 4.2 | ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS | 49 |
| 4.3 | FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS DE REPARO DO DNA E DE SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO | 50 |
| 4.3.1 | <i>Associação dos polimorfismos com os parâmetros epidemiológicos e histopatológicos</i> | 52 |
| 4.4 | DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DA BACTÉRIA <i>HELICOBACTER PYLORI</i> | 55 |
| 4.5 | ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS ESTUDADAS COM OS GENES DE <i>H. PYLORI</i> | 56 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.6 | ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS ESTUDADAS CONSIDERANDO OS GENÓTIPOS DE <i>H. PYLORI</i> | 58 |
| 4.7 | COMPARAÇÕES ENTRE CEPAS DE <i>H. PYLORI</i> DE ALTA E BAIXA PATOGENICIDADE | 61 |
| 4.8 | ANÁLISE DOS GENES DE <i>H. PYLORI</i> COM OS POLIMORFISMOS DAS QUATRO ENZIMAS ASSOCIADOS | 64 |
| 5. | DISCUSSÃO | 69 |
| 5.1 | ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER GÁSTRICO | 69 |
| 5.2 | FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS C150T DE iNOS, T2197G DE APE-1, A40676G DE PARP-1 E C1245G DE OGG-1 E ASSOCIAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS | 71 |
| 5.3 | ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DO CÂNCER GÁSTRICO | 79 |
| 5.4 | FREQUÊNCIA E GENOTIPAGEM DE <i>H. PYLORI</i> | 79 |
| 5.5 | GENES DE <i>H. PYLORI</i> E OS POLIMORFISMOS DO HOSPEDEIRO | 81 |
| | PERSPECTIVAS | 89 |
| | CONCLUSÕES | 90 |
| | REFERÊNCIAS | 91 |
| | ANEXOS | 102 |
| | ANEXO I - PROTOCOLO DE COLETA NO CENTRO CIRÚRGICO | 103 |
| | ANEXO II - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA | 104 |
| | ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 105 |
| | ANEXO IV - CADASTRO DE PACIENTES SUBMETIDOS À COLETA DE TECIDO DE PEÇA CIRÚRGICA | 107 |
| | ANEXO V - TABELA DE ANÁLISE DAS TRÊS ENZIMAS DE REPARO | 109 |

1 Introdução

1.1 Epidemiologia do Câncer Gástrico

O câncer gástrico é o quinto tipo de câncer mais comum e a segunda causa de mortes por neoplasias no mundo, apesar da sua incidência e mortalidade terem diminuído bastante nos últimos 70 anos (CREW e NEUGUT, 2006). Dessa forma, esses tumores representam um grave problema de saúde pública (WEN e MOSS, 2009) que acomete os homens cerca de duas vezes mais que as mulheres (CESAR et al., 2002). Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostram que o número de casos novos de câncer de estômago estimados para o Brasil, no ano de 2010 é de 13.820 homens e de 7.680 mulheres acometidos. O Nordeste possui elevada prevalência dessa neoplasia, especialmente o estado do Ceará, onde tumores gástricos representam o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens e o terceiro entre as mulheres (INCA, 2010).

1.2 Características Hitopatológicas

O câncer gástrico pode se localizar na região proximal do estômago (cárdia, fundo), do corpo e na porção distal (antro, piloro) (Figura 1). Os tumores gástricos proximais têm aumentado nas últimas décadas e apresentam um prognóstico menos favorável comparado àqueles tumores em outros sítios anatômicos. Diferenças entre o tumor localizado na cárdia e na região não-cárdia sugerem que eles representam doenças distintas com etiologias diferentes (KONTUREK, et al., 2006).

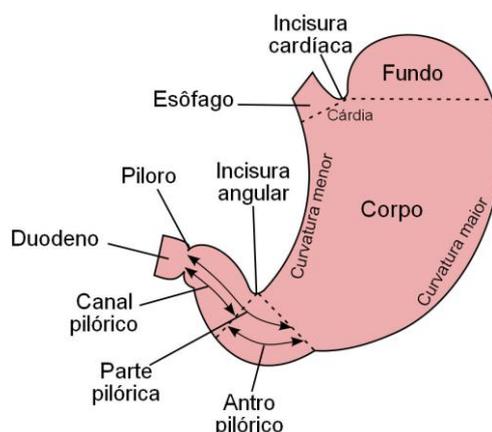


Figura 1: Sítios anatômicos do estômago. Fonte: SABERNAWEB

Microscopicamente, determina-se a classificação histológica do carcinoma gástrico, a classificação de Lauren, a classificação Tumor-Nodo-Metástase (TNM), e o estadiamento do tumor.

A classificação histológica do câncer gástrico divide esses tumores em dois tipos principais: não-epiteliais e epiteliais. Dentre os tumores epiteliais, estão incluídos os adenocarcinomas, que representam de 90 a 95% dos tumores gástricos (WERNER et al., 2001).

Os adenocarcinomas gástricos apresentam uma diversidade de arranjos histológicos. Assim, baseado em aspectos morfológicos, vários sistemas de classificação histológica têm sido propostos, no entanto, a classificação mais comumente utilizada nos países ocidentais é a classificação de Lauren (1965), que divide o adenocarcinoma gástrico em dois tipos histologicamente distintos: o tipo intestinal e o tipo difuso (Figura 2). Esses exemplares histológicos diferem entre si com relação às características epidemiológicas e prognósticas (BORK e BARONE, 2007; ESPEJO e NAVARRETE, 2003; IARC,2000).

O adenocarcinoma do tipo intestinal em geral apresenta-se moderadamente ou bem diferenciado, mostrando microscopicamente um padrão glandular semelhante à mucosa intestinal, com células coesas que formam estruturas tubulares, comumente acompanhado por formação papilar ou componentes sólidos. Em contraste, o subtipo difuso, de pior prognóstico, consiste em células pobremente coesivas resultando em pequenos grupos ou mesmo em células tumorais solitárias, sem formação de estruturas glandulares, apresentando algumas vezes um vacúolo citoplasmático claro (WU, et al., 2006; HARTGRINK, et al., 2009).

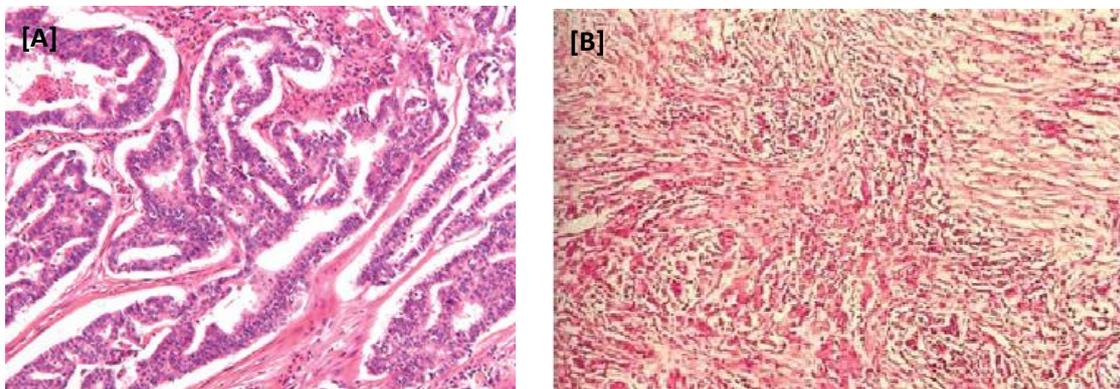


Figura 2: Adenocarcinoma gástrico [A] tipo intestinal Fonte: HARTGRINK, et al., 2009 e [B] tipo difuso Fonte: ESPEJO e NAVARRETE, 2003

Existem dois sistemas principais usados para classificar o estadiamento do câncer gástrico: o da "*Japanese Classification of Gastric Cancer*" (JCGC) e o Tumor-Nodo-Metástase (TNM) da "*International Union Against Cancer*" (UIAC) (HARTGRINK, et al., 2009). Na classificação patológica pTNM, resultante da avaliação patológica dos espécimes retirados cirurgicamente ou a partir de biópsias, são avaliados parâmetros como a profundidade do tumor (T), a presença de linfonodos comprometidos (N), e a presença de metástases à distância (M). Tabela 1 (WERNER et al., 2001).

Tabela 1: Definição do TNP patológico¹**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

¹Traduzido de IARC 2000.

Baseado nesta classificação é estabelecido o estadiamento do tumor, classificado em quatro estádios (I - IV). Os estádios I e II podem ser agrupados como de baixo grau, enquanto III e IV são denominados de alto grau, os quais compreendem cerca de 65% de todos os tumores e apresentam um pior prognóstico (Tabela 2) (WERNER et al., 2001).

Tabela 2: Agrupamento por Estadiamento¹

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

¹Traduzido de IARC 2000.

O câncer gástrico tem etiologia multifatorial, sendo que a associação com a infecção causada pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é bem estabelecida, sendo fortemente aceito que esse microorganismo é o principal iniciador da inflamação e das alterações

atróficas na mucosa gástrica, e é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como carcinógeno tipo I desde 1994 (KONTUREK, et al., 2006).

Assim, o desenvolvimento e a progressão do câncer gástrico caracterizam um processo multifatorial e bastante complexo, no qual, segundo o conceito original proposto por Correa (1992), a infecção por *H. pylori* dirige uma sequência de lesões precursoras caracterizadas por uma cascata de mudanças na mucosa gástrica que progridem a partir da mucosa normal, evoluindo para gastrite crônica, desenvolvendo-se, posteriormente, em gastrite atrófica com metaplasia intestinal, culminando com displasia e, por fim, com câncer gástrico do tipo intestinal (Figura 3). Segundo esse modelo, este seria o tipo histológico mais associado à infecção por *H. pylori*; outros estudos, porém, não encontraram diferença significativa no que se refere à prevalência de *H. pylori* entre os tipos intestinal e difuso (PARSONNET et al., 1991; BURUK et al., 1993; HANSSON et al 1995). Entretanto, os mecanismos exatos pelos quais *H. pylori* atua ainda são pouco conhecidos.

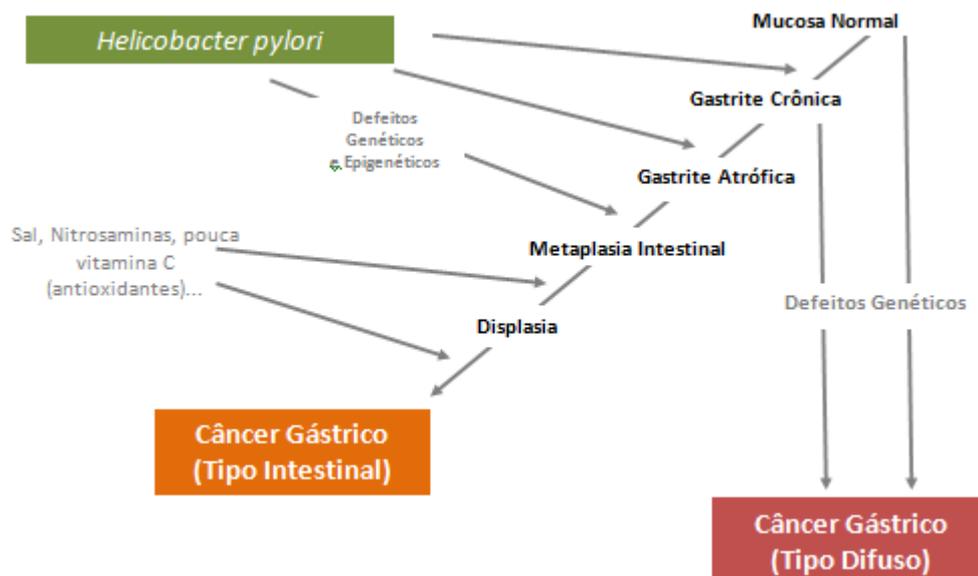


Figura 3: Esquema do modelo de carcinogênese gástrica sugerido por Correa (Traduzido de Correa, 1992)

1.3 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

A bactéria *H. pylori* foi descrita em 1983 por Robin Warren e Barry Marshall, que ganharam o Prêmio Nobel em 2005 por essa descoberta. Essa bactéria é caracterizada como gram-negativa, microaerofílica, flagelada, espiralada e curvada. Apresenta de 0,5 a 0,9µm de largura e 2 a 4µm de comprimento. Essa espécie está classificada no Domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Epsilonproteobacteria, na ordem Campylobacterales, na família Helicobacteraceae e no gênero *Helicobacter* (GOODWIN, et al., 1989; OWEN, 2001; MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001; NCBI). Essa bactéria tem sido descrita em forma de bacilo ou espiralada nas quais se divide ativamente, ou na forma cocóide que não é cultivável, embora seja viável (LIU, et al., 2006).

H. pylori coloniza o estômago de mais de 50% da população mundial, ou seja, mais de 3 bilhões de pessoas (Tabela 3) e a colonização geralmente ocorre durante a infância. Este microorganismo é considerado um dos mais bem sucedidos patógenos bacterianos e tem-se sugerido que *H. pylori* provavelmente parasita o ser humano há dezenas de centenas de anos e, como patógeno, apresenta um modo de ação lento (SUERBAUM e JOSEPHANS, 2007), cujas vias de transmissão não são completamente entendidas, sendo aceitas: (1) a via fecal-oral, característica de países em desenvolvimento, na qual a água poderia ser o veículo; e (2) a via gastro-oral e oral-oral, prevalente em países desenvolvidos (LEHOURS, et al., 2007; KHALIFA et al., 2010).

A alta prevalência mundial da infecção tem estimulado o desenvolvimento de vários métodos para o diagnóstico da infecção por *H. pylori*. Tais métodos classificam-se como invasivos ou não invasivos (CEREZO, et al., 2006). Existem pelo menos sete ensaios diagnósticos para detecção desse microorganismo (Tabela 4).

Tabela 3: Exemplos de diferenças na prevalência de *H. pylori* dentro e entre países representando países desenvolvidos e em desenvolvimento¹

| País | Número de casos estudados | Faixa etária | Prevalência |
|--------------------------------|---------------------------|----------------|-------------|
| Brasil | | | |
| <i>Rural</i> | 40 (crianças) | < 20 anos | 77,5% |
| <i>Urbano</i> | 164 (adultos) | 20-90 anos | 84,7% |
| <i>Comunidade Urbana Pobre</i> | 363 | > 20 anos | 63,4% |
| Colômbia (rural) | 684 | 2-9 anos | 69% |
| China | | | |
| <i>Sudeste da China</i> | 1727 | N/A | 44,2% |
| <i>Hong Kong</i> | 397 | 36-65 | 58,6% |
| Egito | | | |
| <i>Alexandria (Nordeste)</i> | 169 mães | N/A | 88% |
| | 169 crianças | <1 ano | 13% |
| | | 1,5 anos | 25% |
| <i>Cairo (central)</i> | 52 | < 6 anos | 33% |
| | 56 | >6 anos | 60% |
| Índia | 238 | 3-70 anos | 79% |
| México | 11605 | 20-90 anos | 66% |
| Nepal (rural) | 1142 | 4-93 anos | 56,8% |
| Peru | 407 | 2meses-12 anos | 48% |
| | 104 | 0-17 | 50% |
| Rússia | 213 | 20-75 anos | 88% |
| Arábia Saudita | 557 | 5-10 anos | 40% |
| | | > 20 anos | 70% |
| Taiwan | 823 | 1-40 anos | 54% |
| Países Desenvolvidos | | | |
| Austrália | 273 | 19-47 anos | 23% |
| Dinamarca | 3589 | 30-60 anos | 25,9% |
| Alemanha | 260 | 18-61 anos | 39,2% |
| Israel (rural) | 377 | 30-90 anos | 72% |
| Japão | 4361 | 19-69 anos | 30% |
| Holanda | 254 | 11-89 anos | 27,2% |
| Nova Zelândia | 579 | 40-64 anos | 56% |
| Espanha | 332 | >18 anos | 43% |
| Coréia do Sul | 161 | 20-75 anos | 75% |
| Suiça | 176 | 10-20 anos | 7,3% |
| Reino unido | | | |
| <i>Inglaterra</i> | 267 | >18 anos | 41% |
| <i>Irlanda do Norte</i> | 4742 | 12-64 anos | 50,5% |
| Estados unidos | | | |
| <i>Carolina do Sul</i> | 938 soldados do exército | 17-26 anos | 26% |
| | 324 negros | | 44% |
| | 47 espanhóis | | 38% |
| | 536 brancos | | 14% |
| <i>Califórnia</i> | 556 | 20-39 anos | 27% |
| <i>Texas</i> | 246 negros | 15-80 anos | 70% |
| | 239 brancos | | 34% |

¹ Traduzido de: KHALIFA et al., 2010

Tabela 4: Vantagens e desvantagens de alguns testes diagnósticos de *H. pylori*

| Método | Vantagens | Desvantagens | Refs. |
|--|--|--|---|
| Cultura bacteriana (colônias pequenas, acinzentadas, translúcidas e fracamente β-hemolíticas); | O isolamento da cepa; | Invasivo; Baixa Sensibilidade quando o número de organismos presente é pequeno; Dificuldade em se cultivar devido à sua natureza fastidiosa e crescimento lento; | KONEMAN 2008; HE, et al., 2002 |
| Teste rápido da uréase; | Rápido; Barato; | Invasivo; Baixa Sensibilidade quando o número de organismos presente é pequeno; Pode não ser específico na presença de outras bactérias urease-positivas; | HE, et al., 2002; |
| Teste respiratório com ureia marcada com carbono 13; | Não Invasivo; Rápido; Barato; | Baixa Sensibilidade quando o número de organismos presente é pequeno; | HE, et al., 2002; |
| Histologia; | Barato; | Baixa Sensibilidade quando o número de organismos presente é pequeno; Invasivo; | HE, et al., 2002; |
| Teste do antígeno fecal; | Não invasivo; Relativamente barato; Sensível (92-94%) e Específico (92-95%) para indivíduos não tratados; | Baixa Sensibilidade (40%) cerca de quatro semanas após a erradicação da bactéria; | CARTÁGENES, et al., 2009; HE, et al., 2002; |
| Sorologia; | Alta Sensibilidade quando o número de organismos presente é pequeno; Não Invasivo; | Pode não diferenciar a infecção ativa de uma infecção passada; Especificidade 83% | WGO, 2006; HE, et al., 2002; |
| Reação em cadeia da polimerase (PCR); | Alta Sensibilidade quando o número de organismos presente é pequeno; Rápido; Altamente Sensível; Altamente Específico; Realizável em material fresco, bem como em parafina | Invasivo; | HE, et al., 2002; FRANCISCO-JUNIOR, et al., 2004 |

Dentre esses testes, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), uma técnica altamente sensível, detecta de maneira específica seqüências de ácidos nucleicos da bactéria (HE, et al., 2002; KONEMAN, 2008; CARTÁGENES, et al., 2009; WGO, 2006; FRANCISCO-JUNIOR, et al., 2004).

1.3.1 *Helicobacter pylori* e a Colonização

Desde que *H. pylori* foi descrita, vários estudos têm sido feitos no sentido de determinar a patogenicidade deste microorganismo e sua relação com distúrbios gástricos, dentre eles o câncer de estômago (LADEIRA et al., 2003) ficando evidente que fatores ambientais, genéticos (do hospedeiro) e aspectos bacterianos (relacionados à virulência da cepa infectante), estão associados com o aumento da intensidade da inflamação e, conseqüentemente, com o aumento do risco de desenvolver esta neoplasia (HARTGRINK, et al., 2009).

Assim, observou-se que para o sucesso da infecção por *H. pylori*, interagem vários fatores bacterianos. Dentre eles, a enzima urease é um fator de vital importância para a colonização, pois lhe permite resistir e se adaptar ao ácido clorídrico, sobrevivendo à acidez gástrica e atravessando o lúmen do estômago. Essa enzima converte a uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, em amônia e bicarbonato (TOMBOLA et al., 2001) promovendo a alcalinização local e resultando no aumento do pH periplasmático e do microambiente próximo, prevenindo acúmulo tóxico de uréia dentro da bactéria e protegendo esse patógeno dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago (Figura 4) (WEEKS e SACHS, 2001). Para a colonização, a bactéria precisa atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico. Assim, lipases e proteases sintetizadas por *H. pylori* degradam essa camada facilitando a etapa de colonização. Além disto, *H. pylori* move-se facilmente devido à sua morfologia em espiral e aos seus flagelos, atravessando a camada de muco e estabelecendo íntimo contato com as células epiteliais de revestimento (LADEIRA et al., 2003). Os fatores de aderência da bactéria contribuem para a sua fixação ao epitélio gástrico favorecendo também o processo de colonização (PRINZ et al., 2001).

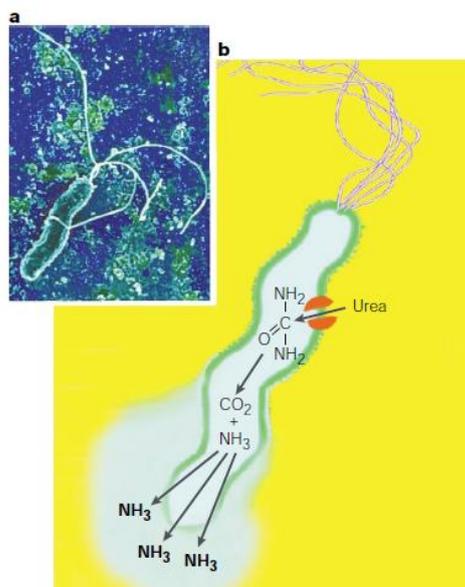


Figura 4: *Helicobacter pylori* a) Micrografia eletrônica b) Representação esquemática mostrando a forma, flagelo polar, uréase, canal de uréia e a produção de amônia, a qual neutraliza o ambiente ácido em amarelo, o citosol e o ambiente imediatamente ao redor da bactéria (azul). (Traduzido de MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001)

1.3.2 Variabilidade Genética e Patogenicidade

O genoma de *H. pylori* é relativamente pequeno, com aproximadamente 1,4 – 1,73 Mb; exibe porém, uma notável variabilidade genética entre as cepas, o que pode acarretar respostas distintas do hospedeiro, de maneira que algumas cepas bacterianas podem causar resposta inflamatória mais severa que outras (ZAWILAK e ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA, et al., 2001; LADEIRA et al., 2003). Assim, apenas uma pequena porcentagem da população colonizada (2-5%) progride para câncer gástrico, enquanto que a maioria exibe lesões benignas assintomáticas (RAMÍREZ RAMOS e SANCHEZ SANCHÉS, et al., 2008).

Um fator importante na virulência de *H. pylori* é o gene *vacA* (*vacuolating cytotoxin A*), presente em todas as cepas de *H. pylori*. Este gene codifica uma potente toxina vacuolizante que é secretada no espaço extracelular e é internalizada por endocitose pela

célula do hospedeiro, induzindo alterações nas junções celulares e a formação de largos vacúolos intracelulares, culminando com a morte celular (Figura 5) (MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001; FUKUTA, et al., 2002).

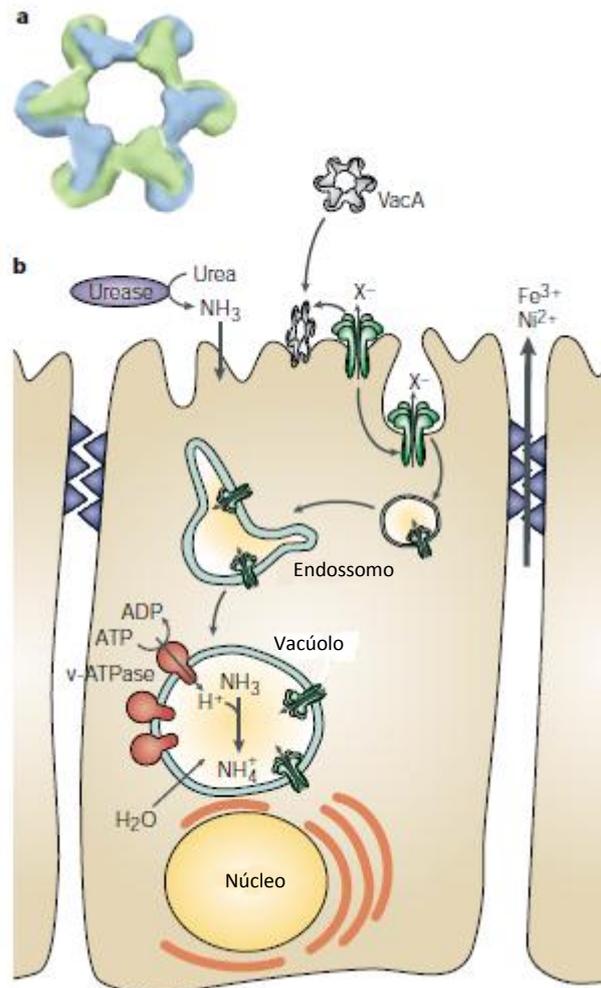


Figura 5: Modelo das alterações celulares induzidas pela citotoxina VacA. A) A toxina é um oligômero. B) Ela se liga à porção apical das células epiteliais e se insere na membrana plasmática, formando um canal seletivo hexamérico de baixa condutância. Estes canais liberam bicarbonato e ânions orgânicos do citosol favorecendo o crescimento bacteriano. Os canais de toxina são lentamente endocitados e formam o compartimento endossomal, aumentando a sua permeabilidade a ânions que se acumulam no endossomo e favorece o influxo de água inchaço da vesícula, um passo essencial na formação do vacúolo. Por um mecanismo ainda não identificado, a toxina VacA altera as junções celulares e aumenta a permeabilidade a ferro, níquel e outros nutrientes essenciais para o crescimento de *H. pylori* na mucosa subjacente. (Traduzido de MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001)

Variações alélicas específicas do gene *vacA* exibem diferentes níveis de atividade da toxina e são associados a diversos riscos de doenças gastrintestinais. A região sinal (s) deste gene codifica parte do peptídeo sinal da citotoxina e a porção N-terminal, enquanto a região do meio (m) codifica parte da subunidade C-terminal. Existem dois tipos de região sinal (s1 e s2) e da região do meio (m1 e m2); e as diferentes combinações possíveis entre esses alelos causam diferenças na atividade vacuolizante individual de cepas de *H. pylori* (ATHERTON et al., 1995). As cepas portadoras do genótipo *vacA* s1m1 produzem grande quantidade de citotoxina, enquanto as cepas s1m2 produzem quantidade moderada e as cepas s2m2, pouca ou nenhuma citotoxina (SUGIMOTO e YAMAOKA, 2009). Foi reportado na literatura que a combinação s2m1 ocorre de maneira rara, sugerindo que os portadores desses alelos sofrem desvantagem seletiva que compromete a viabilidade bacteriana; embora os fatores que determinam essa desvantagem não tenham sido identificados (DE FRANCESCO et al., 2008)

Um dos principais determinantes da virulência de *H. pylori* é a ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI) (FIGURA 6), que comporta cerca de 31 genes, alguns dos quais estão envolvidos em codificar componentes do sistema de secreção do tipo IV (FUKUTA, et al., 2002). Esse sistema de secreção atua como agulha e serve para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que este microorganismo module vias do metabolismo celular do hospedeiro (COVACCI et al. 2000). Dentre os genes da ilha, destaca-se o gene *cagA* (*cytotoxin associated gene A*), localizado na extremidade direita da ilha e considerado marcador de integridade de *cag*-PAI. Esse gene codifica uma proteína de mesmo nome, altamente imunogênica (SUGIMOTO e YAMAOKA, 2009). Foi relatado inclusive, que indivíduos infectados com cepas *cagA*(+) têm probabilidade três vezes maior de desenvolver câncer gástrico do que aqueles infectados por cepas *cagA*(-) (DING, et al., 2004). Na infecção crônica com cepas *cagA*(+), as células epiteliais gástricas são continuamente expostas à injeção desta proteína, que é transportada via sistema de secreção do tipo IV para a

célula hospedeira, onde desregula a sinalização intracelular provocando alterações no citoesqueleto, que resultam no fenótipo *hummingbird* (REYES-LEON, et al., 2007), e destroem a arquitetura epitelial normal.

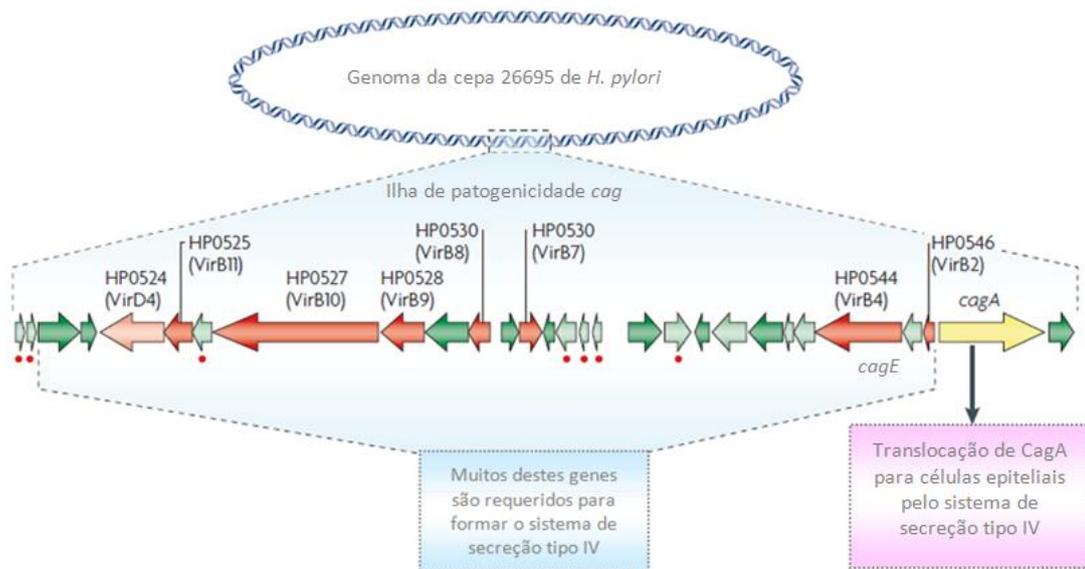


Figura 6: Ilha de patogenicidade contendo genes que mostram marcante variação de sequência. As proteínas codificadas pelos genes da ilha estão envolvidas em dois processos principais: a indução da produção de interleucina-8 (IL-8) pelas células epiteliais gástricas e a translocação de CagA da bactéria para a célula do hospedeiro. Todos os genes representados por setas em tons escuros de vermelho e verde indicam genes que são essenciais para indução de IL-8; considerando os tons mais claros de vermelho e verde, indicam os genes que não estão envolvidos neste processo. As setas marcadas com um ponto vermelho indicam os genes que não são necessários para a translocação de CagA, os genes não marcados, são essenciais para a translocação. Traduzido de SUERBAUM e JOSEPHANS (2007)

Outros dois genes da ilha de patogenicidade com alta frequência nas cepas relacionadas com o câncer gástrico são *cagE* e *virB11* (LIMA, et al., 2010). *cagE* (*cytotoxin associated gene E*), localizado no lado direito da ilha, é associado à construção do sistema de secreção do tipo IV. Também foi relatado que *cagE* está associado à indução de IL-8 em células epiteliais gástricas, além de ter sido considerado como melhor marcador de integridade *cag*-PAI (OWEN et al., 2001; FUKUTA et al., 2002; SOZZI et al., 2005).

virB11, localizado do lado esquerdo da ilha, codifica a proteína VirB11 que apresenta estrutura composta por 6 monômeros que além de exibir atividade de ATPase, compõe juntamente com outras proteínas o sistema de secreção do tipo IV (Figura 7) (BACKERT et al., 2008; NGUYEN et al., 2008).

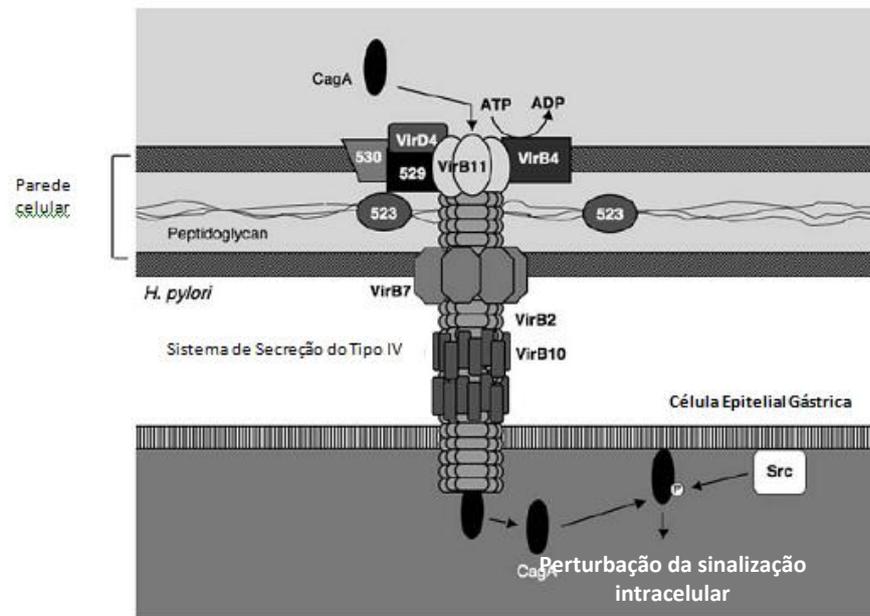


Figura 7: Entrega de *cagA* às células epiteliais gástricas via sistema de secreção do tipo IV. As proteínas compondo este sistema são codificadas pelos genes presentes na *cag*-PAI. No interior da célula epitelial gástrica, *cagA* é fosforilada e perturba a sinalização intracelular (Traduzido de HATAKEYAMA, 2009)

1.4 Infecção por *H. pylori* e resposta do hospedeiro

Uma vez instalada a infecção por *H. pylori*, o hospedeiro gera uma resposta imunológica na qual há predomínio da produção de anticorpos e de citocinas, contribuindo para o processo inflamatório (LADEIRA et al., 2003). Os fatores de virulência (*cagA*, *cagE* e *vacA*) aumentam a inflamação da mucosa gástrica e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α (SUGIMOTO e YAMAOKA, 2009). Uma associação entre inflamação crônica e o aumento do risco de câncer já foi, inclusive, estabelecida (BARTSCH, 2006).

No processo inflamatório, gerado em resposta à infecção por *H. pylori*, ocorre o recrutamento de diferentes fagócitos, tais como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, para o local da injúria onde geram mediadores, como o óxido nítrico e espécies reativas do oxigênio (ROS), em resposta a produtos da parede celular bacteriana.

1.4.1 O óxido nítrico como mediador da resposta do hospedeiro

O Óxido Nítrico (ON) é um gás envolvido em muitos processos fisiológicos dos mamíferos, incluindo a neurotransmissão, o controle da pressão sanguínea, a inflamação, as reações imunológicas e os mecanismos de defesa contra microorganismos (ação antibacteriana, antiparasítica e antiviral). Entretanto, dependendo da quantidade gerada, esse gás pode levar à morte celular e a danos teciduais decorrentes do acúmulo de espécies reativas do oxigênio (ROS), de maneira que o descontrole na síntese de ON está relacionado à origem de várias patologias, incluindo o câncer (COSTA, et al., 2003).

1.4.2 Óxido Nítrico Sintetase induzível (iNOS)

Em mamíferos, três isoformas de óxido nítrico sintetases foram identificadas. NOS I (NOS1, ncNOS), NOS II (NOS2, iNOS) e NOS III (NOS3, ecNOS), as quais são codificadas por três genes distintos. As isoformas NOS I e NOS III são constitutivamente expressas e reguladas por Ca^{2+} e calmodulina, sintetizando óxido nítrico (ON) por curtos períodos. Por outro lado, a expressão da isoforma NOS II é induzida pela combinação de lipopolissacarídeos e de certas citocinas. Sua atividade é grande ou completamente independente de Ca^{2+} e apresenta papel de destaque na resposta inflamatória, uma vez que o óxido nítrico é sintetizado, principalmente por esta enzima, por longos períodos (FORSTERMANN et al., 1998; COSTA, et al., 2003; GOTO et al., 2006).

O gene de iNOS localiza-se no cromossomo 17q11.2-q12 (Figura 8), apresenta um tamanho de 43.763pb, composto por 27 éxons e codifica uma proteína de 131.117Da, composta por 1153aa (UCSC-Genome Bioinformatics; Genecards V3). Esse gene apresenta outras designações como, NOS tipo II, hepatócito NOS e óxido nítrico sintetase 2A (NOS2A).

Já foi demonstrado que durante a fase inicial da infecção por *H. pylori* ocorrem altos níveis de expressão de iNOS e de danos oxidativos no DNA das células da mucosa gástrica (CHANG, et al., 2004; LADEIRA et al., 2003) em decorrência do acúmulo de ROS. Demonstrou-se, ainda, que a própria *H. pylori* gera ROS por meio de seu metabolismo, levando a altas concentrações dessas moléculas nas células epiteliais gástricas (DING et al., 2004; NAGATA et al., 1998).

ROS são geradas em níveis normais endogenamente na respiração, durante o metabolismo celular aeróbico, na resposta inflamatória, e na exposição a diversos agentes químicos e físicos. No entanto, essas moléculas são instáveis e reagem com lipídios, proteínas e açúcares, além do DNA, causando danos às células do hospedeiro por bloquear a replicação, podendo ser citotóxicas e mutagênicas (Figura 9) (LU et al., 2001; LADEIRA et al., 2003; DING, et al., 2004).

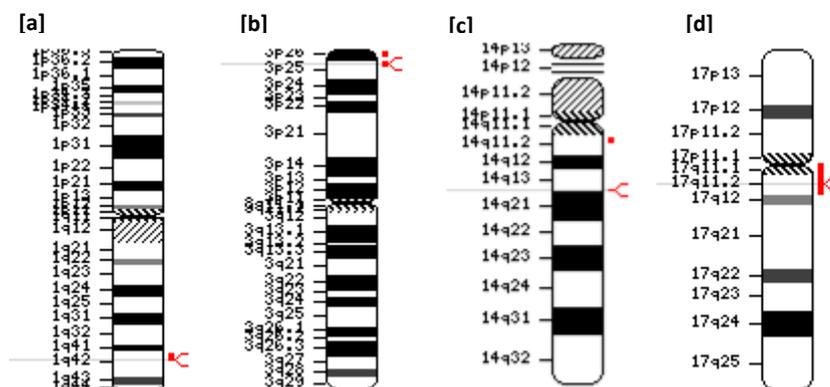


Figura 8: Ideograma representativo da localização do gene [a] *PARP-1*, [b] *OGG-1*, [c] *APE-1* e [d] *iNOS*, nos cromossomos humanos. Fonte: NCBI

1.4.3 Danos ao DNA e sistema de reparo na infecção por *H. pylori*

O dano oxidativo ao DNA é a principal causa de mutação em organismos vivos (LU et al., 2001). Destes danos, podem resultar vários tipos de lesões, dentre elas a oxidação da guanina, gerando 8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoG); as lesões apurínicas/apirimídicas do DNA e a quebra da fita de DNA.

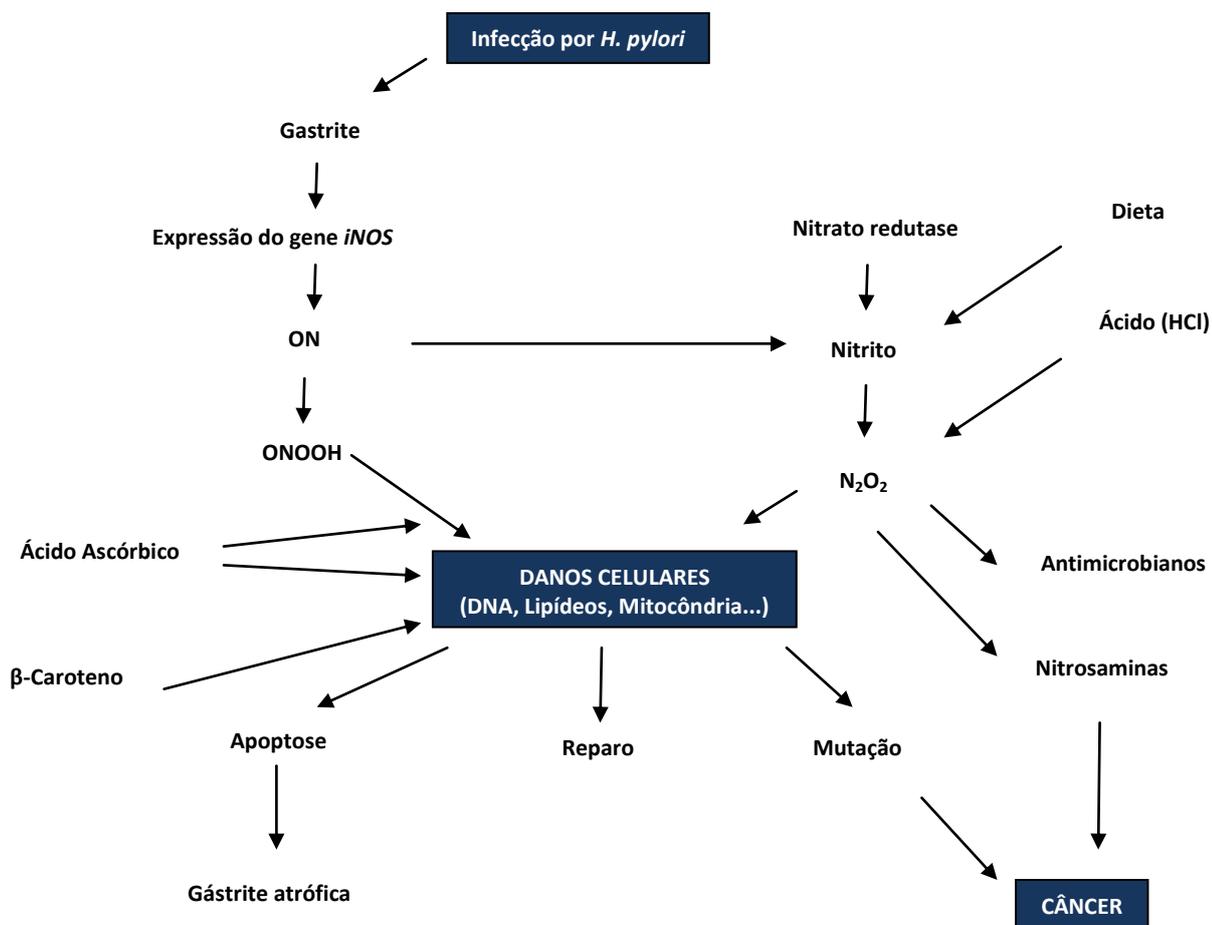


Figura 9: Esquema patogenético da carcinogênese gástrica (Traduzido de MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001)

A retirada de bases danificadas ou impróprias pelo sistema de reparo gera sítios apurínicos/apirimidínicos (sítios AP). Esses sítios também podem se formar espontaneamente e constituem lesões potencialmente mutagênicas e letais por bloquear a replicação e a transcrição.

Adicionalmente, a retirada dos sítios AP pelas enzimas específicas geram quebras da fita de DNA (BOITEUX e GUILLET, 2004), podendo ser simples (SSB “single strand breaks”) ou duplas (DSB “double strand breaks”). Ambas constituem lesões que também precisarão ser reparadas (LU et al., 2001; DAVID, 2007).

Os danos ao DNA causados pelo estresse oxidativo são ocorrências constantes, mesmo na fisiologia normal da célula, de modo que a frequência desses danos tem sido estimada em 10^4 lesões/célula/dia em humanos. Assim, essas lesões requerem um reparo contínuo (LU et al., 2001; KALPPINEM, 2007). Nesse sentido, a célula dispõe de enzimas apropriadas que visam garantir a integridade genômica, a fidelidade da informação gênica e a proteção da célula contra a morte (GURUSAMY, et al., 2007).

São várias as vias de reparo existentes, tais como o reparo por excisão de bases (BER – “Base excision repair”), por excisão de nucleotídeos (NER – “nucleotide excision repair”), de bases mal pareadas, por recombinação homóloga e recombinação não-homóloga. Dessas, o BER constitui o mecanismo de proteção mais importante em resposta ao dano oxidativo ao DNA (LU et al., 2001). Das enzimas importantes nessa via de reparo, destacam-se a Endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE-1), a 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG-1) e a Poli (ADP-Ribose) Polimerase-1 (PARP-1).

As enzimas chave no processo de reparo por excisão de base são as DNA glicosilases, responsáveis pelo reconhecimento da base aberrante e pela clivagem da ligação dessa base com a desoxirribose. Essa desoxirribose livre da base aberrante é clivada em seguida por uma endonuclease apurínica/apirimidínica (APE) na porção 5' do açúcar. O defeito resultante, em fita única, é reparado frequentemente pela DNA polimerase β , e as pontes fosfodiéster são então reparadas pela DNA ligase III (Figura 10).

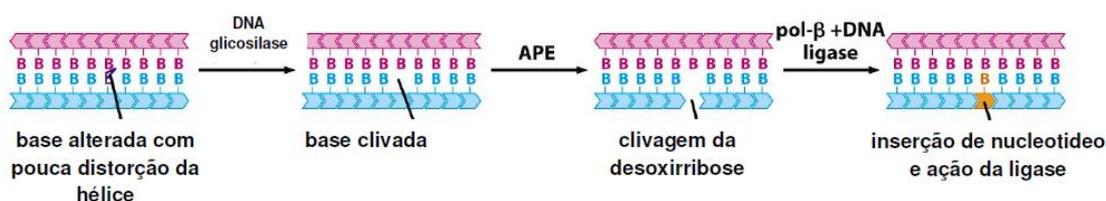


Figura 10: Esquema representativo do Reparo por Excisão de Base (CASTRO-JUNIOR, 2009).

1.4.4 8-oxoguanina DNA glicosilase-1 (OGG-1)

A principal enzima OGG em leveduras e em mamíferos é a OGG1, também conhecida como 8-hidroxi-guanina DNA glicosilase, AP liase ou N-glicosilase/DNA liase. Em humanos, o gene desta enzima localiza-se no cromossomo 3p26.2 (Figura 8) e apresenta um tamanho de 7.460pb, composto por 7 éxons e codifica uma proteína de 38.782Da, composta por 345aa (UCSC-Genome Bioinformatics; Genecards V3).

As 8-oxoG glicosilases são responsáveis por reconhecer e retirar o produto da oxidação da guanina (8-oxoG), considerado o mais estável e deletério conhecido, causado pelo dano oxidativo ao DNA (LU et al., 2001), protegendo assim, as células dos efeitos mutagênicos desse produto. Sem a remoção do 8-oxoG, que é semelhante estruturalmente à timina, ocorreria o pareamento com a adenina, formando o par de bases 8-oxoG:A, em substituição ao pareamento normal G:C (DAVID, 2007).

OGG-1 apresenta atividade bifuncional: atividade de DNA glicosilase, removendo o dano 8-oxoG do DNA, e de AP-endonuclease, promovendo a clivagem de sítios abásicos no DNA.

1.4.5 Endonucleaseapurínica/apirimidínica 1 (APE-1)

APE-1 é a principal AP endonuclease humana com atividade para processar sítios AP. Essa enzima também pode ser designada como APE, APEN, APEX, APX, HAP1 e REF1. O gene que codifica esta endonuclease localiza-se no cromossomo 14q11.2-q12 (Figura 8)

apresenta um tamanho de 2.636pb, composto por 5 éxons e codifica uma proteína de 35.555Da, composta por 318aa (UCSC-Genome Bioinformatics; Genecards V3). Trata-se de uma proteína multifuncional que desempenha papel essencial na homeostase celular, tendo sido reportado inclusive, que deleções homozigotas do gene de APE-1 são embriologicamente letais. É expressa em células normais do epitélio gástrico, sendo encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma (DING et al., 2004).

APE-1 participa da regulação redox de vários fatores de transcrição como ativador de proteínas (AP)-1, Fos, Jun, Fator Nuclear (NF)-kB, Myb, p53 entre outros. Somado a isso, APE-1 age como um fator regulador negativo do seu próprio gene (DING et al., 2004).

No reparo, APE-1 possui função de AP endonuclease, com a qual inicia o reparo dos sítios AP e com a função de fosfoesterase agregada, ela repara a quebra na fita do DNA (LU et al., 2001; DING et al., 2004). Quando ligada à dupla hélice, essa enzima interage com várias outras, como a DNA polimerase β , DNA ligase 1 e proteína XRCC1, a qual forma um heterodímero com ligase III e interage com a enzima Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (LU et al., 2001).

Foi demonstrado que *H. pylori* e ROS aumentam a expressão de APE-1 em células epiteliais gástricas isoladas de indivíduos cronicamente infectados com essa bactéria, bem como em células cultivadas *in vitro* (DING et al., 2004). Assim, OGG-1 e APE-1 são enzimas que desempenham um papel central na via de reparo por excisão de base (RUYCK, et al., 2007).

1.4.6 Poli (ADP-ribose)polimerase-1 (PARP-1)

A enzima PARP-1, também designada PARP, PPOL, ADPRT, ADPRT1, PARP-1, pADPRT-1 ou PARP1, é uma enzima associada à cromatina que é composta por três domínios: de ligação ao DNA, de automodificação e de ligação a NAD (ZHANG et al., 2009). O gene dessa enzima localiza-se no cromossomo 1q41-q42 (Figura 8) apresenta um tamanho

de 47.409pb, composto por 23 éxons e codifica uma proteína de 113.084Da, composta por 1014aa (UCSC-Genome Bioinformatics; Genecards V3). Trata-se de uma proteína altamente conservada, abundante e constitutivamente expressa, envolvida na modificação e remodelação da cromatina (HASSA et al., 2005; BERTRAM e HASS, 2008).

PARP-1 é ativada pelas quebras (simples ou duplas) na fita de DNA. Dessa maneira, a função normal de OGG-1 (gerando sítio AP pela remoção do 8-oxoG) está associada à ativação de PARP-1 em situações relacionadas ao elevado estresse oxidativo (MABLEY, et al., 2004). Foi reportado que ratos com o gene dessa enzima deletado mostram alta susceptibilidade à carcinogênese induzida por agentes alquilantes (ZHANG et al., 2009).

Uma vez ativada pelos danos no DNA, PARP-1 é responsável por uma série de funções celulares, tais como: sintetizar e transferir polímeros de ADP-ribose para proteínas alvo, atuar na regulação da resposta inflamatória, na morte celular e facilitar e regular o reparo do DNA mantendo a integridade genômica, desempenhando, assim, importante papel no BER (GONZALES-REY, et al., 2007; KALPPINEM, 2007; ZHANG et al., 2009).

A maneira como PARP-1 facilita o reparo do DNA ainda não está elucidada, porém já está estabelecido que ela cataliza poli-ADP-ribosilação (Figura 11) de proteínas, como histonas, cuja ribosilação confere uma carga negativa a essas proteínas, de maneira que elas se repelem do DNA, gerando um relaxamento da cromatina local, deixando o material genético mais acessível à ação de proteínas de reparo (KALPPINEM, 2007). Além das histonas, outras proteínas, como p53, DNA ligases, DNA polimerases, AP-endonuclease e a própria PARP-1, também são poli-ADP-ribosiladas em reações que usam a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) como substrato (ZHANG et al., 2009; BERTRAM e HASS, 2008). Subsequentemente ao reconhecimento por PARP-1, do DNA danificado, um complexo de alerta é formado composto por várias moléculas para iniciar uma cascata de sinalização (BERTRAM e HASS, 2008).

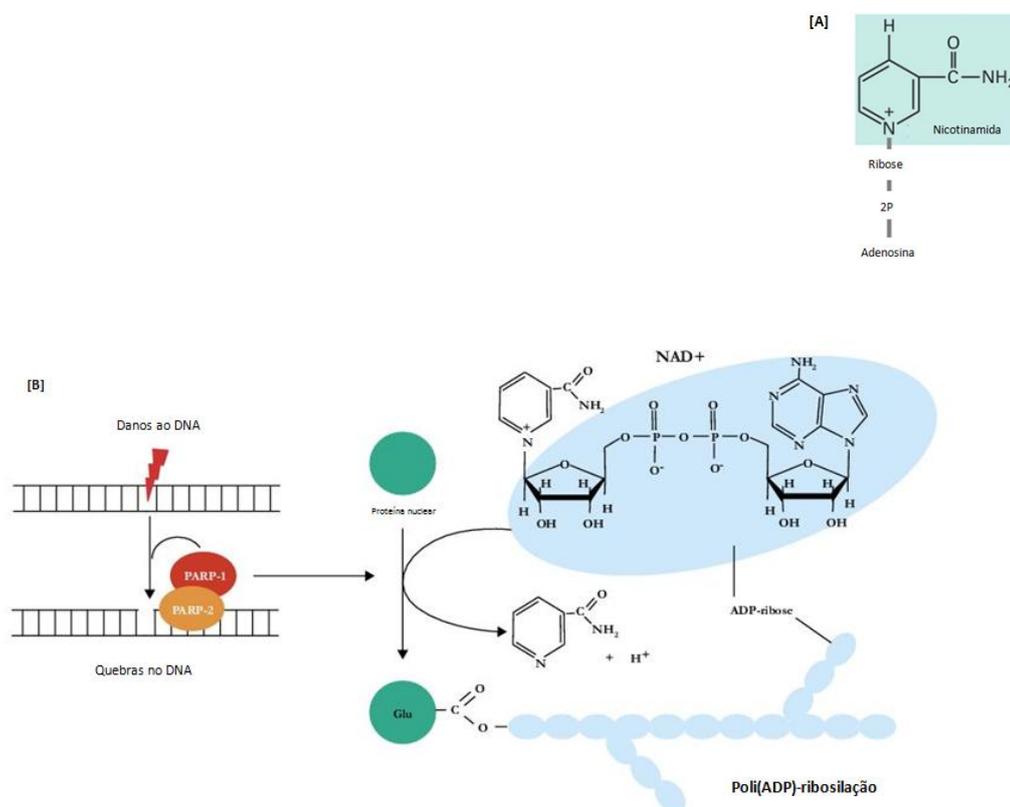


Figura 11: Esquema ilustrativo da poli(ADP)-ribosilação no reparo de DNA. [A] Esquema da coenzima respiratória nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺); [B] A formação de quebras no DNA ativam as PoliADP-ribose-polimerases (PARP1 e PARP2) que catalisam a polimerização de ADP-ribose (bolha azul) usando como substrato o NAD⁺, com a liberação da nicotinamida e posteriormente fixando várias moléculas de ADP-ribose em proteínas-alvo (Traduzido de POURQUIER, 2006)

1.5 Polimorfismos de um Único Nucleotídeo (Single nucleotide polymorphisms – SNPs) em Genes de Reparo e de Síntese do Óxido Nítrico e sua Associação com o Câncer Gástrico

Muitos pesquisadores vêm propondo a existência de interação entre os diferentes mecanismos de reparo de DNA, sugerindo-se que apesar de existir afinidades por determinadas lesões, os diferentes mecanismos de reparo de DNA trabalham de uma forma bastante integrada (BERRA e MENCK, 2006). No entanto, apesar de as estratégias de reparo serem teoricamente eficientes, o equilíbrio entre a geração de ROS e a atividade adequada do sistema de reparo é o que garante a integridade da informação genética. Assim, a geração de

altas quantidades de ROS ou de enzimas com atividade de reparo comprometida pode alterar esse equilíbrio, contribuindo para o acúmulo de danos no DNA (BERTRAM e HASS, 2008).

Mudanças na atividade enzimática podem ser decorrentes de polimorfismos genéticos, sendo que os genes chamados polimórficos apresentam variantes alélicas com frequência superior a 1%. Estima-se que cerca de 90% das variações de sequências em seres humanos são causadas por polimorfismos de substituição da base nitrogenada de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs). Quando ocorre em regiões gênicas codificantes, os SNPs podem ser sinônimos (não causam a mudança de um aminoácido) ou não-sinônimos (quando um aminoácido é alterado) (HUNT et al., 2009). Tem sido reportado que polimorfismos nos genes de reparo podem ser associados com diferenças na capacidade de reparar o DNA, influenciando, portanto, a susceptibilidade individual ao estresse oxidativo e à progressão maligna (HUNG et al., 2005).

Tem-se dado muita atenção ao papel dos polimorfismos em genes de reparo do DNA que resultam em variações na capacidade de corrigir o erro, influenciando o risco de câncer, contribuindo, inclusive, na etiologia do câncer gástrico. No entanto, as informações neste âmbito ainda são escassas (CAPELLÁ et al., 2008).

Assim, dentre outros polimorfismos existentes no gene de OGG-1, o polimorfismo Ser326Cys é comum na população e tem sido estudado em uma variedade de cânceres (PAZ-ELIZUR et al., 2006). Esse polimorfismo é o resultado da mudança do nucleotídeo 1245 C → G no códon 326 do éxon 7, ocorrendo substituição do aminoácido Serina por Cisteína (GOODE et al., 2002; SUGIMURA et al., 1999), sendo associado à diminuição da capacidade de reparo do DNA (RUYCK, et al., 2007), implicando em acúmulo de 8-oxoG, conseqüentemente promovendo instabilidade genômica e carcinogênese (HILL e EVANS, 2006). Um estudo prévio *in vitro*, usando cepas de *Escherichia coli*, mostrou que a proteína com o alelo polimórfico, 326Cys, tem menos habilidade de reparar 8-oxoG do que a proteína

com o alelo selvagem, 326Ser (KOHNO et al., 1998). Além disso, em um estudo caso-controle, esse polimorfismo foi associado à carcinogênese gástrica (HANAOKA, et al., 2001).

Outro SNP bastante estudado é Asn148Glu de APE-1 (resultado de uma transversoão T → G no nucleotídeo de posição 2197 no códon 148 do éxon 5 deste gene), resultando na substituição do aminoácido asparagina pelo ácido glutâmico (HADI et al., 2000; LI, et al., 2006). Foi mostrado que indivíduos portadores do alelo 148Glu apresentam uma maior sensibilidade à radiação ionizante do que aqueles portadores do alelo 148Asn (HU et al., 2001; LI, et al., 2006), embora tenha sido observado que o polimorfismo Asn148Glu de APE1 per si, não estaria influenciando a capacidade de reparo ao DNA danificado oxidativamente (VODICKA, et al., 2007).

Além destes, vem sendo estudado o polimorfismo Val762Ala de PARP-1, resultado de uma transição A → G no nucleotídeo 40676, no códon 762, éxon 17 deste gene, promovendo a substituição do aminoácido Valina por Alanina. Esta alteração, inclusive, tem sido associada à susceptibilidade ao câncer gástrico por reduzir a atividade de PARP-1 (LI et al., 2006; WANG, et al., 2006).

Interações entre esses SNPs têm sido observadas, tal como uma diminuição significativa na capacidade de reparar o DNA dos danos oxidativos que foi associada com os alelos variantes dos polimorfismos Ser326Cys de OGG-1 e Asn148Glu de APE-1, quando a interação binária gene-gene foi investigada, propondo assim, que o polimorfismo Asn148Glu de APE-1 contribui para aumentar o efeito do alelo variante G em Ser326Cys de OGG-1 (VODICKA, et al., 2007). Somado a isso também foi encontrada uma associação significativa entre o polimorfismo Asn148Glu de APE-1 e o polimorfismo Val762Ala de PARP-1, com o câncer (LI et al., 2006; WANG, et al., 2006).

Além destes polimorfismos do sistema de reparo, vem sendo estudado também o polimorfismo não-conservativo Ser608Leu de iNOS, resultado de um SNP no nucleotídeo

32969 dentro do éxon 16 em que ocorre mudança de C → T no códon 608, resultando em substituição do aminoácido Serina por Leucina (LI et al., 2007; QU et al., 2008). Sendo que o homozigoto Leu/Leu tem sido reportado por conferir alta atividade e expressão de iNOS, resultando em aumento da produção de ON. (SHEN, et al., 2004; WANG, et al., 2006). Assim, o alelo variante 608Leu já foi associado com a severidade da asma (HOLLA, et al., 2006) apresentou uma associação com a diabetes tipo I (JOHANNESSEN, et al., 2001). Além disto, o homozigoto Leu/Leu apresentou risco duas vezes maior para desenvolver linfoma não-Hodgkin (WANG, et al., 2006) e também foi associado à susceptibilidade ao câncer gástrico (SHEN, et al., 2004) .

Tendo em vista que um dos mecanismos propostos para o potencial carcinogênico de *H. pylori* se refere à sua capacidade de gerar uma resposta inflamatória exacerbada e danosa no hospedeiro, é fundamental que se investigue nos portadores de câncer gástrico, a interação entre o grau de virulência da cepa infectante, e os polimorfismos que influenciam a síntese de ON e o sistema de reparo do hospedeiro, a fim de que se possa contribuir para definir um perfil genético que ajude a identificar grupos com alta susceptibilidade de desenvolver câncer gástrico, ajudando a entender a etiologia desta neoplasia.

1.6 Perguntas de Partida

- Cepas de *H. pylori* mais virulentas (que apresentem todos os genes estudados) estariam gerando ROS em grande quantidade e causando danos maiores que a capacidade do sistema de reparo teria em corrigi-los (ainda que com enzimas eficientes)?
- Cepas mais virulentas quando associadas a determinadas enzimas de reparo com atividade comprometida resultariam no desenvolvimento de câncer?

- Cepas menos virulentas estariam associadas a determinadas enzimas de reparo com atividade comprometida nos pacientes com câncer gástrico?

1.7 Hipótese de Trabalho

Existe uma relação entre a patogenicidade da cepa de *H. pylori* e a eficiência do sistema de reparo do hospedeiro que favorece ao desenvolvimento do câncer.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Relacionar o perfil genotípico de virulência de *Helicobacter pylori* com o perfil genotípico dos polimorfismos de enzimas do sistema de reparo por excisão de base e de síntese de óxido nítrico em pacientes com câncer gástrico.

2.2 Objetivos Específicos

- Genotipar cepas de *H. pylori* quanto aos genes de virulência *vacA*, *cagA*, *cagE* e *virB11* presentes em pacientes com câncer gástrico;
- Detectar a frequência dos polimorfismos C150T em iNOS, T2197G em APE-1, C1245G em OGG-1 e A40676G em PARP-1, nestes pacientes;
- Correlacionar características clínico-epidemiológicas com a distribuição genotípica dos polimorfismos estudados;
- Correlacionar as cepas de *H. pylori* com a presença dos polimorfismos na amostra estudada;
- Analisar em conjunto características clínico-epidemiológicas, genotípicas de *H. pylori* e genotípicas do hospedeiro.

3 Material e Métodos

3.1 Casuística

Um total de 109 amostras de tumores gástricos foram obtidos a partir de pacientes submetidos a gastrectomias totais ou parciais nos hospitais: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF), Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) e Hospital Geral César Cals (HGCC).

Os espécimes tumorais frescos foram coletados nos centros cirúrgicos dos respectivos hospitais, imediatamente após a gastrectomia, obedecendo às condições ideais de assepsia, de acordo com o protocolo de coleta (Anexo I). As amostras foram retiradas sem comprometimento da investigação histopatológica da rotina hospitalar e em seguida foram transportadas rapidamente em compartimento contendo gelo para o Laboratório de Genética Molecular – LABGEM do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML, onde foram mantidas em freezer a temperatura de -80°C , até o momento da extração do DNA. De cada amostra congelada foram feitos cortes histológicos, em micrótomo criostato, com uma espessura de aproximadamente $5\mu\text{m}$, corados com Hematoxilina-Eosina e avaliados quanto ao percentual de células tumorais pelo patologista do grupo de pesquisa. Apenas aquelas amostras que continham um percentual maior ou igual a 80% de células tumorais foram dirigidas para a extração do DNA genômico.

3.2 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídeo sob protocolo nº 047.06.09 (Anexo II), observando as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde de acordo com as resoluções 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05. Foram incluídos

neste estudo apenas aqueles indivíduos submetidos à ressecção cirúrgica, que após serem informados sobre a pesquisa, concordaram em participar dela, assinando espontaneamente o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo III).

3.3 Coleta de Dados

Os dados epidemiológicos e clínico-patológicos foram obtidos no momento da entrevista com o paciente, bem como por meio da consulta de prontuários sendo registrados em fichas estruturadas (Anexo IV).

3.4 Avaliação Histopatológica

Os dados histopatológicos tais como subtipos tumorais, profundidade da invasão, acometimento de linfonodos e/ou metástase à distância e estadiamento, foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários.

3.5 Extração do DNA de Espécimes Congelados

As amostras tumorais com pelo menos 80% de células tumorais foram submetidas à extração do DNA genômico de alto peso molecular, utilizando-se o método de extração com CTAB descrito por Foster e Twell (1996). Neste método, fragmentos de aproximadamente 0,5g foram macerados com auxílio de bastão de vidro esterilizado, em tubo tipo Falcon de 15mL e em seguida, adicionou-se o tampão de extração (2% CTAB; 1,4M de NaCl; 20mM de EDTA; 100mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2% de 2-Mercaptoetanol); obedecendo-se proporção de 6mL de tampão de extração para cada 0,5g de tecido tumoral e incubado em banho-maria a 60 °C por 16 horas com algumas inversões. Após a incubação, adicionou-se volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), para purificação, seguido de centrifugação a 2000 rpm por 15 min. Em seguida, a fase superior foi transferida para tubo tipo Falcon estéril de 15mL e o DNA foi precipitado com 2/3 do volume de isopropanol à 100%, centrifugado a 2000rpm por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi

ressuspendido com NaCl 1M, para liberação do complexo DNA-CTAB. Em seguida adicionou-se 2,5 volumes de etanol 100% gelado e centrifugado a 2000 rpm por 5 min. Em seguida foi lavado com etanol 70% e colocado para secar à 37°C. Depois de seco, o DNA foi ressuspendido em 400µl de água Milli-Q estéril com DEPC 0,1% e armazenado em freezer à -14°C. Para avaliar a qualidade do DNA, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e observado sob transluminador de luz ultravioleta; Paralelamente, o DNA foi quantificado usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 3300 (Wilmington, DE, USA).

3.6 Detecção de *H. pylori*

A detecção da presença de *H. pylori* e de seus respectivos genes foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A tabela 5 mostra as especificações de cada reação. Em todas as reações foram usados como controle negativo, um mix de PCR sem amostra de DNA foi usado para certificar-se de que o produto final da PCR estava livre de contaminação. A presença de *H. pylori* nas amostras estudadas foi detectada pela presença da região interna, específica para *H. pylori*, do gene que codifica a proteína urease (*ureC*) (BICKLEY, et al., 1993). A mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,4 mM deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25µL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata. Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA extraído de amostras sabidamente positivas para infecção por *H. pylori* e para amplificação de cada um de seus genes, foram utilizadas, como controles positivos, para os respectivos genes, amostras que foram previamente amplificadas, seqüenciadas e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini da Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu.

3.6.1 Presença e subtipos do gene *vacA* de *H. pylori*

3.6.1.1 *vacA s1 e s2*

Os subtipos s1 e s2 foram amplificados em uma mesma reação. A mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% Tween 20; 1,25 U de Go Taq[®] Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,24 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,48 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 μL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata.

3.6.1.2 *vacA m1 e m2*

Os subtipos m1 e m2 foram amplificados individualmente. Para amplificação do subtipo m1 a mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 0,1% de Tween 20, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen[®]; 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25μL.

Para a amplificação do subtipo m2, foi feita a mistura para PCR contendo tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% de Tween 20; 1,25 U de Go Taq[®] Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,25 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,32 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5μL.

Os produtos gerados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata.

3.6.2 Detecção do gene *cagA*

O gene *cagA* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura para PCR composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% Tween 20; 1,25 U de Go Taq[®] Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,24 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,48 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 12,5 μL. Os produtos gerados foram visualizados em gel de poliacrilamidas a 6% corado com nitrato de prata.

3.6.3 Detecção do gene *cagE*

O gene *cagE* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura para PCR composta por Master Mix 1X, 0,1% Tween 20, 0,48 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 μL. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

3.6.4 Detecção do gene *virB11*

O gene *virB11* de *H. pylori* foi amplificado em uma mistura contendo 10 μl de Go Taq Master Mix, 0,5 mM de MgCl₂; 0,3 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20 μL. Os produtos que foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

| Tabela 5: Detalhes das PCR's para os genes de <i>H. pylori</i> | | | | | | | | | |
|--|--|---------------|-----------------|----------------|------------------|---------------|-------------|--------------------|------------------------------|
| Gene | Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores | Desnat. | | Temp Anel. | Extensão | | Ciclos (N°) | PCR (pb) | Referência |
| | | Inicial | ciclo | | ciclo | final | | | |
| ureC | F- 5' AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T 3' R- 5' AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC 3' | 94 °C (5') | 94 °C (1') | 55°C (1') | 72°C (1') | 72°C (7') | 35 | 294 | LAGE <i>et al.</i> , 1995 |
| vacA | F- 5' ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC 3' R- 5' CTG CTT GAA TGC GCC AAA C 3' | 94 °C (5') | 94 °C (50'') | 55°C (45'') | 72°C (1'30'') | 72°C (7') | 40 | (s1)259 (s2)286 | |
| m1 | F- 5' GGT CAA AAT GCG GTC ATG G 3' R- 5' CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC 3' | 95 °C (5') | 94 °C (30'') | 55°C (30'') | 68 °C (2') | 68 °C (7') | 35 | 290 | ATHERTON <i>et al.</i> 1995 |
| m2 | F - 5' GGA GCC CCA GGA AAC ATT G 3' R - 5' CAT AAC TAG CGC CTT GCA C 3' | | | | | | | 192 | |
| cagA | F - 5' ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A 3' R - 5' TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATA ACG CCA T 3' | 94 °C (5') | 95 °C (1') | 56°C (1') | 72°C (1') | 72°C (7') | 40 | 297 | DOMINGO <i>et al.</i> , 1999 |
| cagE | F - 5' TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC 3' R - 5' GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C 3' | 95 °C (5') | 95 °C (1') | 53°C (1') | 72°C (1') | 72°C (10') | 45 | 509 | SOZZI <i>et al.</i> , 2005 |
| virB11 | F - 5' TTA AAT CCT CTA AGG CAT GCT AC 3' R - 5' GAT ATA AGT CGT TTT ACC GCT TC 3' | 95 °C (5') | 95 °C (1') | 49°C (1') | 72°C (1') | 72°C (10') | 45 | 491 | SOZZI <i>et al.</i> , 2005 |

3.7 Detecção dos Polimorfismos Genéticos do Hospedeiro

A presença de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes que codificam as enzimas de reparo, APE-1, OGG-1 e PARP-1, e a enzima de síntese de óxido nítrico, iNOS, foram detectados por meio da análise do DNA genômico, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), que é a PCR seguida de restrição enzimática. O número de referência de cada polimorfismo único de nucleotídeo (SNP) para acesso no *gene bank* foi obtido a partir do endereço eletrônico do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). O padrão de clivagem de cada um dos genes das enzimas estudadas está esquematizado nas Figuras 12, 13 e 14. Amostras distintas, sabidamente possuidoras dos sítios de clivagem para cada enzima de restrição específica, foram usadas como controle das reações de restrição enzimática. Os resultados da genotipagem foram regularmente confirmados por regenotipagem de aproximadamente 10% das amostras.

3.7.1 APE-1 e OGG-1

A maioria das reações para determinar a presença de polimorfismos nestes genes foi conduzida no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica-LBMG da Universidade Federal do Rio grande do Norte, e as amostras posteriormente coletadas foram genotipadas no Laboratório de Genética Molecular – LABGEM da Universidade Federal do Ceará para completar o número amostral. Em cada uma das reações de PCR, foram utilizados na mistura o tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (tabela 6), 3,6 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen[®], 0,3 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 2,0 mM de MgCl₂; e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25 μ L. Um produto de 164 pb, amplificado a partir do códon 148 no éxon 5 do gene APE-1, e 250pb, amplificado a partir do códon 326 no éxon 7 no gene OGG-1, foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob

transluminador de luz ultravioleta. Os produtos gerados foram submetidos à digestão enzimática com 5U da endonuclease de restrição específica descrita na Tabela 7, acrescida do tampão sugerido pelo fabricante em um volume final de 20µL. Os fragmentos resultantes da restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% e posteriormente corados com nitrato de prata (Figura 12).

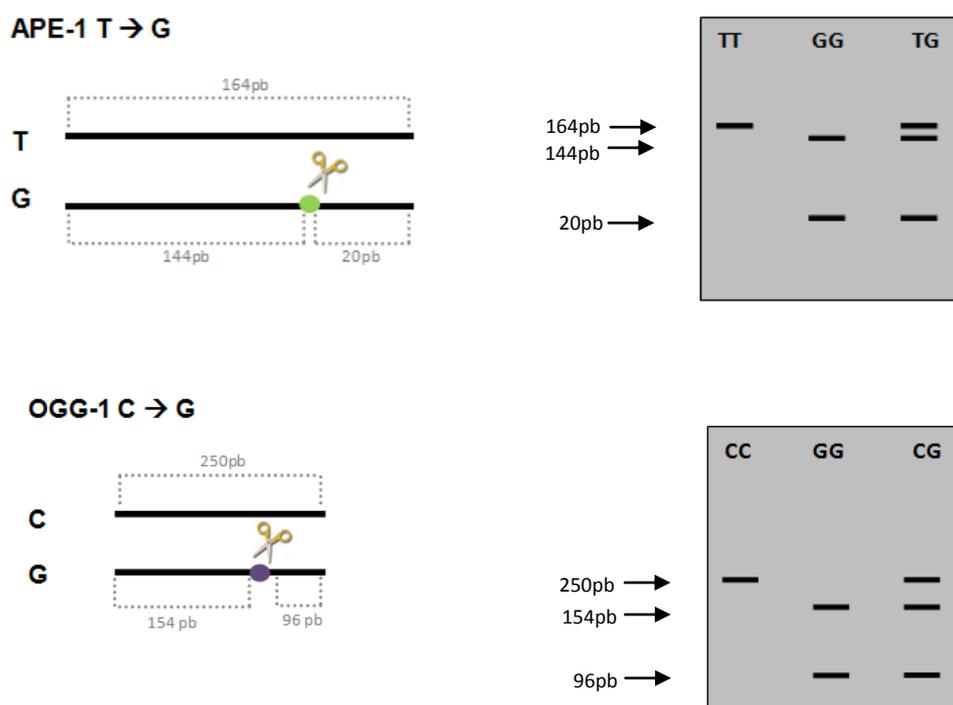


Figura 12: Padrão de clivagem e de corrida dos fragmentos de restrição dos genes *APE-1* e *OGG-1*

3.7.2 *PARP-1*

Para amplificar o fragmento de 127pb no códon 762 do éxon 17 deste gene, foram utilizados na mistura de cada uma das reações de PCR, PCR MasterMix 1X (PROMEGA, Madison WI, USA); 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 20µL. A sequência de oligonucleotídeos iniciadores descrita na tabela 6, foi desenhada utilizando-se o programa Primer-Introduced Restriction Analysis (PIRA-PCR) (KE, et al., 2001) e foi gentilmente cedida pela Prof^a. Lucymara Fassarela

Agnez Lima do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica-LBMG da Universidade Federal do Rio grande do Norte. O produto final da reação foi um fragmento de 127 pb visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta. Em seguida realizou-se a digestão enzimática com 5U da endonuclease distinta, descrita na Tabela 7, acrescida do tampão específico de acordo com o fabricante, totalizando um volume de 20µL. Os produtos gerados desta digestão enzimática foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% e em seguida corados com nitrato de prata (Figura 13).

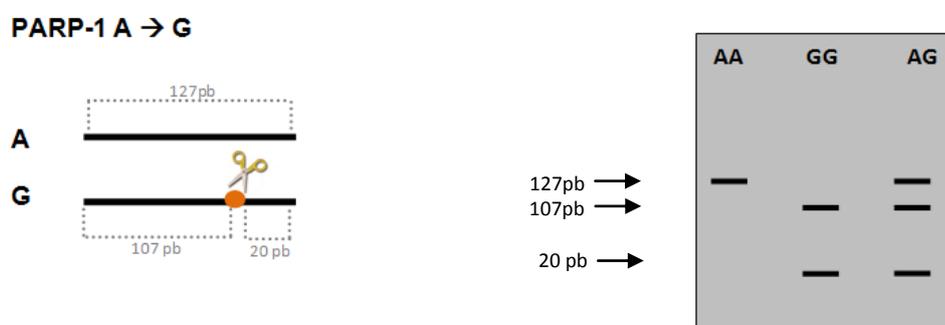


Figura 13: Padrão de clivagem e de corrida dos fragmentos de restrição do gene *PARP-1*

3.7.3 *iNOS*

A mistura da reação de PCR para amplificação do fragmento de 220pb, do códon 608 no éxon 16 deste gene, foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 0,8µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 6) 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; e 100ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25µL. O produto gerado, um fragmento de 220 pb foi visualizado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta. O fragmento amplificado foi submetido à digestão enzimática que foi conduzida acrescentando-se o tampão específico indicado pelo fabricante associado à 0,13U da endonuclease de restrição específica descrita na Tabela 7 acrescido de 0,1% de BSA, totalizando um volume final de 12,5 µL. Os fragmentos resultantes da digestão

enzimática foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% e posteriormente corados com nitrato de prata (Figura 14).

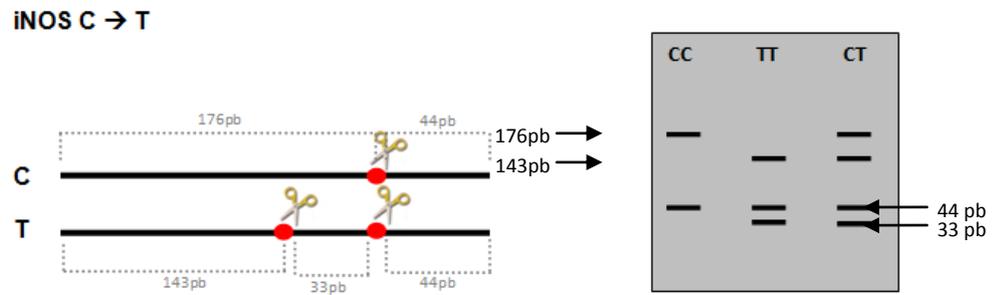


Figura 14: Padrão de clivagem e de corrida dos fragmentos de restrição do gene *iNOS*

| Tabela 6: Detalhes das PCR's para os genes das enzimas de reparo e de síntese de óxido nítrico | | | | | | | | | |
|--|--|---------------|-----------------|------------------|--------------|--------------|-------------|----------|--------------------------------|
| Gene | Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores | Desnat. | | Temp Anel. | Extensão | | Núm. Ciclos | PCR (pb) | Referência |
| | | Inicial | ciclo | | ciclo | final | | | |
| APE-1 | F 5'CTGTTTCATTTCTATAGGCTA3' R 5'AGGAACTTGCGAAAGGCTTC3' | 94 °C (5') | 94 °C (45'') | 48,5°C (45'') | 72°C (1') | 72°C (5') | 35 | 164 | Vodicka, et. al., 2007 |
| OGG-1 | F 5'AGTGGATTCTCATTGCCTTCG3' R 5'GGTGCTGGGGAATTTCTTT3' | 94 °C (5') | 95 °C (45'') | 54°C (45'') | 72°C (1') | 72°C (5') | 35 | 250 | Vodicka, et. al., 2007 |
| PARP-1 | F 5'TTTGCTCCTCCAGGCCAACG3' R 5'ACATCGATGGGATCCTTGCTGC3' | 95 °C (5') | 95 °C (45'') | 57,5°C (45'') | 72°C (1') | 72°C (5') | 35 | 127 | Desenhado na UFRN ¹ |
| iNOS | 5' CATA TGT AAA CCA ACT TCC GTG 3' 5' GGC AGG GCT AGG AGT AGG AC 3' | 94 °C (5') | 94 °C (45'') | 55°C (45'') | 72°C (1') | 72°C (5') | 35 | 220 | Fermin-Mearin et al, 2006 |

¹Utilizou-se o programa *Primer-Introduced Restriction Analysis (PIRA-PCR)* segundo KE, et al., 2001.

Tabela 7: Detalhe do polimorfismo único de nucleotídeo (SNP) das enzimas estudadas

| Gene | Polimorfismo | | Referência do SNP para acesso no <i>gene bank</i> ¹ | Exon | Tamanho dos fragmentos digeridos (pb) | Enzima de Restrição | Sítio de Corte | Ref. |
|---------------|------------------|---------|--|------|---|---------------------|--|---------------------------|
| | No resíduo de aa | Na base | | | | | | |
| APE-1 | Asn148Glu | T2197G | rs1130409 | 5 | T (164) G (144+20) TG (164+144+20) | <i>Bfal</i> | 5' C ^V TAG3' 3' GAT ^V C5' | Vodicka, et. al., 2007 |
| OGG-1 | Ser326Cys | C1245G | rs1052133 | 7 | C 250 G (154 + 96) CG (250 + 154+96) | <i>Fnu4HI</i> | 5' GC ^V NGC3' 3' CGN ^V CG5' | Vodicka, et. al., 2007 |
| PARP-1 | Val762Ala | A40676G | rs1136410 | 17 | A (127) AG (107+20) G (107) | <i>BstUI</i> | 5' CG ^V CG3' 3' GC ^V GC5' | - |
| iNOS | Ser608Leu | C150T | rs2297518 | 16 | C (176+44) T (143+44+33) CT (175+142+44+33) | <i>Tsp509I</i> | 5' AA ^V TT3' 3' TT ^V AA5' | Fermin-Mearin et al, 2006 |

¹Fonte: NCBI

3.8 Análise Estatística

As distribuições genotípicas foram obtidas por contagem direta e examinadas para verificar se os grupos analisados encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Essa verificação foi feita pela comparação da frequência observada do genótipo com aquela esperada em equilíbrio e adotando como limite de significância $p=0,05$.

Os dados clínico-patológicos e os resultados das PCR's foram demonstrados através de gráficos e tabelas como auxílio dos programas computacionais Microsoft Office Excel[®] 2007 e Microsoft Office Word[®] 2007 (Microsoft[®], USA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas estatísticos: EPINFO[®] versão 6.0 e SPSS[®] 12.0, realizando-se o Teste do χ^2 e Teste Exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significantes, valores de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Aspectos Clínico-Epidemiológicos

Dos 109 casos de adenocarcinoma gástrico analisados, 69% era de pacientes do sexo masculino e 31% de pacientes do sexo feminino; com uma razão masculino/feminino estimada de 2,2:1. A idade dos pacientes variou de 23 a 90 anos com uma mediana de 56,5. Quando estratificada em faixas etárias de acordo com a padronização da IARC, observou-se que a faixa mais freqüente foi a de ≥ 65 anos e que 60% dos homens estavam nesta faixa etária.

Considerando a localização anatômica, 75,3% (82/109) dos tumores, estava localizado nas regiões de corpo e antro (região não-cárdia). Os tumores localizados na cárdia foram associados aos indivíduos do sexo masculino ($r = +0,249$; $p = 0,009$) (Figura 15).

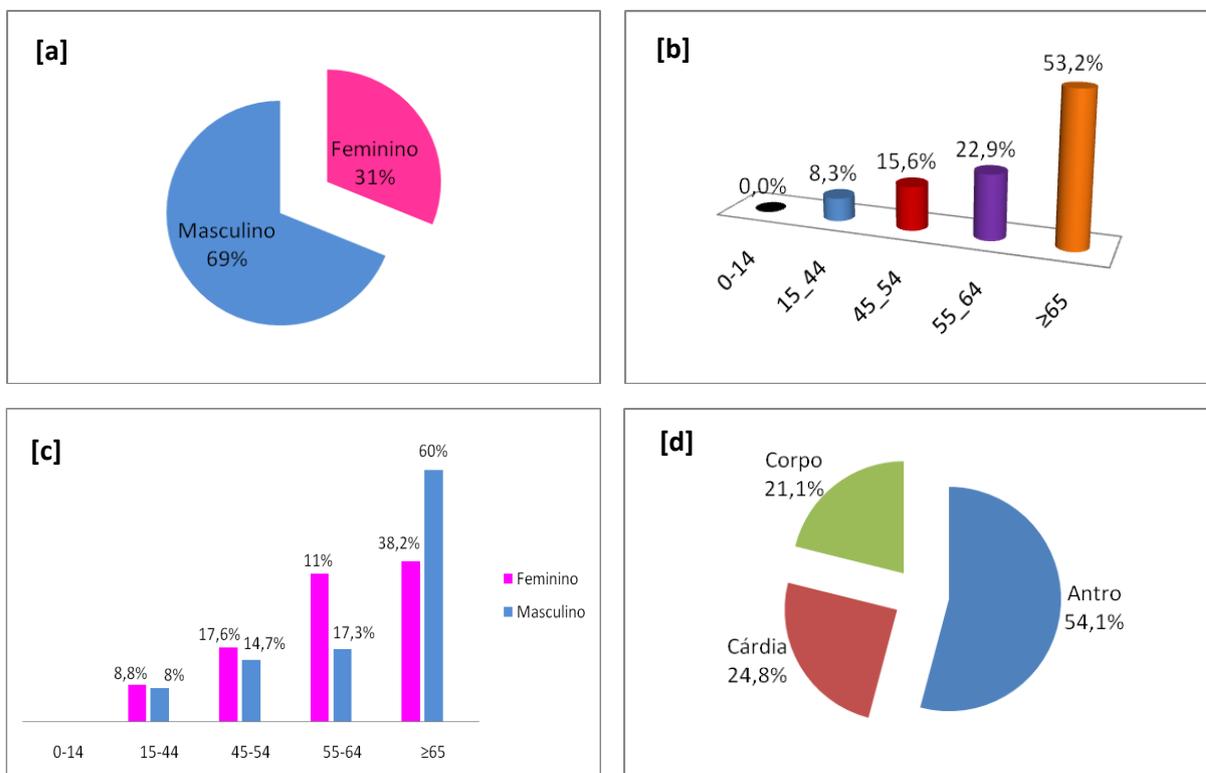


Figura 15: Percentual dos casos de câncer gástrico distribuído quanto [a] ao gênero, [b] faixa etária [c] gênero e faixa etária e [d] localização anatômica do tumor

4.2 Análises Histopatológicas

Foi observado que 61,5% dos casos apresentaram-se nos estadiamentos mais avançados, III e IV (Figura 16).

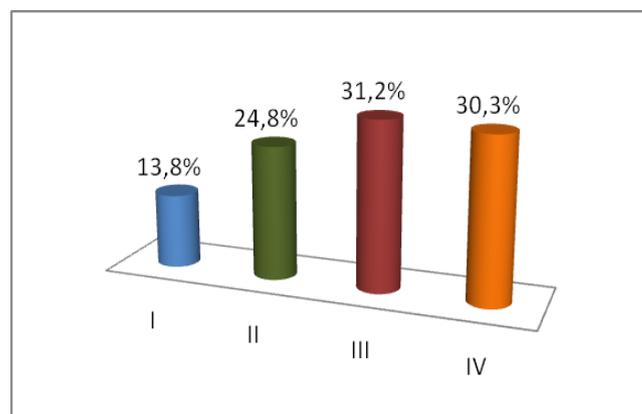


Figura 16: Distribuição dos casos de câncer gástrico quanto ao estadiamento do tumor

Considerando o tamanho do tumor, observou-se que 62,04% (67/109) eram tumores T3. Os tumores T4 foram pouco representados (19 casos) (Figura 17). Quanto à presença de metástase 9,1% (10/109) dos casos possuíam metástase.

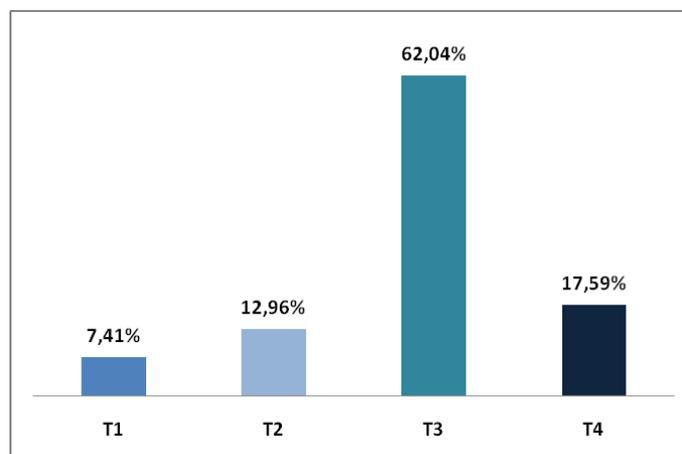


Figura 17: Distribuição dos casos de câncer gástrico quanto ao tamanho do tumor

Quando os casos foram analisados de acordo com o subtipo histológico, o subtipo intestinal foi ligeiramente mais freqüente do que o difuso, representando 55% (60/109) dos casos (Figura 18a), sendo correlacionado com a faixa etária ≥ 65 anos ($r = -0,261$; $p = 0,006$). Contrariamente, observou-se que os indivíduos com idades entre 15-44 anos foram correlacionados com o subtipo difuso ($r = +0,265$; $p = 0,005$) (Figura 18b). Foi observada uma ligeira prevalência do sexo masculino no subtipo intestinal (46/60; $p = 0,051$; Figura 18c). Não houve predominância de tipo histológico nos grupos de estadiamentos (18d).

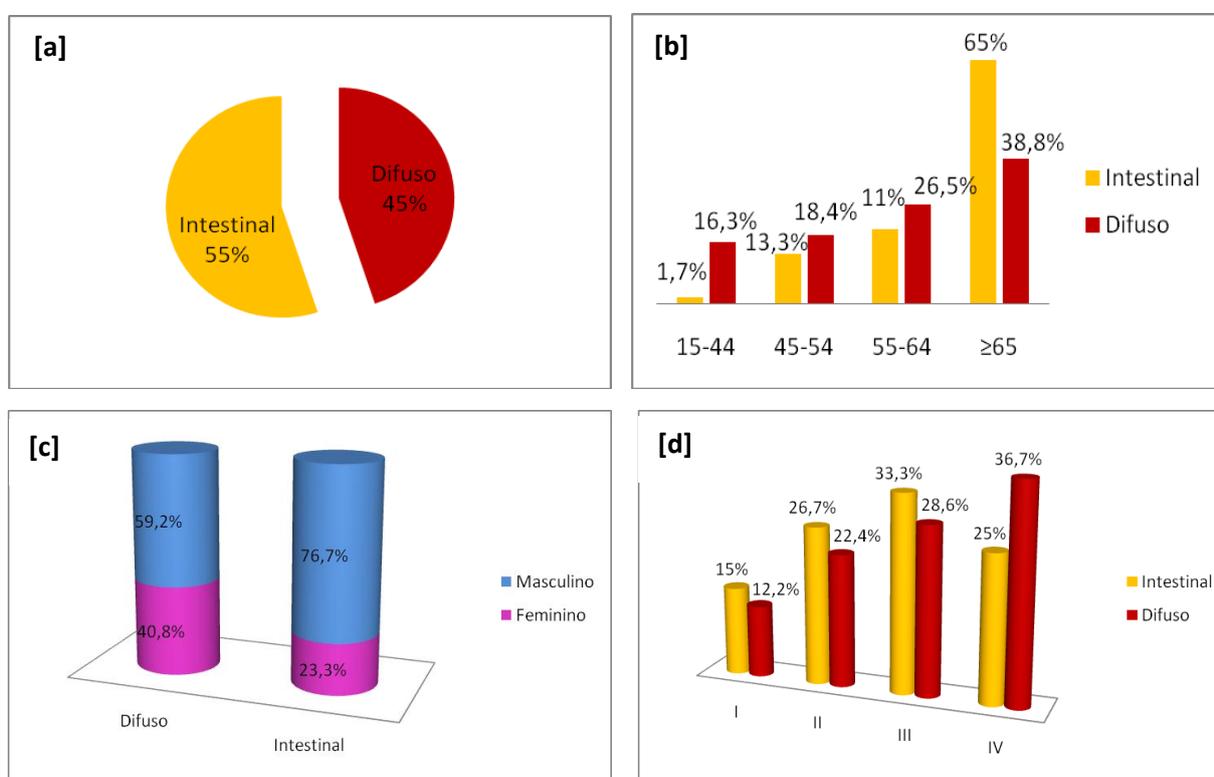


Figura 18: Percentual dos casos de câncer gástrico distribuído [a] quanto à classificação de Lauren, [b] quanto à faixa etária nos subtipos histológicos, [c] quanto ao gênero nos subtipos histológicos, [d] quanto ao estadiamento nos subtipos histológicos

4.3 Frequência dos polimorfismos das enzimas de reparo do DNA e de síntese de óxido nítrico

Em todos os casos foi possível determinar os genótipos estudados. Para o éxon 16 do gene *iNOS*, 78% (85/109) eram CC, 21,1% (23/109) eram CT e 0,9% (1/109) era TT. Para o éxon 17 do gene *PARP-1*, 69,7% (76/109) dos casos foram AA, 26,6% (29/109) foram AG e

3,7% (4/109) foram GG, para o éxon 7 do gene *OGG-1* verificou-se que 56% (61/109) dos casos eram CC, 39,4% (43/109) eram CG, e 4,6% (5/109) eram GG e para o éxon 5 do gene *APE-1* observou-se que 38,5% (42/109) dos casos eram TT, 47,7% (52/109) eram TG e 13,8% (15/109) eram GG. A distribuição genotípica, de todas as enzimas estava no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na figura 19 observa-se que excetuando *APE-1*, o genótipo mais frequente foi o homocigoto selvagem, seguido pelo heterocigoto e posteriormente pelo homocigoto para o alelo variante. No entanto, para *APE-1* o genótipo heterocigoto foi o predominante. Essa enzima também foi a que apresentou a maior frequência do homocigoto para o alelo variante, contrastando com o gene da enzima *iNOS*, cuja frequência do homocigoto variante foi extremamente baixa.

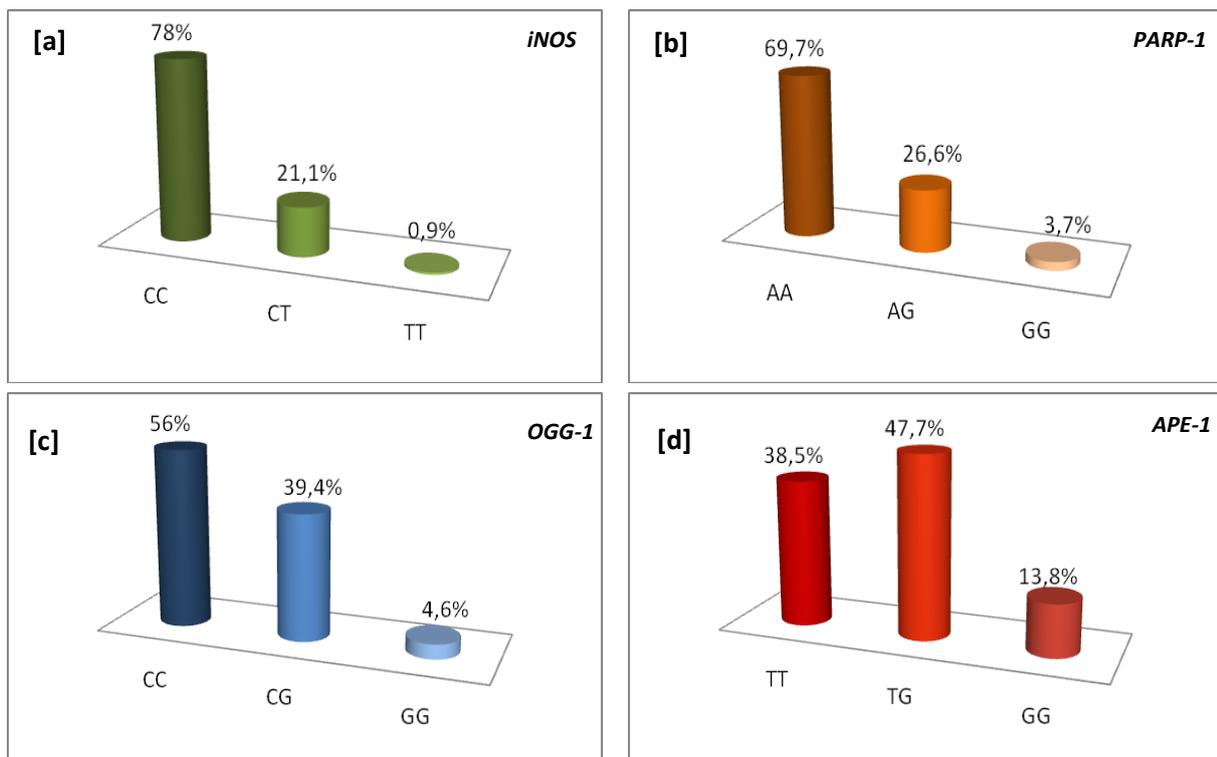


Figura 19: Frequência genotípica dos polimorfismos nos genes das enzimas [a] *iNOS*, [b] *PARP-1*, [c] *OGG-1* e [d] *APE-1* nos 109 casos de adenocarcinoma gástrico estudados

Na figura 20 são apresentados géis de poliacrilamida mostrando os tamanhos de fragmentos gerados após amplificação dos genes de cada uma das enzimas estudadas e subsequente tratamento com a enzima de restrição específica.

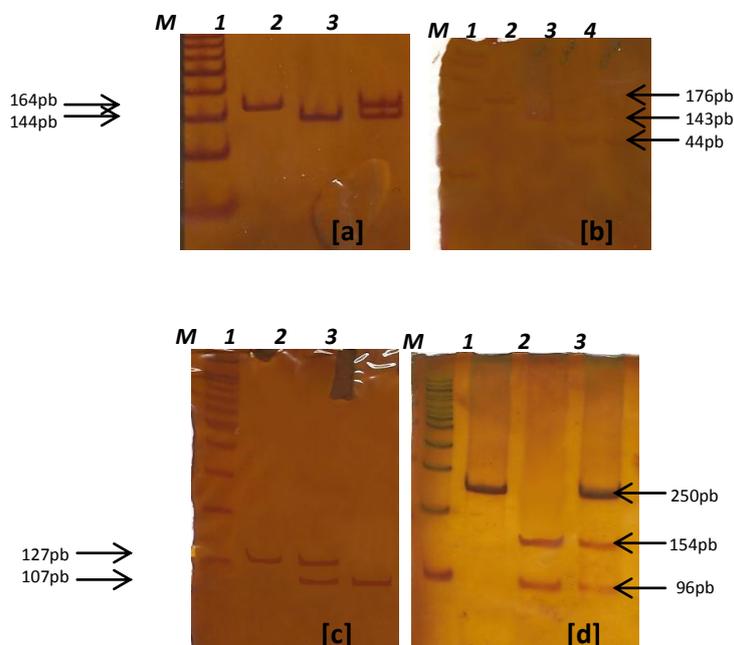


Figura 20: Exemplos de fragmentos de restrição em géis de poliacrilamida: [a] *APE-1* (M) Marcador de 50pb, (1) Homozigoto Selvagem, (2) Homozigoto para o alelo variante e (3) Heterozigoto [b] *iNOS* (M) Marcador de 100pb, (1) Produto de PCR, (2) Homozigoto Selvagem, (3) Heterozigoto e (4) Homozigoto para o alelo variante [c] *PARP-1* (M) Marcador de 100pb, (1) Homozigoto Selvagem, (2) Heterozigoto, (3) Homozigoto para o alelo variante [d] *OGG-1* (M) Marcador de 100 pb (1) Homozigoto Selvagem, (2) Homozigoto para o alelo variante, (3) Heterozigoto

4.3.1 Associação dos polimorfismos com os parâmetros epidemiológicos e histopatológicos

A Figura 21 mostra distribuição dos genótipos das enzimas estudadas de acordo com a faixa etária. Por esses gráficos observa-se que para os genes *iNOS* e *PARP-1* o genótipo selvagem foi mais freqüente na faixa ≥ 65 anos, sendo estatisticamente significativo para *iNOS* ($p=0,027$), enquanto que os genótipos de *OGG-1* e *APE-1* aumentam gradativamente com a idade. Essas distribuições refletem nas análises de correlação (Tabela 8) onde pacientes na faixa etária de 45-54 anos, se correlacionaram positivamente com o alelo variante de *iNOS* e pacientes com idade ≥ 65 anos se correlacionaram com o genótipo selvagem (CC) dessa enzima. Adicionalmente, considerando 55 anos como faixa de corte para a idade, observou-se

claramente que a presença do alelo variante de *iNOS* (CT + TT) estava correlacionada aos indivíduos com idade <55 anos, enquanto que aqueles com idade ≥ 55 anos apresentavam principalmente o genótipo selvagem CC. Por outro lado houve correlação dos portadores do genótipo heterozigoto (AG) de *PARP-1* com a faixa etária de 55-64 anos.

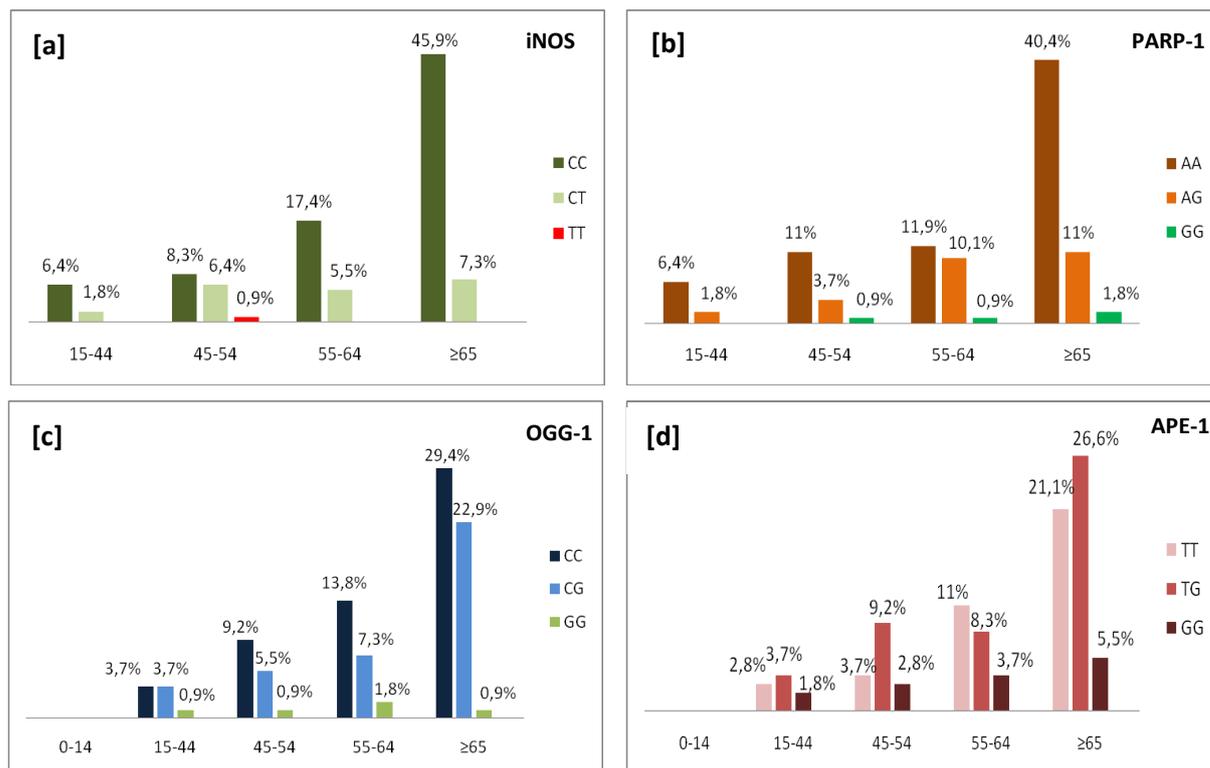


Figura 21: Distribuição das frequências genóticas das enzimas [a] *iNOS*, [b] *PARP-1*, [c] *OGG-1* e [d] *APE-1* nas faixas etárias

Quando o genótipo heterozigoto foi associado ao homozigoto para o alelo variante, observou-se que as correlações com as faixas etárias foram reconfirmadas.

| Tabela 8: Correlação entre diferentes faixas etárias e os genótipos das enzimas | | | |
|--|----------------------------|------------|-----------|
| Faixas Etárias | | r = | p= |
| 45-54 | <i>iNOS</i> CT | +0,212 | 0,027 |
| | <i>iNOS</i> TT | +0,224 | 0,019 |
| | <i>iNOS</i> CT + TT | +0,260 | 0,006 |
| < 55 | CT + TT | +0,228 | 0,017 |
| ≥ 55 | CC | +0,228 | 0,017 |
| 55-64 | <i>PARP</i> AG | +0,215 | 0,025 |
| | <i>PARP</i> AG+GG | +0,210 | 0,028 |
| ≥ 65 | <i>iNOS</i> CC | +0,212 | 0,027 |
| | <i>iNOS</i> CT+TT | -0,212 | 0,027 |

Analisando-se os tumores de acordo com os subtipos histológicos (intestinal ou difuso), notou-se que as correlações positivas dos alelos variantes de *PARP-1* e *iNOS* com pacientes jovens foram vistas exclusivamente no subtipo intestinal e nesse exemplar histológico, a maioria dos pacientes portadores do genótipo heterozigoto (CG) de *OGG-1* apresentaram tumores localizados na região não-antro (corpo + cárdia) ($r = +0,260$; $p = 0,045$) (Tabela 9). No subtipo difuso, os tumores da região do corpo estavam correlacionados positivamente com os portadores do genótipo selvagem (AA) de *PARP-1* ($r = +0,299$; $p = 0,037$).

| Tabela 9: Distribuição dos genótipos nos subtipos histológicos e sítios anatômicos | | | | | | | | | |
|--|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|--|
| Gene | INTESTINAL | | | | DIFUSO | | | | |
| | Cárdia | Corpo | Antro | Total | Cárdia | Corpo | Antro | Total | |
| <i>iNOS</i> | | | | | | | | | |
| CC | 15 | 9 | 23 | 47 | 6 | 12 | 20 | 38 | |
| CT | 2 | 1 | 9 | 12 | 3 | 1 | 7 | 11 | |
| TT | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | |
| <i>PARP-1</i> | | | | | | | | | |
| AA | 13 | 6 | 23 | 42 | 5 | 12 | 17 | 34 | |
| AG | 5 | 4 | 8 | 17 | 3 | 1 | 8 | 12 | |
| GG | - | - | 1 | 1 | 1 | - | 2 | 3 | |
| <i>APE-1</i> | | | | | | | | | |
| TT | 6 | 3 | 13 | 22 | 5 | 5 | 10 | 20 | |
| TG | 9 | 7 | 16 | 32 | 2 | 6 | 12 | 20 | |
| GG | 3 | - | 3 | 6 | 2 | 2 | 5 | 9 | |
| <i>OGG-1</i> | | | | | | | | | |
| CC | 10 | 4 | 22 | 36 | 4 | 6 | 15 | 25 | |
| CG | 7 | 6 | 7 | 20 | 5 | 6 | 12 | 23 | |
| GG | 1 | - | 3 | 4 | - | 1 | - | 1 | |
| Total geral | 18 | 10 | 32 | 60 | 9 | 13 | 27 | 49 | |

4.4 Detecção e genotipagem da bactéria *Helicobacter pylori*

Dos 109 casos analisados, 92,6% (101/109) foram positivos para *H. pylori*. A genotipagem dessa bactéria detectou o gene *cagA* em 65,3% (66/101) das amostras, o gene *cagE* em 50,4% (51/101) e *virB11* em 60,3% (61/101). Os alelos *s1* e *m1* de *vacA* se distribuíram da seguinte maneira: *vacAs1* em 88,1% (89/101) e *vacAm1* em 76,2% (77/101). As associações em mosaico mostraram a alta frequência de *vacAs1m1*, presente em 72,2% (73/101) das amostras, enquanto que *vacAs1m2/s2m1* foi identificada em 19,8% (20/101) e *vacAs2m2* em 7,9% (8/101) dos casos.

Nenhum dos genes de *H. pylori* se correlacionou, isoladamente, com idade, localização anatômica do tumor, estadiamento, ou com os subtipos histológicos. Na Tabela 10 é mostrada a distribuição genotípica de *H. pylori* nos subtipos histológicos.

Tabela 10: Frequência dos genes de *H. pylori* distribuídos quanto aos subtipos histológicos

| | <i>cagA</i> | | <i>cagE</i> | | <i>virB11</i> | | <i>vacA</i> | | | Total | | | |
|-------------------|-------------|----|-------------|----|---------------|----|-------------|-----------|------|-------|-----|---|-----|
| | - | + | - | + | - | + | s1m1 | s1m2/s2m1 | s2m2 | | | | |
| C. Lauren | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | |
| Intestinal | 17 | 39 | 28 | 28 | 22 | 34 | 14 | 42 | 45 | 11 | 53 | 3 | 56 |
| Difuso | 18 | 27 | 22 | 23 | 18 | 27 | 14 | 31 | 36 | 9 | 40 | 5 | 45 |
| Total | 35 | 66 | 50 | 51 | 40 | 61 | 28 | 73 | 81 | 20 | 101 | 8 | 101 |

Considerando apenas os casos *H. pylori* positivos constatou-se que os tumores do tipo intestinal estavam associados com o sexo masculino ($r = -0,224$; $p = 0,024$) e que no subtipo difuso os homens estavam infectados principalmente por cepas *vacAs1m2/s2m1* ($r = +0,427$; $p = 0,003$).

4.5 Análise dos polimorfismos das enzimas estudadas com os genes de *H. pylori*

Analisando-se o gene de cada uma das enzimas, individualmente, observou-se que pacientes que apresentavam os genótipos CC + CT de *iNOS*, apresentaram correlação negativa com cepas *vacAs1m2/s2m1* ($r = -0,201$; $p = 0,044$). O único indivíduo portador do genótipo homozigoto para o alelo variante (TT) de *iNOS* estava infectado com uma cepa *vacAs1m2*. Considerando o gene *PARP-1*, foi encontrada uma correlação positiva entre os pacientes portadores do genótipo homozigoto para o alelo variante (GG) e a infecção com cepas *cagE(+)* ($r = +0,201$; $p = 0,044$). Considerando o gene *APE-1*, o alelo variante (TG+GG) foi negativamente correlacionado com cepas *vacAs1m1* ($r = -0,228$; $p = 0,022$) e o homozigoto para o alelo variante (GG) foi positivamente correlacionado com cepas *vacAs1m2/s2m1* ($r = +0,212$; $p = 0,034$). Adicionalmente, os pacientes portadores do alelo

selvagem (TT+TG) de *APE-1* apresentaram correlação positiva com cepas *cagE*(+) ($r = +0,199$; $p = 0,046$).

Associações também foram encontradas quando se analisou os tumores pelo subtipo histológico. No subtipo intestinal, os pacientes portadores do alelo variante (AG+GG) de *PARP-1* estavam infectados principalmente por cepas *cagE*(+) ($r = +0,272$; $p = 0,043$), e pacientes portadores do genótipo (TT+TG) de *APE-1* eram infectados principalmente por *H. pylori virB11*(+) ($r = +0,312$; $p = 0,019$). Por outro lado, os pacientes portadores do genótipo homocigoto para o alelo variante (GG), se correlacionaram negativamente com cepas *virB11*(+) ($r = -0,312$; $p = 0,019$) e positivamente com cepas *vacAs1m2/s2m1* ($r = +0,265$; $p = 0,049$). No subtipo difuso, foi observado somente correlação com *PARP-1*, onde o genótipo heterocigoto (AG) correlacionou-se negativamente com as cepas *cagE*(+) ($r = -0,315$; $p = 0,035$).

A análise genotípica da enzima OGG-1 com *H. pylori* mostrou que não houve correlação entre os genótipos e os genes distintos da bactéria na análise geral ou por subtipo histológico. Estes resultados estão sumarizados no Quadro 1.

| Quadro 1: Correlações entre os genes de <i>H. pylori</i> e os genótipos das enzimas | | | |
|---|---------------------|----------|-------|
| GENES | Correlação com: | r= | p= |
| <i>cagE</i> (+) | <i>APE-1</i> TT+TG | + 0,199; | 0,046 |
| | <i>PARP-1</i> GG | +0,201; | 0,044 |
| <i>vacAs1m1</i> | <i>APE-1</i> TG+GG | -0,228; | 0,022 |
| <i>vacAs1m2</i> | <i>iNOS</i> TT | - | - |
| <i>vacAs1m2/s2m1</i> | <i>iNOS</i> CC + CT | - 0,201; | 0,044 |
| | <i>APE-1</i> GG | + 0,212 | 0,034 |
| INTESTINAL | | | |
| <i>cagE</i> (+) | <i>PARP-1</i> AG+GG | +0,272; | 0,043 |
| <i>virB11</i> (+) | <i>APE</i> TT+TG | +0,312; | 0,019 |
| | <i>APE</i> GG | -0,312; | 0,019 |
| <i>vacAs1m2/s2m1</i> | <i>APE</i> GG | +0,265; | 0,049 |
| DIFUSO | | | |
| <i>cagE</i> (+) | <i>PARP-1</i> AG | -0,315; | 0,035 |

4.6 Análise dos polimorfismos das enzimas estudadas considerando os genótipos de *H. pylori*

Com o intuito de analisar a possível influência dos genótipos de *H. pylori* agrupados, os casos foram reunidos considerando-se a presença da ilha de patogenicidade (*cag*-PAI), baseado na detecção dos genes *cagA*, *cagE* e *virB11*, nos alelos de *vacA*.: Grupo A, aqueles casos em que o paciente estava infectado com genótipo *vacAs1m1*; Grupo B, com cepas *vacAs1m2* ou *vacAs2m1*, sendo estes casos considerados moderadamente patogênicos e por último o Grupo C, no qual foram alocados os casos que apresentavam infecção por cepas com genótipo *vacAs2m2*. Somado a isso, dentro de cada um desses grupos, os genes de *H. pylori* foram considerados marcadores da presença de *cag*-PAI pelo seu posicionamento na ilha; Assim, os genes *cagA* e *cagE* foram considerados marcadores do lado direito e *virB11* do lado esquerdo. Dentro deste panorama, cada um dos grupos, A, B e C, foram subdivididos em quatro (1, 2, 3, e 4). O primeiro subgrupo representa os casos que possuíam os três genes usados como marcadores de *cag*-PAI (A1, B1 e C1), o segundo representa os casos que possuíam, pelo menos, um marcador do lado direito da ilha e o marcador do lado esquerdo (A2, B2 e C2), o terceiro era composto pelos casos que apresentavam apenas um gene de *cag*-PAI ou dois marcadores do mesmo lado da ilha (A3, B3 e C3), por fim, o quarto grupo era formado pelos casos que não apresentava nenhum dos três genes da ilha de patogenicidade de *H. pylori* (A4, B4 e C4). Dentro destes agrupamentos, foi observado que o grupo mais freqüente foi o grupo A, 72,2% (73/101), destacando o grupo A1, que concentra 33,6% (34/101) da amostra analisada, seguido dos grupos B (*vacAs1m2* e *vacAs2m1*), com 19,8% (20/101) e C, com 7,9% (8/101) dos casos. O grupo sem os genes estudados da ilha de patogenicidade (A4+B4+C4), representou 17,8% (18/101) dos casos.

| | iNOS | | | PARP-1 | | | APE-1 | | | OGG-1 | | | Total |
|--|-----------------|----------------|--------------|-----------------|----------------|--------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------|--------------|
| | CC | CT | TT | AA | AG | GG | TT | TG | GG | CC | CG | GG | |
| | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | n | |
| Grupo A: vacAs1m1 | | | | | | | | | | | | | |
| A1: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+) | 27/79 (34,1) | 7/21 (33,3) | - | 21/69 (30,4) | 9/28 (32,1) | 4/4 (100) | 13/37 (35,1) | 18/49 (36,7) | 3/15 (20) | 21/58 (36,2) | 13/39 (33,3) | - | 34 |
| A2: <i>cagA</i> (+) e <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+) | 10/79 (12,6) | 4/21 (19) | - | 9/69 (13) | 5/28 (17,8) | - | 7/37 (18,9) | 6/49 (12,2) | 1/15 (6,6) | 6/58 (10,3) | 5/39 (12,8) | 3/4 (75) | 14 |
| A3: <i>cagA</i> (+) ou <i>cagE</i> (+) ou <i>virB11</i> (+) ou <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+) | 16/79 (20,2) | - | - | 11/69 (15,9) | 5/28 (17,8) | - | 7/37 (18,9) | 6/49 (12,2) | 3/15 (20) | 10/58 (17,2) | 6/39 (15,3) | - | 16 |
| A4: <i>ureC</i> (+) | 5/79 (6,3) | 4/21 (19) | - | 5/69 (7,2) | 4/28 (14,2) | - | 4/37 (10,8) | 4/49 (8,1) | 1/15 (6,6) | 4/58 (6,8) | 5/39 | - | 9 |
| Grupo B: vacAs1m2 e vacAs2m1 | | | | | | | | | | | | | |
| B1: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+) | 2/79 (2,5) | 1/21 (4,76) | - | 2/69 (2,8) | 1/28 (3,5) | - | 1/37 (2,7) | 1/49 (2) | 1/15 (6,6) | 3/58 (5,1) | - | - | 3 |
| B2: <i>cagA</i> (+) e <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+) | 2/79 (2,5) | 1/21 (4,76) | - | 2/69 (2,8) | 1/28 (3,5) | - | 1/37 (2,7) | 2/49 (4) | - | - | 2/39 (5,1) | 1/4 (25) | 3 |
| B3: <i>cagA</i> (+) ou <i>cagE</i> (+) ou <i>virB11</i> (+) ou <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+) | 7/79 (8,8) | - | 1/1 (100) | 7/69 (10,1) | 1/28 (3,5) | - | - | 6/49 (12,2) | 2/15 (13,3) | 4/58 (6,8) | 4/39 (10,2) | - | 8 |
| B4: <i>ureC</i> (+) | 5/79 (6,3) | 1/21 (4,76) | - | 5/69 (7,2) | 1/28 (3,5) | - | 1/37 (2,7) | 2/49 (4) | 3/15 (20) | 4/58 (6,8) | 2/39 (5,1) | - | 6 |
| Grupo C: vacAs2m2 | | | | | | | | | | | | | |
| C1: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C2: <i>cagA</i> (+) e <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+) | 2/79 (2,5) | - | - | 2/69 (2,8) | - | - | 1/37 (2,7) | 1/49 (2) | - | - | 2/39 (5,1) | - | 2 |
| C3: <i>cagA</i> (+) ou <i>cagE</i> (+) ou <i>virB11</i> (+) ou <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+) | 1/79 (1,2) | 2/21 (9,5) | - | 2/69 (2,8) | 1/28 (3,5) | - | - | 3/49 (6,1) | - | 3/58 (5,1) | - | - | 3 |
| C4: <i>ureC</i> (+) | 2/79 (2,5) | 1/21 (4,76) | - | 3/34 (4,3) | - | - | 2/37 (5,4) | - | 1/15 (6,6) | 3/58 (5,1) | - | - | 3 |
| Total | 79 | 21 | 1 | 69 | 28 | 4 | 37 | 49 | 15 | 58 | 39 | 4 | 101 |

A distribuição dos casos de acordo com o polimorfismo estudado nos grupos genotípicos de *H. pylori* é apresentada na Tabela 11, onde se observou que os pacientes portadores dos genótipos selvagens estavam infectados principalmente por cepas mais patogênicas (A1 e A2). As cepas do grupo A3 infectavam pacientes portadores do genótipo selvagem (CC) de *iNOS*, ($r = +0,229$; $p = 0,021$), sendo encontrada uma diferença estatística deste com os demais grupos ($p = 0,021$). Observou-se também que das três cepas C3, 2 estavam associadas aos portadores do alelo variante (CT) ($r = +0,198$; $p = 0,047$). Adicionalmente, todos os pacientes com o genótipo homozigoto para o alelo variante (GG) de *PARP-1* estavam infectados com cepas do grupo A1 ($r = + 0,285$; $p = 0,004$) sendo encontrada uma diferença estatística quando comparado com outros grupos ($p = 0,004$). Com relação aos genótipos de *APE-1*, foi vista uma correlação positiva entre o genótipo homozigoto para o alelo variante (GG) e o grupo B4 ($r = +0,248$; $p = 0,012$). Também foi vista uma diferença estatística entre a alta frequência de pacientes portadores do alelo selvagem (TT+TG) não infectados com cepas do grupo B4 ($p = 0,013$) em relação aos infectados. A análise genotípica de *OGG-1* mostrou que os pacientes portadores do genótipo homozigoto variante (GG) estavam infectados principalmente por cepas A2, que se mostrou estatisticamente diferente dos outros grupos de *H. pylori* ($p = 0,008$). Curiosamente, no subtipo intestinal, os indivíduos com genótipo selvagem (AA) de *PARP-1* estavam correlacionados positivamente ao grupo de cepas sem *cag-PAI* [(A4+B4+C4); $r = + 0, 270$; $p = 0,045$]. Esses resultados estão sumarizados no Quadro 2.

| Quadro 2: Correlações entre os grupos de <i>H. pylori</i> e os genótipos das enzimas | | | | |
|---|------------------------|-----------|-----------|--|
| GRUPOS | Correlação com: | r= | p= | |
| A1 | <i>PARP-1</i> GG | 0,285 | 0,004 | |
| A2 | <i>OGG-1</i> GG | - | 0,008 | |
| A3 | <i>iNOS</i> CC | +0,229 | 0,021 | |
| B4 | <i>APE-1</i> GG | +0,248 | 0,012 | |
| Sem B4 | <i>APE-1</i> TT + TG | - | 0,013 | |
| C3 | <i>iNOS</i> CT | 0,198 | 0,047 | |
| INTESTINAL | | | | |
| A4+B4+C4 | <i>PARP-1</i> AA | 0,270 | 0,045 | |

4.7 Comparações entre cepas de *H. pylori* de alta e baixa patogenicidade

A análise dos casos também foi feita considerando o perfil de virulência de *H. pylori* como o grupo de cepas de alta virulência (A1->B2), ou de baixa virulência (B3->C4) devido à frequência das cepas menos virulentas ser menor. Por essas análises, observou-se para o gene da enzima *iNOS*, uma alta frequência de cepas virulentas independente do genótipo não sendo, portanto, identificada diferença estatística nessa distribuição (Figura 22).

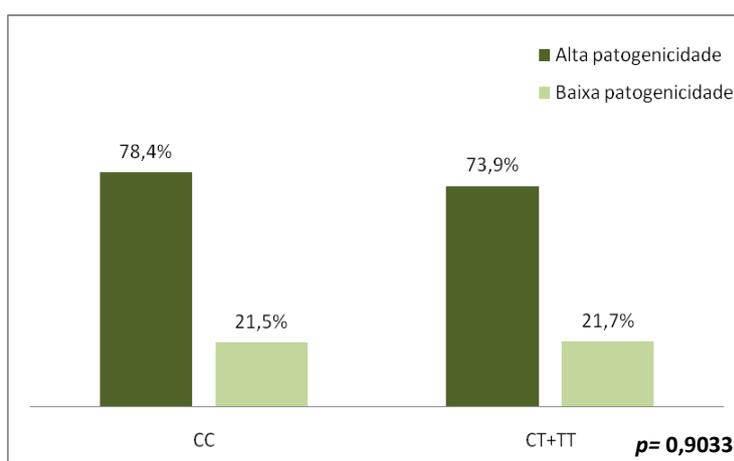


Figura 22: Distribuição dos casos de câncer gástrico segundo o genótipo de *iNOS* e quanto à patogenicidade das cepas infectantes

Com relação ao gene *PARP-1*, 29 de 32 indivíduos portadores do alelo variante (AG ou GG) estavam infectados por cepas de alta patogenicidade (Figura 23). Curiosamente, os pacientes que portavam o genótipo selvagem (AA) de *PARP-1* foram significativamente mais infectados por cepas pouco patogênicas em 27,5% (19/69) casos ($p= 0,0396$). Dessa maneira, foi verificado, para estes pacientes, os genótipos das outras enzimas de reparo, identificando-se que 78,9% (15/19) eram portadores do alelo variante de *APE-1* (TG+GG) e 36,8% (7/19) eram portadores do genótipo heterozigoto de *OGG-1*.

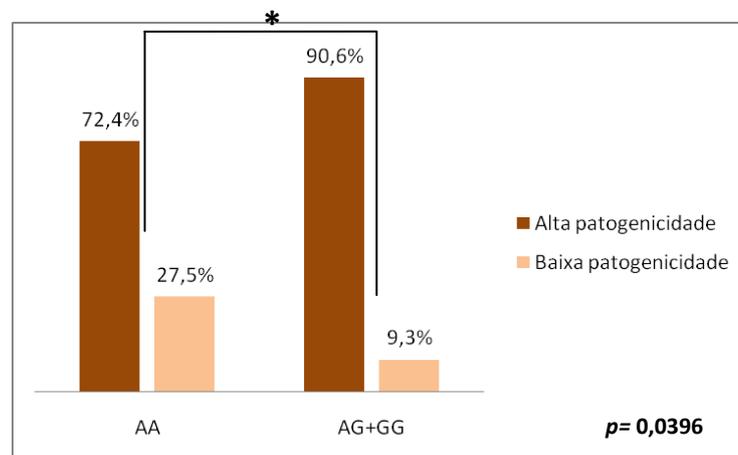


Figura 23: Distribuição dos casos de câncer gástrico segundo o genótipo de *PARP-1* e quanto à patogenicidade das cepas infectantes. * $p<0,05$

Por outro lado, considerando *APE-1* os pacientes com o genótipo heterozigoto e homozigoto para o alelo polimórfico (TG e GG) estavam significativamente infectados por cepas pouco patogênicas ($p= 0,0422$) (Figura 24).

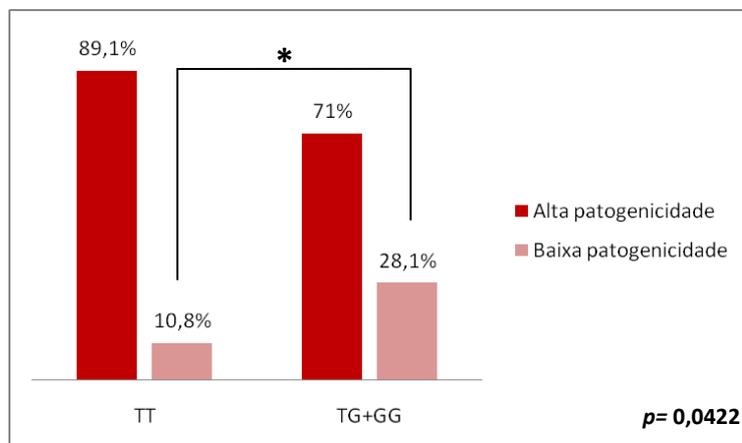


Figura 24: Distribuição dos casos de câncer gástrico segundo o genótipo de *APE-1* e quanto à patogenicidade das cepas infectantes. * $p < 0,05$

Não foi observada diferença quanto aos genótipos de *OGG-1* em relação à patogenicidade da cepa infectante em nenhuma das análises: CC+CG vs GG ($p = 0,22$); CC vs CG ($p = 0,67$) ou CC vs CG+GG ($p = 0,505$) a qual é mostrada na Figura 25.

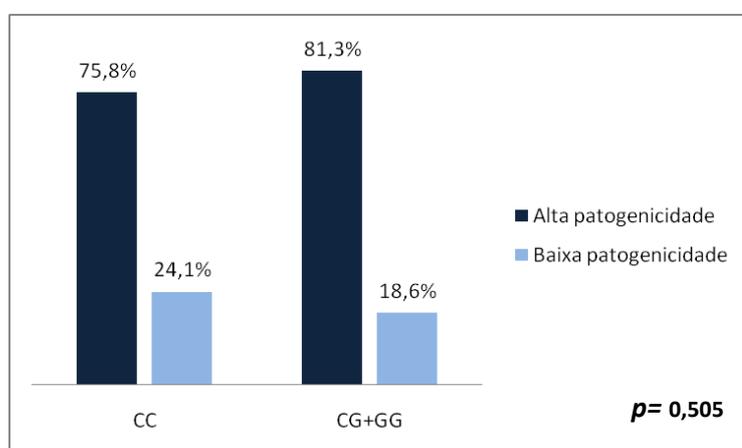


Figura 25: Distribuição dos casos de câncer gástrico segundo o genótipo de *OGG-1* e quanto à patogenicidade das cepas infectantes

A distribuição das cepas patogênicas ou com baixa patogenicidade nos casos homocigotos selvagens para o gene de cada enzima de reparo (Figura 26) revelou uma diferença significativa entre os alelos variantes de *PARP-1* e *APE-1*, onde 19 pacientes com genótipo selvagem de *PARP-1* estavam infectados por cepas de baixa patogenicidade,

enquanto que apenas quatro pacientes portadores do genótipo selvagem de *APE-1*, estavam infectados por essas cepas ($p=0,046$). Entre *APE-1* (TT) e *OGG-1* (CC) foi vista apenas uma ligeira diferença ($p=0,075$) e entre *OGG-1*(CC) e *PARP-1* (AA) não houve diferença estatística ($p=0,6635$).

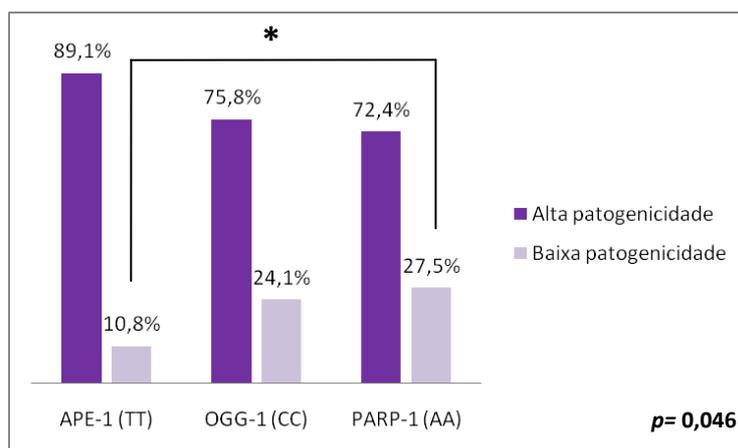


Figura 26: Distribuição dos casos de câncer gástrico segundo a patogenicidade das cepas infectantes de *H. pylori* nos casos homocigoto selvagem para o gene de cada enzima de reparo estudada. * $p<0,05$

4.8 Análise dos genes de *H. pylori* com os polimorfismos das quatro enzimas associados

Com o intuito de observar a influência dos polimorfismos em associação, os pacientes foram agrupados de acordo com o seu perfil genotípico em relação às enzimas de reparo e de síntese do óxido nítrico. Inicialmente, os pacientes foram classificados como homocigotos selvagens a) HS: presença do genótipo homocigoto selvagem para as quatro enzimas estudadas; b) HET: se portavam pelo menos um gene em heterocigose subdivididos em 1HET, 2HET e 3HET ou 4HET; c) POL: se portavam apenas um gene em homocigose para um alelo polimórfico, sendo os demais homocigotos selvagens; e d) POL+HET, para aqueles que além de um gene em homocigose para um alelo variante apresentavam heterocigose para outros genes estudados, formando assim dois subgrupos: POL+1HET e POL+2HET. Também os grupos POL e POL+HET foram reunidos formando o grupo V, considerando que estes

pacientes apresentavam pelo menos um gene em homozigose para um alelo variante. Dos 109 pacientes incluídos neste estudo, nenhum apresentou homozigose para um alelo variante em mais de um gene das enzimas estudadas.

A frequência dos grupos formados é mostrada na Figura 27 onde se vê que a maior frequência foi de pacientes portando um ou dois alelos variante, (1HET +2HET), representando a maioria dos casos, contrastando com apenas um paciente, que apresentou os quatro genes das enzimas em heterozigose.

Considerando o total das amostras, notou-se correlações positivas entre os pacientes do grupo (POL) e pacientes com 14-44 anos ($r= + 0,193$; $p= 0,044$) e entre o grupo POL+2HET e pacientes com 45-54 anos ($r= +0,229$; $p= 0,017$).

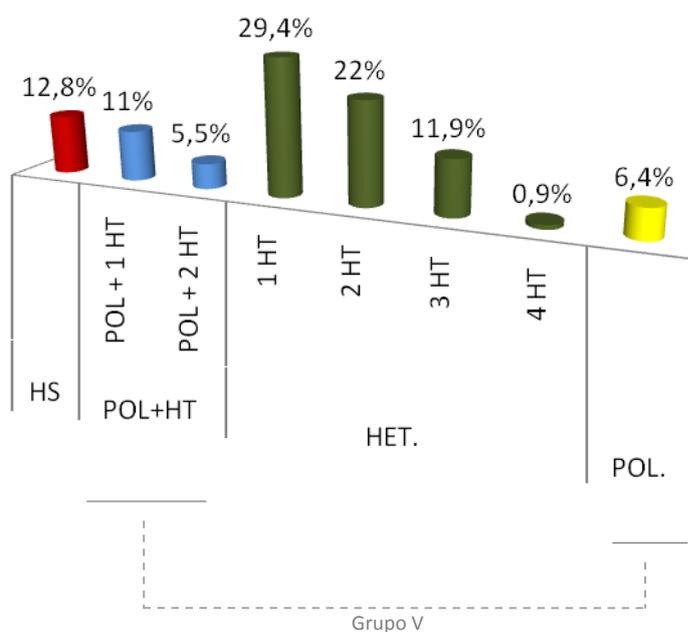


Figura 27: Distribuição dos possíveis grupos formados a partir das diferentes combinações possíveis dos genótipos das enzimas de reparo e de síntese de óxido nítrico

Considerando-se apenas as amostras positivas para *H. pylori* (Tabela 12) notou-se que o único caso que apresentou os quatro genes estudados em heterozigose estava infectado por uma cepa do grupo A4 sem os genes estudados da ilha de patogenicidade *cag*. O grupo de pacientes portadores do genótipo POL+2HET estavam, na sua maioria, infectados com cepas

mais patogênica ($r = +0,263$; $p = 0,008$). O grupo POL se correlacionou positivamente com as cepas menos patogênicas A4+B4+C4 ($r = +0,211$; $p = 0,034$).

Tabela 12: Distribuição dos agrupamentos possíveis dos genes das enzimas nos grupos de *H. pylori*

| | | <i>H. pylori</i> (-) | A1 | A2 | A3 | A4 | B1 | B2 | B3 | B4 | C2 | C3 | C4 | Total |
|-------------------------|---|-------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| HS: (CC)+(TT)+(CC)+(AA) | | 2 | 3 | 3 | 4 | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | 14 |
| HET | 1HET: (CT) ou (TG) ou (CG) ou (AG) | 2 | 12 | 3 | 4 | 3 | - | - | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 32 |
| | 2HET: (CT)+(TG) ou (CT)+(CG) ou (CT)+(AG) ou (TG) + (CG) ou (TG) + (AG) ou (CG) + (AG) | 1 | 9 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | - | 2 | 1 | 1 | - | 24 |
| | 3HET: (CT+TG+CG) ou (CT+TG+AG) ou (CT+CG+AG) ou (TG)+(CG)+(AG) | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | - | 1 | - | 13 |
| | 4HET: (CT+TG+CG+AG) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Grupo V | POL: (TT) ou (GG) ou (GG) ou (GG) | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | 2 | - | - | 1 | 7 |
| | POL+1HET: [(TT) ou (GG) ou (GG) ou (GG)] + [(CT) ou (TG) ou (CG) ou (AG)] | - | 4 | - | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | - | - | - | 12 |
| | POL+2HET: [(TT) ou (GG) ou (GG) ou (GG)] + [(CT)+(TG) ou (CT)+(CG) ou (CT)+(AG) ou (TG) + (CG) ou (TG) + (AG) ou (CG) + (AG)] | - | 2 | 3 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 6 |
| | Total | 8 | 34 | 14 | 16 | 9 | 3 | 3 | 8 | 6 | 2 | 3 | 3 | 109 |

Para avaliar a influência da associação dos polimorfismos apenas nos genes das enzimas de reparo (desconsiderando o gene da enzima iNOS), os casos foram agrupados usando o mesmo critério do perfil genotípico já descrito. Nesta análise foi observada uma correlação positiva entre o grupo 2HET com pacientes da faixa etária 45-54 anos ($r = +0,199$; $p = 0,038$) e, curiosamente, observou-se que dois dos três casos de cepas de patogenicidade muito baixa (C4), estavam infectando indivíduos do grupo HS ($r = +0,233$; $p = 0,019$).

A fim de se observar o perfil de susceptibilidade dos genótipos das enzimas de reparo associada à presença de cepas de *H. pylori*, os genes das enzimas foram analisados associando-os dois a dois. Em relação à associação APE-1 e OGG-1, observou-se que os pacientes heterozigotos para o gene de uma das duas enzimas se correlacionaram positivamente com cepas *cagA*(+) ($r = +0,248$; $p = 0,012$) e também com o grupo A1 ($r = +0,276$; $p = 0,005$) e o grupo C3 ($r = +0,203$; $p = 0,042$). Observou-se também uma correlação positiva entre pacientes portando um dos dois genes em homozigose para um alelo variante e cepas *s1m1* ($r = +0,206$; $p = 0,039$) bem como cepas do grupo B4 ($r = +0,197$; $p = 0,048$). Considerando APE-1 e PARP-1, foi vista uma correlação positiva entre os pacientes que

portavam um dos dois genes em homozigose para um alelo variante e cepas *s1m2/s2m1* ($r= +0,232$; $p= 0,020$), bem como cepas do grupo B4 ($r= +0,263$; $p= 0,008$). A análise dos genótipos das enzimas PARP-1 e OGG-1 mostrou uma correlação positiva entre os indivíduos que apresentavam pelo menos um dos dois genes em homozigose para um alelo variante, podendo o outro estar ou não em heterozigose, com cepas *virB11(+)* ($r= +0,238$; $p=0,017$), além de uma correlação positiva com cepas do grupo A2 ($r= +0,201$; $p= 0,044$).

Correlações entre os genes das enzimas de reparo foram vistas no grupo de pacientes infectados por cepas sem os genes estudados da ilha *cag* (A4+B4+C4), onde o genótipo selvagem de *iNOS* (CC) e o alelo variante (TG+GG) de *APE-1* ($r= +0,645$; $p= 0,004$) se correlacionaram positivamente. A correlação oposta também foi vista entre o alelo variante de *iNOS* (CT ou CT+TT) e o genótipo selvagem de *APE-1* [TT ($r= +0,645$; $p= 0,004$)]. Por outro lado, também foi vista correlação entre os genes das enzimas, no grupo de pacientes infectados pelas cepas mais virulentas (A1), onde o genótipo heterozigoto de *APE-1* (TG) e o genótipo selvagem de *OGG-1* (CC) se correlacionaram positivamente ($r= +0,350$; $p= 0,043$).

Finalizando, para observar a relevância de cada polimorfismo estudado nos genes das enzimas de reparo, as análises das associações entre eles foram realizados fixando o genótipo de uma delas e comparando com as cepas mais e menos virulentas. A tabela 13 e Anexo V mostra as frequências e as significâncias destas análises, onde se observou que um perfil de susceptibilidade do hospedeiro à infecção por cepas menos patogênicas é conferido pela presença dos alelos variantes de *APE-1* independentemente do genótipo das demais enzimas de reparo.

Tabela 13: Frequência das associações dos genes das enzimas de reparo comparadas com as cepas mais e menos virulentas

| <i>APE(T->G) + OGG-1(C->G)</i> | A1->B2 | B3->C4 | <i>p=</i> |
|--|-------------|-------------|-----------------|
| TT/CC | 18 | 3 | |
| TT/CG | 14 | 1 | |
| TT/GG | 1 | 0 | |
| | (33) | (4) | |
| TG/CC | 20 | 8 | |
| TG/CG | 14 | 4 | |
| TG/GG | 3 | 0 | |
| GG/CG | 3 | 3 | |
| GG/CC | 6 | 3 | |
| | (46) | (18) | <i>p=0,042</i> |
| <i>APE(T->G) + PARP-1(A->G)</i> | | | |
| TT/AA | 21 | 4 | |
| TT/AG | 10 | 0 | |
| TT/GG | 2 | 0 | |
| | (33) | (4) | |
| TG/AA | 23 | 9 | |
| TG/AG | 12 | 3 | |
| TG/GG | 2 | 0 | |
| GG/AA | 6 | 6 | |
| GG/AG | 3 | 0 | |
| | (46) | (18) | <i>p=0,042</i> |
| <i>PARP(A->G) + OGG(C->G)</i> | | | |
| AA/CC | 29 | 12 | |
| AA/CG | 18 | 7 | |
| AA/GG | 3 | 0 | |
| | (50) | (19) | |
| AG/CC | 13 | 2 | |
| AG/CG | 11 | 1 | |
| AG/GG | 1 | 0 | |
| GG/CC | 2 | 0 | |
| GG/CG | 2 | 0 | |
| | (29) | (3) | <i>p=0,0396</i> |
| Total geral | 79 | 22 | |

5. Discussão

5.1 Aspectos Clínico-Epidemiológicos do Câncer Gástrico

O número de casos de câncer gástrico tem diminuído nas últimas décadas, embora sua incidência ainda seja significativa na China, Coréia, Japão, parte da América Central e do Sul (KHALIFA, et al., 2010). Mundialmente, essa neoplasia é a segunda em causa de morte por câncer (CREW e NEUGUT, 2006) e no Brasil, é a quinta mais frequente entre os homens e a terceira entre as mulheres, estimando-se a ocorrência de 13.820 novos casos entre eles e 7.680 casos entre elas. O nordeste possui alta prevalência de câncer gástrico, sendo as estimativas do INCA (2010), para o estado do Ceará, de 730 novos casos, sendo 190 desses em Fortaleza. Isso posiciona o estado do Ceará, oficialmente, em quinto lugar quanto ao número de novos casos de câncer gástrico nesse ano, logo depois do Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo e São Paulo.

Neste estudo foram incluídos 109 casos de câncer gástrico obtidos de pacientes atendidos em três hospitais de Fortaleza. Nessa amostra os homens foram acometidos duas vezes mais do que as mulheres, o que reproduz as estimativas do INCA, nas quais a relação homem/mulher é de 1,79; bem como as descritas na literatura (CESAR et al., 2002; VERDECCHIA et al., 2004).

Mais da metade dos pacientes integrantes desta pesquisa tinham idade maior ou igual a 65 anos e a menor idade encontrada foi a de 23 anos, refletindo o caráter tardio do câncer gástrico, cuja incidência é caracterizada por aumentar progressivamente com a idade, com prevalência entre 50 e 70 anos (CREW e NEUGUT, 2006).

A região anatômica mais frequente (75,3% dos casos) foi a região não-cárdia, correspondendo à descrição da IARC (2000) e ao estudo de Thomazini et al., (2006) que relata a porção distal do estômago como o sítio mais frequente dos tumores gástricos.

Diferindo dos tumores não-cárdia, os tumores localizados na cárdia foram mais frequentes nos homens, corroborando com o estudo de Liu et al., (2004) que mostrou essa associação em uma população do Japão e com os dados de Freedman et al., (2010), em uma população dos Estados Unidos.

Mais de 60% dos pacientes apresentaram tumores nos estadiamentos mais avançados (III e IV), caracterizando a identificação tardia do tumor. A triagem e a detecção dos tumores gástricos em estádios iniciais em indivíduos assintomáticos conferem uma diminuição na mortalidade, entretanto, poucos casos de câncer gástrico são descobertos nos estádios recentes, mesmo em países desenvolvidos como os Estados Unidos. No entanto, no Japão, onde a incidência é alta, a identificação de tumores em estádios recentes é relacionada à existência de programas de rastreamento, em massa, dessa neoplasia (CREW e NEUGUT, 2006). Nos demais países, o diagnóstico tardio é devido ao fato de que não existem sintomas específicos do desenvolvimento do câncer gástrico (HARTGRINK, et al., 2009). No presente estudo, outra possível explicação é a baixa condição sócio-econômica desses pacientes, e portanto, com acesso limitado à assistência médica, tendo em vista que esta pesquisa foi conduzida em hospitais do sistema de saúde público do Brasil.

Considerando o subtipo histológico, verificou-se frequências similares dos tipos intestinal e difuso. Embora o tipo intestinal seja apontado como o mais frequente pela IARC (2000), Crew e Neugut, (2006), relatam um declínio na incidência dos tumores do tipo intestinal e um aumento de tumores do tipo difuso, contribuindo para as frequências equivalentes, atualmente encontradas. Outros estudos, assim como este, também não encontraram predomínio de um dos dois tipos histológicos, sendo observadas, para os tumores do tipo intestinal, frequências que variaram de 51%, em um estudo realizado em São Paulo, a 58,6% em um estudo realizado em Belém, (PEREIRA et al., 2001; LOPES et al., 2004).

O tipo intestinal é descrito, na literatura, ser mais comum em homens e pessoas mais velhas, enquanto que o tipo difuso tem uma taxa homem/mulher equivalente sendo mais freqüente em indivíduos jovens (LAUREN, 1965; LUNDEGARDH, et al., 1991). Essas prevalências quanto ao gênero e à faixa etária, também foram vistas neste estudo.

5.2 Frequência dos polimorfismos C150T de iNOS, T2197G de APE-1, A40676G de PARP-1 e C1245G de OGG-1 e sua associação com aspectos clínico-epidemiológicos

Polimorfismos nos genes de várias enzimas de reparo do DNA, incluindo os genes de APE-1, OGG-1 e PARP-1, têm sido bastante estudados em vários tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico, devido ao seu papel crítico na manutenção da integridade do genoma (GOODE, et al., 2002; HUNG, et al., 2005; CAPÉLLA, et al., 2008). Alguns estudos experimentais têm mostrado que variações funcionais nesses genes podem alterar as funções do sistema BER (HADI, 2000; VODICKA, et al., 2007). Vários estudos de risco também apontam a influência desses polimorfismos nesse sentido (FIGUEROA et al., 2007; PARDINI et al., 2008; LI et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Diferente desses estudos, o aqui proposto teve como objetivo, associar os polimorfismos presentes em enzimas de reparo, com a histopatologia do câncer gástrico, além de verificar, pela primeira vez, uma correlação *in vivo* entre o genótipo da cepa de *H. pylori* e polimorfismos dos genes de enzimas de reparo do DNA (APE-1, OGG-1 e PARP-1) e da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS).

Na amostra de câncer gástrico estudada, destacou-se a baixíssima freqüência de indivíduos portadores do genótipo homocigoto para o alelo variante da enzima iNOS, onde apenas um indivíduo foi identificado com esse genótipo. Baixas freqüências de indivíduos TT são observadas também na literatura mundial (Tabela 22), onde se destaca a freqüência de TT semelhante a do presente estudo, entre os portadores de acalasia (desordem do esôfago), além

de uma completa ausência desse genótipo entre os indivíduos saudáveis desse mesmo estudo, que foi conduzido na Espanha (Fermín-Mearin, et al., 2006). No estudo do Japão foi observada também uma baixa frequência (0,5%) em câncer gástrico. Já no Brasil, os dados em câncer gástrico foram maiores que os observados no presente estudo, indicando a heterogeneidade alélica entre as várias regiões do Brasil.

Tabela 14: Frequências genótípicas de estudos epidemiológicos do polimorfismo C150T do gene iNOS

| | População | Doença | | iNOS (%) | | |
|-----------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | | | | CC | CT | TT |
| Silva-Fernandes, 2010 | Brasil (CE) | Câncer Gástrico | Casos | 78 | 21,1 | 0,9 |
| Jorge et al., 2010 | Brasil (SP) | Câncer Gástrico | Casos | 70,7 | 24 | 5,3 |
| | | | Controles | 69 | 23,8 | 7,2 |
| Shen, et al., 2004 | China | Câncer Gástrico | Casos | 75,5 | 23 | 1,4 |
| | | | Controles | 76,8 | 19,9 | 3,2 |
| Goto, et al., 2006 | Japão | Câncer Gástrico | Casos | 87,1 | 12,4 | 0,5 |
| | | | Controles | 88,8 | 10,6 | 0,66 |
| Wang, et al., 2006 | EUA | Linfoma não-Hodkin | Casos | 67 | 31 | 2 |
| | | | Controles | 66 | 30 | 4 |
| Qu, et al., 2007 | China | Silicose em tuberculose pulmonar | Casos | 76,1 | 21,7 | 2,2 |
| | | | Controles | 60,4 | 37,8 | 1,8 |
| Bhatnagar, et al., 2007 | Nova Déli (Índia) | Pré-eclampsia | Casos | 78,5 | | 21,5 |
| | | | Controles | 78 (C) | | 22 (T) |
| Li, et al., 2007 | Texas (USA) | Melanoma Cutâneo | Casos | 65,2 | 31 | 3,8 |
| | | | Controles | 67,1 | 30,6 | 2,3 |
| Martín, et al., 2007 | Espanha | Doença de Crohn | Casos | 71,1 DC ¹ | 25,6 DC ¹ | 3,2 DC ¹ |
| | | Colite Ulcerativa | | 62,5 CU ² | 34,9 CU ² | 2,5 CU ² |
| | | | Controles | 65,2 | 30,8 | 3,9 |
| Fermín-Mearin, et al., 2006 | Espanha | Acalasia | Casos | 89,7 | 9,3 | 0,9 |
| | | | Controles | 84,6 | 15,4 | 0 |

NCBI³

(qC= 0,87; qT= 0,12)

¹ Doença de Crohn² Colite Ulcerativa³ National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

A enzima iNOS é capaz de produzir altos níveis de óxido nítrico por um período de tempo prolongado e a produção continuada de altos níveis dessa molécula resulta em

inflamação crônica e dano tecidual (WANG, 2006). Por outro lado, no estudo de Hussain, et al., (2004) foi observado que pequenas quantidades de ON diminuem a tumorigênese pela indução da apoptose. Adicionalmente, o polimorfismo de iNOS (C150T) foi relacionado por Shen, et al., (2004) e Wang, et al., (2006) ao aumento da atividade da enzima, e foi associado ao risco de câncer gástrico relacionado a *H. pylori* em uma população japonesa (GOTO et al., 2006) e também quando associado a pacientes com histórico de tabagismo ou etilismo (SHEN, et al., 2004), embora no estudo de Jorge et al., (2010), em uma população brasileira, não tenha sido observada associação desse polimorfismo com a gastrite crônica ou câncer gástrico.

Estratificando os casos pela idade, foi observado, neste estudo, que os indivíduos com idade menor de 55 anos apresentavam frequência significativa do alelo variante de iNOS (CT+TT), enquanto que os pacientes com idade igual ou acima de 55 anos portavam principalmente o genótipo selvagem (CC). Esses achados sugerem uma associação do alelo variante no desenvolvimento de câncer gástrico em idade precoce. Por outro lado, associação do alelo selvagem com a idade é justificada pelos estudos de Escames et al., (2006) que verificou, em um modelo animal, um aumento natural da atividade de iNOS e do conteúdo de ON em decorrência da idade. Nesse sentido, considerando que o aumento na atividade de iNOS ocorre naturalmente no processo de envelhecimento e que o câncer gástrico é uma doença de caráter tardio, é razoável sugerir que o aumento da atividade dessa enzima, provocada pela presença do polimorfismo, esteja relacionada ao desenvolvimento precoce da doença (Figura 28).



Figura 28: Gráfico ilustrativo da influência do alelo variante de iNOS na idade do desenvolvimento do câncer gástrico. → Representa o indivíduo infectado por *H. pylori* e portador do polimorfismo estudado.

Considerando a frequência do homocigoto para o alelo variante de PARP-1 (GG), observou-se uma grande variação de acordo com a população estudada. Nesse estudo, a frequência do alelo polimórfico foi baixa, semelhante àquela dos casos de melanoma cutâneo encontradas por Li et al., (2006) em um estudo realizado no Texas (Tabela 23).

O polimorfismo de PARP-1 (A40676G) é localizado no domínio catalítico da proteína o que pode reduzir a habilidade de PARP-1 em interagir com outras proteínas, afetando a eficiência do BER (LI et al., 2009).

Os portadores do alelo variante de PARP-1 (AG ou GG), assim como para iNOS, foram significativamente mais frequentes nos indivíduos mais jovens, sugerindo que os pacientes portadores do polimorfismo de PARP-1 desenvolvem câncer gástrico em idade precoce para o câncer gástrico (Figura 29). Esse achado é corroborado pelos experimentos realizados por Mishra e Das (1992) e Quesada et al.,(1990) em células de cérebros de modelos

animais, onde foi demonstrado que ocorre diminuição natural da atividade de PARP-1, relacionada à idade, levantando a hipótese de que a diminuição da atividade de PARP-1 em indivíduos senescentes resulta em diminuição da capacidade de reparo e consequente vulnerabilidade aos diferentes danos ao DNA (STROSZNAJDER et al., 2000). Assim, tendo em vista que a diminuição na atividade da enzima ocorre naturalmente com o envelhecimento e sendo o câncer gástrico uma doença de caráter tardio, os achados do presente estudo sugerem que a diminuição na atividade de PARP-1 em decorrência da presença do polimorfismo está relacionada ao desenvolvimento precoce dessa neoplasia.

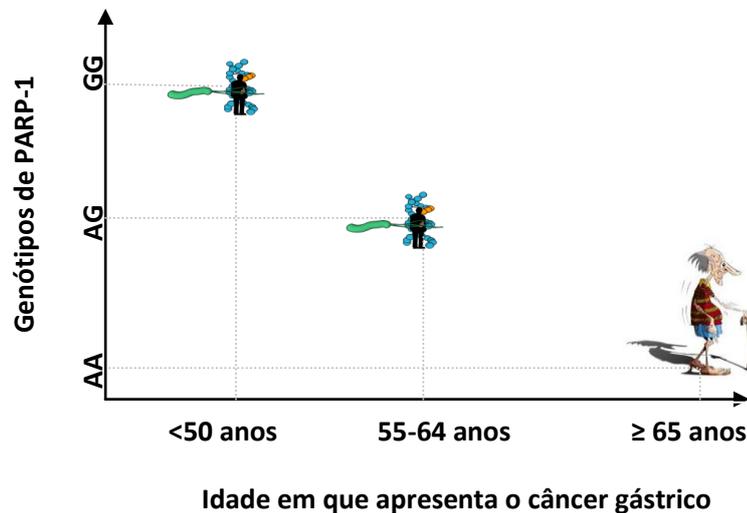


Figura 29: Gráfico ilustrativo da influência do alelo variante de PARP-1 na idade do desenvolvimento do câncer gástrico.  → Representa o indivíduo infectado por *H. pylori* e portador do polimorfismo estudado.

A presença do polimorfismo A40676G de PARP-1, já foi associado à ocorrência de câncer de bexiga (FIGUEROA et al., 2007), embora um outro estudo tenha mostrado, que a presença desse polimorfismo de PARP-1 se associou à diminuição do risco de linfoma não-Hodkin em homens coreanos; mostrando que a associação desse variante de PARP-1 e malignidade revela resultados controversos de acordo com o órgão afetado (JIN, et al., 2010). Por outro lado, a associação desse polimorfismo com lesões gástricas, também é controversa, uma vez que Zhang et al., (2009) observou que o genótipo homozigoto para o alelo variante

conferiu um risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, enquanto que Li et al., (2009) não observou risco para a progressão de lesões gástricas.

Tabela 15: Frequências genotípicas de estudos epidemiológicos do polimorfismo A40676G do gene PARP-1

| | População | Doença | | PARP-1 (%) | | |
|-------------------------|---------------|--------------------|-----------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| | | | | AA | AG | GG |
| Silva-Fernandes, 2010 | Brasil | Câncer Gástrico | Casos | 69,7 | 26,6 | 3,7 |
| Jin, et al., 2010 | Coréia do sul | Linfoma não-Hodkin | Casos | 33 | 48,7 | 18,3 |
| | | | Contr. | 30,7 | 49,1 | 20,2 |
| Li, et al., 2006 | Texas (USA) | Melanoma Cutâneo | Casos | 72,6 | 24,4 | 3 |
| | | | Contr. | 68,5 | 28,7 | 2,8 |
| Wang, et al., 2006 | EUA | Linfoma não-Hodkin | Casos | 67 | 31 | 2 |
| | | | Controles | 66 | 30 | 4 |
| Nikitin, et al., 2008 | Rússia | Diabetes tipo I | Casos | 74,2 | 16,1 | 9,7 |
| | | | Contr. | 87,2 | 11,6 | 1,2 |
| Zhai, et al., 2006 | China | Câncer de Mama | Casos | 29,4DBM ¹ | 50,7DBM ¹ | 19,9DBM ¹ |
| | | | | 33,1 CM ² | 50,7 CM ² | 19,9 CM ² |
| | | | Contr. | 30,8 | 51,8 | 17,4 |
| Zhang, et al., 2009 | China | Câncer Gástrico | Casos | 56,6 | 33,1 | 10,3 |
| | | | Contr. | 35,9 | 50,4 | 13,7 |
| Li et al., 2009 | China | Lesões Gástricas | Casos | 48,7 | 41,7 | 9,6 |
| | | | Contr. | 49,8 | 38,1 | 12,1 |
| NCBI³ | | | | (qA= 0,83; qG= 0,16) | | |

¹ Doença Benigna da Mama

² Câncer de Mama

³ National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

A frequência genotípica do homozigoto para o alelo variante de OGG-1 (GG) encontrada neste estudo foi semelhante àquela encontrada por Hanaoka, et al., (2001) em pacientes brasileiros com câncer gástrico, contrastando com a frequência observada, pela mesma autora, entre os pacientes brasileiros, descendentes de japoneses (primeira e segunda gerações) com a mesma doença (Tabela 24).

Dentre os vários polimorfismos descritos no gene *OGG-1*, o polimorfismo C1245G é relacionado à uma diminuição da capacidade de reparo do DNA (COLLINS e GAIVÃO, 2007; RUYCK et al., 2007). Nas lesões gástricas, esse polimorfismo foi associado, em pacientes japoneses com gastrite atrófica, à alta susceptibilidade ao câncer gástrico

(TSUKINO et al., 2004) e o estudo de Li et al., (2009) associou esse polimorfismo à evolução de lesões gástricas relacionadas a *H. pylori* em uma população chinesa.

Diferente de iNOS e PARP-1, não foi observada, neste estudo, associação do polimorfismo estudado em *OGG-1* com a idade dos pacientes.

Tabela 16: Frequências genotípicas de estudos epidemiológicos do polimorfismo C1245G do gene OGG-1

| | População | Doença | | OGG-1 (%) | | |
|--------------------------------|--|--------------------------|--------|--|---|--|
| | | | | CC | CG | GG |
| Silva-Fernandes, 2010 | Brasil (CE) | Câncer Gástrico | Casos | 56 | 39,4 | 4,6 |
| Hanaoka, et al., 2001 | Brasil (SP) | Câncer Gástrico | Casos | 34JB ¹ 64NJB ² | 50 JB ¹ 32 NJB ² | 16 JB ¹ 4 NJB ² |
| | | | Contr. | 35JB ¹ 60 NJB ² | 44 JB ¹ 36 NJB ² | 21 JB ¹ 4 NJB ² |
| Rohr, et al., 2010 | Brasil (RS) | 'Exposição a pesticidas' | Casos | 60,4 | 36,8 | 2,8 |
| | | | Contr. | 65 | 30 | 5 |
| Parildar-Karpuzo, et al., 2002 | Turquia | Doença de Alzheimer | Casos | 48,3 | 45,1 | 6,6 |
| | | | Contr. | 55,9 | 40,9 | 3,2 |
| Le Marchand, et al., 2002 | Caucasianos Japoneses, Havaianos | Câncer de Pulmão | Casos | 26,1 10 5 | 13 13,4 10,4 | 3 9 9,7 |
| | | | | 41,1 | 36,8 | 18,7 |
| | | | Contr. | 24,1 12,3 7,1 | 13 18,2 11,8 | 1,9 6,4 4,6 |
| | | | | 43,5 | 43 | 12,9 |
| Kasahara, et al., 2008 | Japão | Câncer Colorretal | Casos | 25 | 75 | |
| | | | Contr. | 32,2 | 67,8 | |
| Vodicka, et al., 2007 | Eslováquia ocidental e Bohemia Oriental | População saudável | Contr. | 63,6 | 30,9 | 5,3 |
| NCBI ³ | | | | (qC= 0,7; qG= 0,29) | | |

¹ Brasileiros descendentes de japoneses (primeira e segunda gerações)

² Brasileiros não japoneses

³ National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Contrastando com os outros polimorfismos estudados, o polimorfismo no gene de APE-1 (T2197G) é freqüente na população mundial (HADI et al., 2000). Essa alta frequência também foi observada neste estudo, onde o grupo heterozigoto foi o genótipo predominante. Alta frequência do genótipo heterozigoto também pode ser observada em outras populações

(Tabela 25). É interessante notar que no estudo de Parildar-Karpuzo, et al., (2002), com pacientes da Turquia, o genótipo homozigoto para o alelo variante tem uma frequência tão alta quanto à do homozigoto selvagem, o que difere dos demais estudos.

Tabela 17: Frequências genótípicas de estudos epidemiológicos do polimorfismo T2197G do gene APE-1

| | População | Doença | | APE-1 (%) | | |
|--------------------------------|---|---------------------|--------|--------------------|------|------|
| | | | | TT | TG | GG |
| Silva-Fernandes, 2010 | Brasil | Câncer Gástrico | Casos | 38,5 | 47,7 | 13,8 |
| Parildar-Karpuzo, et al., 2008 | Turquia | Doença de Alzheimer | Casos | 50,5 | 33 | 49,5 |
| | | | Contr. | 51,6 | 34,4 | 48,4 |
| Vodicka, et al., 2007 | Eslováquia ocidental e Bohemia Oriental | População saudável | Contr. | 37,6 | 47,6 | 14,8 |
| Kasahara, et al., 2008 | Japão | Câncer Colorretal | Casos | 33,8 | 66,2 | |
| | | | Contr. | 57,9 | 42,1 | |
| Li, et al., 2006 | Texas (USA) | Melanoma Cutâneo | Casos | 31,2 | 45,4 | 23,4 |
| | | | Contr. | 25,9 | 49,2 | 24,9 |
| Li et al., 2009 | China | Lesões Gástricas | Casos | 31,8 | 49,7 | 18,5 |
| | | | Contr. | 33 | 49,1 | 17,9 |
| NCBI ¹ | | | | (qT= 0,5; qG= 0,4) | | |

¹ National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Em um estudo experimental, que visou caracterizar funcionalmente esse polimorfismo de *APE-1*, não foi observada diferença na capacidade da enzima se ligar ao DNA, como também não foi observada diferença na sua atividade de endonuclease, embora a autora tenha sugerido que a presença desse polimorfismo confere uma habilidade reduzida para interagir com outras enzimas, comprometendo a via BER (HADI, et al., 2000). De fato, não existem muitos estudos associando a presença desse polimorfismo ao câncer gástrico; apenas o estudo de Li et al., (2009) buscou investigar uma associação desse polimorfismo com a progressão de lesões gástricas, no entanto, não encontrou diferença significativa da frequência genotípica entre os casos e os controles.

Diferindo de *iNOS* e *PARP-1*, e da mesma forma que os genótipos de *OGG-1*, a frequência genotípica de *APE-1* não variou com a idade.

De maneira geral, as diferenças de frequência observadas na população, mesmo em estudos de câncer gástrico, mostram como as frequências genotípicas dessas enzimas variam de acordo com a etnia.

5.3 Aspectos Histopatológicos do Câncer Gástrico

No presente estudo, não foram observadas diferenças na distribuição dos polimorfismos das enzimas de reparo estudadas em relação aos subtipos histológicos, intestinal e difuso. Apenas o estudo de Hanaoka, et al., (2001) analisa a frequência da distribuição genotípica considerando esse aspecto, e assim como no presente estudo, também não foi observada diferença na distribuição do polimorfismo C1245G de OGG-1 entre os tipos intestinal ou difuso. Os polimorfismos estudados também não diferiram quanto à localização anatômica, no entanto, quando os tumores foram, distribuídos de acordo com os subtipos histológicos e com as regiões anatômicas, observou-se, no subtipo intestinal, a existência de uma correlação entre os tumores localizados na região não-antro e os heterozigotos para o polimorfismo estudado de OGG-1. Por outro lado, no subtipo difuso, observou-se uma correlação dos tumores localizados no corpo com o genótipo homozigoto selvagem para o polimorfismo estudado de PARP-1. Esses dados são indicativos da necessidade de se observar os tumores gástricos considerando tanto a localização do tumor quanto o subtipo histológico, uma vez que as análises desses parâmetros têm sugerido que se tratam de doenças distintas, com diferentes etiologias (CREW e NEUGUT, 2006).

5.4 Frequência e genotipagem de *H. pylori*

Neste estudo foi observada a presença de *H. pylori* em mais de 92% dos casos. Esta alta incidência de infecção está de acordo com outros estudos que detectaram essa bactéria

por PCR em pacientes com câncer gástrico e reportaram frequência de 95% em uma população brasileira (THOMAZINI, et al., 2006) e 100% em uma população da Turquia (SARIBASAK, et al., 2004). Além de outro estudo que identificou *H. pylori* em 94% dos casos de câncer gástrico usando a sorologia (NOMURA et al., 1991). A associação entre a infecção crônica por *H. pylori* e o desenvolvimento de câncer gástrico é bem estabelecida (BARTSCH, 2006; YOO et al., 2008). Porém, a vasta maioria de indivíduos infectados continua assintomática, sem nenhuma seqüela clínica. Cofatores que determinam que pessoas infectadas por *H. pylori* têm um risco particular de desenvolver câncer gástrico, incluem fatores de virulência bacterianos e fatores do hospedeiro, como polimorfismos genéticos que alteram a atividade de enzimas de reparo, com conseqüente acúmulo de danos no DNA (HUNG, et al., 2005; CAPELLÁ, et al., 2008).

Fatores de virulência bacterianos conferem diferenças de patogenicidade, tal como variações alélicas no gene *vacA* de *H. pylori*, cujas cepas portadoras dos alelos *s1m1* são associadas às lesões mais graves (ASHOUR, et al., 2002; DE FRANCESCO, et al., 2008; SUGIMOTO e YAMAOKA, 2009). No presente estudo, a combinação alélica para o gene *vacA* mais frequente foi *s1m1* (72,2%). Essa frequência está de acordo com outros trabalhos da literatura que constataram frequência deste genótipo variando de 67,5% em uma população colombiana a 100% em uma população japonesa (ZHOU et al., 2004; QUIROGA et al., 2005) em várias lesões gástricas, inclusive adenocarcinoma gástrico.

Outro gene na literatura correlacionado ao risco de desenvolver câncer gástrico é o gene *cagA* (DING, et al., 2004). Neste trabalho, esse gene foi detectado em mais de 65% dos casos positivos para *H. pylori*. No Japão, próximo de 100% das cepas possuem o *cagA* funcional (AZUMA, et al., 2002). Quiroga et al., (2005) também encontraram elevada frequência (72,9%) deste gene, amplificado por PCR em uma população da Colômbia. Altas

freqüências de *cagA* em pacientes com câncer gástrico têm sido descritas em estudos brasileiros, variando de 54,7% a 100% (EVANS et al., 1998; THOMAZINI et al., 2006).

Mais de 50% dos casos *H. pylori* positivos, nas amostras estudadas, portavam o gene *cagE*, cuja elevada freqüência (74,7%) também foi observada por Quiroga et al., (2005), que estudou o câncer gástrico juntamente com várias lesões gástricas. De modo similar, o gene *virB11* foi encontrado, aqui, em mais de 60% dos casos. Não existem trabalhos analisando a freqüência de *virB11*, principalmente considerando o câncer gástrico separadamente. No entanto, considerando trabalhos que o estudaram em doenças gastrintestinais, foi observada freqüência desse gene entre 90% a 94,7% em estudos realizados na Itália (TOMASINI et al., 2003; SOZZI et al., 2005).

De maneira geral e de acordo com a virulência da cepa, a infecção crônica com *H. pylori* geralmente aumenta o risco para carcinoma gástrico. Embora o mecanismo exato da carcinogênese gástrica associada a esta bactéria seja desconhecido, sabe-se que a longa permanência da infecção bacteriana, a inflamação crônica perpetuada e a proliferação celular permanente da mucosa, produzem um ambiente carcinogênico (YOO et al., 2008). Nesse estudo, foi encontrada elevada freqüência de cepas portando todos os genes da ilha de patogenicidade, associadas ao câncer gástrico.

5.5 Genes de *H. pylori* e os polimorfismos do hospedeiro

Tendo em vista que um dos mecanismos propostos para o potencial carcinogênico de *H. pylori* se refere à sua capacidade de gerar uma resposta inflamatória exacerbada e danosa no hospedeiro, é fundamental que se investigue nos portadores de câncer gástrico, a interação entre o grau de virulência da cepa infectante e os polimorfismos que influenciam o sistema de reparo do hospedeiro .

As análises individuais dos polimorfismos estudados revelaram algumas correlações entre seus genótipos e genes de *H. pylori*. Com *iNOS*, não foram observadas correlações significativas e o único paciente portador do genótipo homozigoto para o alelo variante (TT) estava infectado por uma cepa *cagA*(+), *s1m2*, *cagE*(-) e *virB11*(-) sugerindo a relevância de fatores bacterianos e do hospedeiro, no entanto, como se trata de apenas um paciente, não é possível concluir um perfil genotípico, mostrando a necessidade de se realizar mais estudos nesse sentido.

Com relação aos genótipos de PARP-1, foi visto que os indivíduos portadores do alelo variante estavam significativamente correlacionados às cepas *cagE*(+), considerando tanto a amostra total como também quando os casos foram estratificados nos subtipos intestinal e difuso. Uma correlação entre *cagE* também foi observada na amostra total com os portadores do alelo selvagem de *APE-1* (TT+TG). Assim, a associação entre as cepas *cagE*(+) com os genótipos: variante de *PARP-1* e selvagem de *APE-1* indica a importância do gene *cagE*, que já foi descrita, inclusive, em um estudo prévio do Laboratório de Biologia Molecular – LABGEM, onde foi reportada a elevada frequência desse gene (53,2%) em portadores de câncer gástrico (LIMA, et al., 2010). Também foi relatado que a presença de *cagE* juntamente com outros genes da bactéria, como *cagT*, *hrgA*, *cagA* e *vacAs1m1*, tem um alto valor preditivo para o desenvolvimento de câncer gástrico (TIWARI et al., 2007).

Adicionalmente, é interessante observar que a presença do genótipo homozigoto para o alelo variante de *APE-1* (GG) foi associada à infecção por cepas moderadamente virulentas, *vacAs1m2/s2m1*. Esses dados indicam a relevância dessa enzima e destacam a vulnerabilidade conferida pelo alelo variante na presença de uma cepa de virulência moderada.

De maneira geral, a análise dos genes de *H. pylori*, isoladamente, não reflete um perfil genotípico da bactéria associado à infecção. Assim, para verificar a influência do genótipo de

H. pylori na infecção dos portadores de alelos polimórficos, os casos foram agrupados, considerando os genótipos de *vacA*, pela sua importância como fator de virulência observado em vários estudos, além da presença ou ausência dos genes *cagA*, *cagE* e *virB11* na ilha de patogenicidade *cag*. Pelo fato desses genes estarem localizados em lados diferentes da ilha, foi proposto que eles sejam usados como marcadores da integridade de *cag*-PAI. No entanto, não há consenso quanto ao marcador de integridade da ilha mais apropriado (SOZZI et al., 2005; SUGIMOTO e YAMAOKA 2009; LIMA, et al., 2010). De modo geral, o gene *cagA* é considerado um indicador da presença de *cag*-PAI (SUGIMOTO e YAMAOKA 2009), enquanto que SOZZI et al., (2005) consideram o gene *cagE*. Tendo em vista que esses genes estão localizados em regiões próximas da ilha, no presente trabalho, os genes *cagA* e *cagE* foram usados como marcadores do lado direito de *cag*-PAI, enquanto que o gene *virB11* foi usado como determinante da integridade do lado esquerdo da ilha, devido à sua localização relevante e de sua função na formação do aparato secretório. Assim, quando os casos foram agrupados considerando o grupo da cepa infectante, observou-se que a maior frequência dos casos de câncer gástrico estava infectada por cepas que continham os três genes estudados da ilha, seguido pela infecção por cepas portadoras de um marcador do lado esquerdo e um do lado direito, ou os dois do lado direito (A2). Esses dois grupos totalizaram 47,5% (48/101) dos casos. Com os pacientes assim agrupados, procedeu-se a análise considerando os polimorfismos das enzimas de reparo. Nessa distribuição, destacaram-se as cepas A1, que estavam, em geral, associadas aos portadores dos genótipos homocigotos selvagens dos genes das enzimas de reparo e de síntese de óxido nítrico, demonstrando a relevância dessas cepas na carcinogênese gástrica, uma vez que atuam nesse processo, mesmo na presença de genótipos selvagens para as enzimas de reparo do sistema BER.

Considerando os polimorfismos estudados, isoladamente, com os grupos genotípicos de *H. pylori*, foi observado para PARP-1, que o genótipo homocigoto selvagem (AA) se

correlacionou com cepas de virulência elevada do grupo A1, refletindo a importância da virulência da cepa. Por outro lado, dos seis casos B4, três foram significativamente associados ao genótipo homozigoto para o alelo polimórfico de APE-1, ressaltando a relevância desse polimorfismo na vulnerabilidade individual à infecção por cepas patogenicamente fracas. As análises dos genótipos de OGG-1 mostraram apenas a associação entre os homozigotos para o alelo variante (GG) e cepas A2, representando uma situação em que ocorre um acúmulo de fatores de risco, pela presença de cepas com alta virulência e pela presença do polimorfismo, que já foi associado à carcinogênese gástrica (HANAOKA, et al., 2001).

Considerando somente o grupo A1, além da correlação anteriormente mencionada com PARP-1 (AA), dentro deste grupo de pacientes foi observado que a correlação significativa entre o genótipo heterozigoto de APE-1 (TG) e o genótipo selvagem de OGG-1(CC). Sabe-se que no sistema BER, APE-1 interage com OGG-1, e a habilidade reduzida da enzima com o aminoácido variante em interagir com OGG-1, dentre outras proteínas do BER, resulta em eficiência diminuída dessa via e uma susceptibilidade à doença (HADI et al., 2000), colocando a significância de OGG-1 em posição secundária à de APE-1 variante. Adicionalmente, esses pacientes se encontravam infectados por cepas de virulência elevada, havendo, portanto, a sobreposição de dois fatores predisponentes no desenvolvimento do câncer gástrico (FISHEL e KELLEY, 2007). Sabendo-se da interação nas funções das enzimas de reparo, vários trabalhos têm mostrado a atuação em conjunto de alguns desses polimorfismos. Apesar do presente estudo não ter encontrado uma associação entre os genótipos variantes, já foi relatada uma diminuição significativa na capacidade de reparo de danos oxidativos no DNA associada com a combinação de alelos variantes de OGG-1 (C1245G) e APE-1 (T2197G) (VODICKA et al., 2007). Os polimorfismos T2197G de APE-1 e C1245G de OGG-1 também foram associados ao aumento do risco de câncer colorretal em indivíduos simultaneamente homozigotos para os alelos variantes (PARDINI et al., 2008).

Por outro lado, considerando apenas as cepas menos virulentas (A4+B4+C4), verificou-se no subtipo intestinal que os pacientes com o genótipo selvagem (AA) de PARP-1 estavam significativamente associados a essas cepas, demonstrando que mesmo a atividade normal desempenhada pela enzima codificada pelo genótipo selvagem, conferiu certa susceptibilidade celular à infecção por cepas pouco virulentas. Tal susceptibilidade pôde ser evidenciada também quando os casos foram analisados de acordo com os grupos de alta (A1->B2) e baixa (B3->C4) virulência da cepa. Sabe-se que a atividade de PARP-1, em polimerizar grupos de ADP-ribose e transferí-los para várias proteínas nucleares, consome NAD⁺, e assim, consome a energia da célula. Embora PARP-1 tenha um papel importante no reparo, a sua ativação pode causar necrose e inflamação devido à essa depleção da energia celular (PEDDI et al., 2006). Dentro desse grupo de cepas com ausência dos genes estudados da ilha de patogenicidade, a correlação significativa observada entre os genótipos CT+TT de iNOS e o genótipo selvagem de APE-1 (TT) sugere que os pacientes portadores do alelo variante de *iNOS* estão associados ao câncer gástrico, mesmo estando infectados por cepas pouco virulentas e a despeito da atividade de reparo normal de APE-1. Embora não haja relatos na literatura de que esses polimorfismos de *APE-1* e *OGG-1* se correlacionem, esse achado está de acordo com o trabalho de Canzian, et al., (2008), que verificou que a presença desse polimorfismo de iNOS já foi associada a um risco elevado de desenvolver gastrite atrófica, que é uma lesão pré-neoplásica, em uma população venezuelana, caracterizada por altas taxas de infecção por *H. pylori*. Em câncer gástrico, Goto et al., (2006), demonstraram em uma população japonesa, que o polimorfismo C150T de iNOS está associado ao risco relacionado a *H. pylori*. Assim, parece que o possível aumento da atividade da enzima conferido pela presença do polimorfismo, resultando em alta produção de ON, é relevante na tumorigênese gástrica (SHEN, et al., 2004; WANG, et al., 2006). Também foi observado que dos três casos C3, dois estavam associados aos pacientes heterozigotos (CT) para iNOS

confirmando a importância dessa alteração e sugerindo que os pacientes com câncer gástrico portadores desse polimorfismo progredem na carcinogênese gástrica a despeito da infecção por cepas de *H. pylori* patogenicamente fracas.

Vale a pena salientar que o grupo de cepas C4 estava infectando também pacientes que portavam o genótipo selvagem para os polimorfismos estudados no hospedeiro. Mostrando que a despeito de um sistema de reparo eficiente e da presença de uma cepa de baixíssima virulência, os indivíduos desenvolveram câncer gástrico, indicando a necessidade de que outros polimorfismos também sejam investigados, na via BER, ou em outras vias.

Assim, a melhor forma de perceber um perfil genotípico de interesse, foi analisar os dados considerando a virulência das cepas de *H. pylori*, em alta (cepas A1->B2) ou baixa (cepas B3->C4) em relação aos genótipos de cada um dos polimorfismos estudados. Por meio dessas análises, destacaram-se os polimorfismos estudados nas enzimas APE-1 e PARP-1.

APE-1 revelou uma forte susceptibilidade à infecção por cepas pouco patogênicas, associada aos portadores do alelo polimórfico, provavelmente pela inabilidade da enzima codificada pelo alelo variante em se comunicar com outras enzimas de reparo do BER, destacando a relevância dessa alteração (HADI et al., 2000). Por outro lado, a presença do genótipo selvagem (AA) de *PARP-1* demonstrou uma forte associação com a infecção por cepas pouco patogênicas, possivelmente devido à vulnerabilidade decorrente do consumo da energia celular anteriormente mencionado, confirmando os dados de correlação anteriormente vistos entre *PARP-1* e cepas fracas, mostrando a relevância da análise dos genótipos de *H. pylori* agrupados.

Quando os pacientes foram agrupados de acordo com o perfil genotípico dos polimorfismos estudados, sem levar em consideração um polimorfismo específico, destacou-se, apesar de não ter sido estatisticamente significativo, a elevada frequência de pacientes portando um gene em heterozigose, seguido dos portadores de dois genes em heterozigose,

representando a maioria dos casos (51,4%). É interessante notar também que nenhum dos 109 pacientes apresentou homozigose para o alelo variante em mais de um gene estudado, indicando a importância do sistema de reparo na manutenção da integridade do genoma. No entanto, as análises dos quatro polimorfismos agrupados, ou somente considerando os polimorfismos nos genes das enzimas de reparo conferindo aos seus alelos variantes a mesma importância, não identifica as enzimas e ainda mostra uma dispersão grande dos dados, isso é validado pelas correlações vistas entre esses grupos e as cepas de *H. pylori*, nas quais se enquadraram um número reduzido de casos. Deste modo, tais agrupamentos não esclareceram um padrão de infecção.

Quando os casos foram analisados observando o genótipo das três enzimas de reparo estudadas, destacou-se a relevância do gene de APE-1, cuja presença do genótipo selvagem, mostrou uma baixíssima frequência de infecção por cepas pouco patogênicas, enquanto que a presença do alelo variante foi associada à alta infecção por essas cepas. Tais características apresentaram diferença estatística, independentemente do genótipo das outras duas enzimas de reparo estudadas. Por outro lado, quanto aos genótipos de PARP-1, a susceptibilidade à infecção por cepas pouco patogênicas foi associada à presença do genótipo selvagem. Desse modo, essa correlação se mostrou relevante e pode ser justificada, em parte dessas amostras, pela presença dos alelos variantes de APE-1 e OGG-1. Logo, essa associação entre genótipo selvagem de PARP-1 e cepas pouco patogênicas, deve ser especulada, a fim de se entender melhor a relação bactéria e hospedeiro.

H. pylori é uma bactéria muito bem adaptada à mucosa gástrica humana, colonizando-a há aproximadamente 50.000 anos e tem permanecido a questão de por que e como essa bactéria causa doenças em uma minoria da população colonizada (ATHERTON E BLASER, 2009). O conceito crescente é que polimorfismos em uma coleção de genes que regulam

processos celulares como reparo de DNA, dentre outros, contribuem para o desenvolvimento do câncer (HUNG et al., 2005).

Portanto, os achados do presente estudo são uma contribuição relevante como o primeiro trabalho, *in vivo*, associando a cepa de *H. pylori* com o reparo, contribuindo com o estabelecimento de um perfil genotípico de vulnerabilidade do hospedeiro que contribui para a carcinogênese gástrica.

PERSPECTIVAS

Tendo em vista a complexidade da interação bactéria-hospedeiro observada, aqui, pelo ponto de vista de polimorfismos em genes de enzimas de reparo, mostra-se interessante a investigação de outros polimorfismos no hospedeiro, ligados a sistemas de reparo (que podem compensar deficiências nas enzimas atualmente estudadas), além de polimorfismos que possam contribuir com o aumento do dano, como no caso dos polimorfismos das interleucinas. Por outro lado, dado o caráter multifatorial do câncer gástrico, o estudo adicional de fatores como tabagismo, etilismo e fatores genéticos associados ao câncer gástrico familiar, como no caso da mutação da E-caderina, podem agregar valor.

Apesar da complexidade, explicar quais são os fatores que contribuem na interação: hospedeiro e infecção de *H. pylori*, considerando a virulência da bactéria assim como a suscetibilidade do hospedeiro, são importantes e mostram-se relevantes para elucidar a carcinogênese gástrica, bem como identificar indivíduos infectados sob o risco de desenvolver doenças mais graves.

CONCLUSÕES

- Os genes *vacA*, *cagA*, *cagE* e *virB11* de *H. pylori* mostraram-se bons marcadores de um perfil patogênico da bactéria pela sua alta frequência nestes tumores;
- O desenvolvimento de câncer gástrico em pacientes com idade menor que 55 anos parece ser associado à presença dos alelos variantes de iNOS e PARP-1;
- O gene *cagE* se destacou dentre os genes de *H. pylori* como fator predisponente ao desenvolvimento do câncer gástrico quando associado à presença dos alelos variantes de PARP-1;
- Os subtipos histológicos, intestinal e difuso, diferem quanto à associação dos polimorfismos de acordo com a localização, onde tumores do subtipo intestinal localizados na região não-antro foram associados ao genótipo heterozigoto de OGG-1 e tumores do subtipo difuso localizados no corpo foram correlacionados com o genótipo selvagem de PARP-1;
- Cepas com genótipo considerado mais virulento de *H. pylori* estão associadas ao câncer gástrico mesmo na presença de um genótipo selvagem das enzimas de reparo aqui estudadas, indicando a relevância dessas cepas neste processo;
- Cepas menos virulentas de *H. pylori* estão mais associadas ao câncer gástrico na presença dos genótipos variantes de APE-1 e na presença do genótipo selvagem de PARP-1;
- As análises dos polimorfismos das enzimas de reparo associadas, mostrou a relevância do sistema de reparo, pois parte dos pacientes infectados por cepas consideradas mais patogênicas possuíam pelo menos um polimorfismo de reparo.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉS JAVIER QUIROGA, DIANA MARCELA CITTELLY, MARÍA MERCEDES BRAVO. Frecuencia de los genotipos babA2, oipA y cagE de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos com enfermedades gastroduodenales *Biomédica* 2005;25:325-34
- ASHOUR AA, MAGALHÃES PP, MENDES EN, COLLARES GB, DE GUSMÃO VR, QUEIROZ DM, NOGUEIRA AM, ROCHA GA, DE OLIVEIRA CA. Distribution of vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002. 33:173-178.
- ATHERTON JC, BLASER MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest.* 2009. 119:2475-2487.
- ATHERTON, J. C, CAO P., PEEK R.M., 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.* 1995. 270: 17771-17777.
- AZUMA T, YAMAKAWA A, YAMAZAKI S, FUKUTA K, OHTANI M, ITO Y, DOJO M, YAMAZAKI Y, KURIYAMA M. Correlation between variation of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis.* 2002. 186:1621-1630.
- BACKERT S, SELBACH M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori*. *Pathogenesis Cell. Microbiol.* 2008. 10: 1573-1581.
- BARTSCH, H.; NAIR J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch. Surg.* 2006. 391: 499-510.
- BERRA, C. M., MENCK, C. F. M., MASCIO, P. D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim. Nova.* 2006. 29: 1340-1344.
- BERTRAM, C.; HASS, R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *J. Biol. Chem.* 2008. 389: 211-220.
- BHATNAGAR S, BHATTACHARJEE J, VAID M, MADAN T, TRIVEDI SS, SARMA PU. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism in pre-eclampsia: a pilot study in North India. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2007. 47:477-482.
- BICKLEY J, OWEN RJ, FRASER AG, POUNDER RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol.* 1993 Nov;39(5):338-44.
- BOITEUX, S.; GUILLET, M. Abasic sites in DNA: repair biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair.* 2004. 3: 1-12.
- BORK, A. M. G. T.; BARONE, B. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Einstein: Educação Continuada em Saúde.* 2007. 5: 114-115.

BURUK, F.; BERBEROGLU, U.; PAK, I.; AKSAZ, E.; CELEN, O. Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *Br J Surg.* 1993. 80: 378-379.

CANZIAN F, FRANCESCHI S, PLUMMER M, VAN DOORN LJ, LU Y, GIOIA-PATRICOLA L, VIVAS J, LOPEZ G, SEVERSON RK, SCHWARTZ AG, MUÑOZ N, KATO I. Genetic polymorphisms in mediators of inflammation and gastric precancerous lesions. *Eur J Cancer Prev.* 2008. 17:178-183.

CAPELLÁ G, PERA G, SALA N, AGUDO A, RICO F, DEL GIUDICCE G, PLEBANI M, PALLI D, BOEING H, BUENO-DE-MESQUITA HB, CARNEIRO F, BERRINO F, VINEIS P, TUMINO R, PANICO S, BERGLUND G, SIMÁN H, NYRÉN O, HALLMANS G, MARTINEZ C, DORRONSORO M, BARRICARTE A, NAVARRO C, QUIRÓS JR, ALLEN N, KEY T, BINGHAM S, CALDAS C, LINSEISEN J, NAGEL G, OVERVAD K, TJONNELAND A, BOSHUIZEN HC, PEETERS PH, NUMANS ME, CLAVEL-CHAPELON F, TRICHOPOULOU A, LUND E, JENAB M, KAAKS R, RIBOLI E, GONZÁLEZ CA. DNA repair polymorphisms and the risk of stomach adenocarcinoma and severe chronic gastritis in the EPIC-EURGAST study. *Int. J. Epidemiol.* 2008. 37: 1316-1325.

CARTÁGENES, V. D., MARTINS, L. C., CARNEIRO, L. M., BARILE, K. A. S., CORVELO, T. C. *Helicobacter pylori* em crianças e associação de cepas CagA na transmissão mãe-filho na Amazônia brasileira. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropic.* 2009. 42: 298-302.

CASTRO-JUNIOR, G. Expressão da proteína ERCC1 do seu RNA mensageiro e de polimorfismos genéticos como fatores prognósticos em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço operados e submetidos à quimiorradioterapia adjuvante. Tese de Doutorado. São Paulo. 2009.

CEREZO SG, PONCE MC, GUTIÉRREZ GRA. Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad cag de *Helicobacter pylori*. *Rev Latinoam Microbiol.* 2006. 48: 99-104.

CÉSAR, A. C. G.; SILVA, A. E., TAJARA, E. H. Fatores Genéticos e Ambientais Envolvidos na Carcinogênese Gástrica. *Arq. Gastroenterol.* 2002. 39: 253-259.

CHANG C, CHEN W, LIN H, WU C, WANG C. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor κ B expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004. 10: 2232-2240.

COLLINS AR, GAIVÃO I. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Mol Aspects Med.* 2007. 28:307-22.

COSTA, M. T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K. P.; MACHADO, R. R.; Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural.* 2003. 33: 967-974.

COVACCI, A., RAPPUOLI, R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J. Exp. Med.* 2000. 191: 587-592.

CREW, K. D., NEUGUT, A. I. Epidemiology of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2006. 12: 354-362.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.* 2007. 447: 941-950.

DE FRANCESCO, V., MARGIOTTA, M., ZULLO, A., HASSAN, C., GIORGIO, F., ZOTTI, M., STOPPINO, G., BASTIANELLI, A., DITERLIZZI, F., VERDEROSA, G., MORINI, S., PANELLA, C., IERARDI, E. *Helicobacter pylori vacA* arrangement and related diseases: a retrospective study over a period of 15 years. *Dig. Dis. Sci.* 2008. DOI 10.1007/s10620-008-0327-6

DING S, O'HARA AM, DENNING TL, DIRDEN-KRAMER B, MIFFLIN RC, REYES VE, RYAN, KA, ELLIOTT SN, IZUMI T, BOLDOGH I, MITRA S, ERNST PB, CROWE SE. *Helicobacter pylori* and H₂O₂ Increase AP Endonuclease-1/Redox Factor-1 in Human Gastric Epithelial Cells. *Gastroenterology* 2004. 127: 845-858.

DOMINGO, D.; ALARCON, T.; PRIETO, N.; SANCHEZ, I.; LOPEZ-BREA, M. *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1999. 37: 2113-2114.

ESCAMES G, LÓPEZ LC, ORTIZ F, ROS E, ACUÑA-CASTROVIEJO D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol.* 2006. 41:1165-1173.

ESPEJO, E.; NAVARRETE, S. J. Classification of stomach adenocarcinomas. *Rev. Gastroenterol.* 2003. 23: 199-212.

EVANS DG, QUEIROZ DM, MENDES EN, EVANS DJ JR. *Helicobacter pylori cagA* status and s and m alleles of *vacA* in isolates from individuals with a variety of H. *pylori*-associated gastric diseases. *J Clin Microbiol.* 1998. 36. 3235-3437.

FERMIN-MEARIN, GARCÍA-GONZÁLEZ MA, STRUNK M, ZÁRATE N, MALAGELADA JR, LANAS A. Association between achalasia and nitric oxide synthase gene polymorphisms. *Am J Gastroenterol.* 2006. 101: 1979-1984.

FIGUEROA JD, MALATS N, REAL FX, SILVERMAN D, KOGEVINAS M, CHANOCK S, WELCH R, DOSEMECI M, TARDÓN A, SERRA C, CARRATO A, GARCÍA-CLOSAS R, CASTAÑO-VINYALS G, ROTHMAN N, GARCÍA-CLOSAS M. Genetic variation in the base excision repair pathway and bladder cancer risk. *Hum Genet.* 2007. 121:233-242.

FISHEL ML, KELLEY MR. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol Aspects Med.* 2007. 375-95.

FORSTERMANN U, BOISSEL J, KLEINERT H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The FASEB Journal.* 1998. 12: 773-790.

FOSTER G.D; TWEEL D. *Plant Gene Isolation. Principles and Pratics.* Edited by Gary D. Foster & David Twell. John Wiley & Sons Ltd., England 1996, p 426.

FRANCISCO-JÚNIOR, A., PAYÃO, S. L. M., QUEIROZ, V. F., ELLINGER, F., SILVA, L. C., THEREZO, A. L. S., GATTI, L., BARBIERI, D., PERES, C. A. Detecção gástrica de *Helicobacter pylori* em pacientes pediátricos sintomáticos através da reação em cadeia de polimerase (PCR), teste de uréase e exame histológico. *Pediatria*. 2004. 26: 34-42.

FREEDMAN ND, DERAKHSHAN MH, ABNET CC, SCHATZKIN A, HOLLENBECK AR, MCCOLL KE. Male predominance of upper gastrointestinal adenocarcinoma cannot be explained by differences in tobacco smoking in men versus women. *Eur J Cancer*. 2010. [Epub ahead of print]

FUKUTA K, AZUMA T, ITO Y, SUTO H, KEIDA Y, WAKABAYASHI H, WATANABE A, KURIYAMA M. Clinical Relevance of *cagE* gene from *Helicobacter pylori* Strains in Japan. *Digestive Diseases and Sciences*. 2002. 47: 667-674.

GENECARDS V3 – The Human Gene Compendium. Disponível em: <http://www.genecards.org/> Acesso em: 19 de Jul 2010.

GONZALES-REY, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, R.; OVALLE, F.; AGUILAR-QUESADA, R.; CONDE, C.; DELGADO, M.; OLIVER, F. J. Therapeutic effect of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 inhibitor on experimental arthritis by downregulating inflammation and Th1 response. *Plos one*. 2007. 10: 1-6.

GOODE, EL., ULRICH CM., POTTER JD. Polymorphisms in DNA repair Genes and Associations with Cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2002. 11: 1513-1530.

GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T.; PETERS, M.; COLLINS, M. D.; SLY, L.; McCONNELL, W.; HARPER, W. *Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov., respectively*. *Internat. J. Syst. Bacteriol*. 1989. 39: 397-405.

GOTO, Y.; ANDO, T.; NAITO, M.; GOTO, H.; HAMAJIMA, N. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with the increased risk of differentiated gastric cancer in Japanese population. *World J. Gastroenterol*. 2006. 12: 6361-6365.

GUILLEMIN K, SALAMA NR, TOMPKINS LS, FALKOW S. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *PNAS*. 2002. 99: 15136-15141.

GURUSAMY, N.; MALIK, G.; GOBUNOV, N. V.; DAS, D. K. Redox activation of Ref-1 potentiates cell survival following myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007. 43: 397-407.

HADI, M. Z., COLEMAN, M. A., FIDELIS, K., MOHRENWEISER, H. W., WILSON, D. M. Functional characterization of APE1 variants identified in the human population. *Nucl. Acids Res*. 2000. 3871-3879.

HANAOKA T, SUGIMURA H, NAGURA K, IHARA M, LI XJ, HAMADA GS, NISHIMOTO I, KOWALSKI LP, YOKOTA J, TSUGANE S. hOGG1 exon7 polymorphism and gastric cancer in case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Lett*. 2001. 170: 53-61.

HANSSON, L.R.; ENGSTRAND, L.; NYRÉN, O.; LINDGREN, A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in subtypes of gastric cancer. *Gastroenterology*. 1995. 109: 855-888.

HARTGRINK HH, JANSEN EPM, VAN GRIEKEN NCT, VAN DE VELDE CJH. Gastric cancer. *Lancet*. 2009. 374: 477-90.

HASSA PO, HAENNI SS, BUERKI C, MEIER NI, LANE WS, OWEN H, GERSBACH M, IMHOF R, HOTTIGER MO. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J. Biol. Chem*. 2005; 280: 40450-40464.

HATAKEYAMA M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol*. 2009. DOI 10.1007/s00535-009-0014-1.

HE Q., WANG JP., OSATO M., LACHMAN LB. Real-Time Quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol*. 2002. 40: 3720-3728.

HILL JW, EVANS MK. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucl. Acids Res*. 2006. 34: 1620-1632.

HOLLA LI, STEJSKALOVA A, ZNOJIL V, VASKU A. Analysis of the inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms in Czech patients with atopic diseases. *Clin. Exp. Allergy*. 2006. 36: 1592-1601.

HU JJ, SMITH TR, MILLER MS, MOHRENWEISER HW, GOLDEN A, CASE LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*. 2001. 22: 917-922.

HUNG, R. J., HALL, J., BRENNAN, P., BOFFETTA, P. genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol*. 2005. 162: 925-942.

HUNT R, SAUNA ZE, AMBUDKAR SV, GOTTESMAN MM, KIMCHI-SARFATY C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol. Biol*. 2009. 578: 23-39.

HUSSAIN SP, TRIVERS GE, HOFSETH LJ, HE P, SHAIKH I, MECHANIC LE, DOJA S, JIANG W, SUBLESKI J, SHORTS L, HAINES D, LAUBACH VE, WILTROUT RH, DJURICKOVIC D, HARRIS CC. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. *Cancer Res*. 2004. 64:6849-6853.

IARC: HAMILTON S.R., AALTONEN L.A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Press: Lyon 2000.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2009.

JIN XM, KIM HN, LEE IK, PARK KS, KIM HJ, CHOI JS, JUHNG SW, CHOI C. PARP-1 Val762Ala polymorphism is associated with reduced risk of non-Hodgkin lymphoma in Korean males. *BMC Med Genet*. 2010. 11:38.

JOHANNESSEN J, PIE A, POCIOT F, KRISTIANSEN OP, KARLSEN AE, NERUP J. Linkage of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene to Type 1. Diabetes. 2008. 86: 2792-2796.

JORGE YC, DUARTE MC, SILVA AE. Gastric cancer is associated with NOS2 -954G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population. BMC Gastroenterol. 2010. 10:64.

KASAHARA M, OSAWA K, YOSHIDA K, MIYAISHI A, OSAWA Y, INOUE N, TSUTOU A, TABUCHI Y, TANAKA K, YAMAMOTO M, SHIMADA E, TAKAHASHI J. Association of MUTYH Gln324His and APEX1 Asp148Glu with colorectal cancer and smoking in a Japanese population. J Exp Clin Cancer Res. 2008. 30:27:49.

KAUPPINEN, T. M. Multiple roles for poly (ADP-ribose)polymerase-1 in neurological disease. Neurochemistry International. 2007. 50: 954-958.

KE, X.; COLLINS, A.; YE, S. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. Bioinformatics Applications Note. 2001. 17: 838-839.

KHALIFA, M., SHARAF, R., AZIZ, R. Helicobacter pylori: a poor man's gut pathogen? Gut. Pathogens. 2010. 2: 1-12.

KOHNO, T., SHINMURA, K., TOSAKA, M., TANI, M., KIM, S., SUGIMURA, H., NOHMI, T., KASAI, H., YOKOTA, J. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. Oncogene. 1998. 16: 3219-3225.

KONEMAN, Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido/ Winn Jr., W. Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KONTUREK PC, KONTUREK SJ, BRZOZOWSKI T. Gastric Cancer and Helicobacter pylori Infection. J. Physiol. and Pharmacol. 2006. 57: 51-65.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADOR, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do Helicobacter pylori. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2003. 39: 335-342.

LAGE, A. P., GODFROID, E., FAUCONNIER, A., BURETTE, A., BUTZLER, J. P., BOLLEN, A., GLUPCZYNSKI, Y. Diagnosis of Helicobacter pylori Infection by PCR: Comparison with Other Invasive Techniques and Detection of cagA Gene in Gastric Biopsy Specimens. J. Clin. Microbiol. 1995. 33: 2752-2756.

LAURÈN, P. Two Histological main types of Gastric Carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. Acta Path. Microbiol. Scand. 1965. 64: 31-49.

LE MARCHAND L, DONLON T, LUM-JONES A, SEIFRIED A, WILKENS LR. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002. 11:409-412.

LEHOURS P, AND YILMAZ O. Epidemiology of Helicobacter pylori Infection Helicobacter 2007. 12: 1-3.

LI C, LIU Z, WANG L, STROM SS, LEE JE, GERSHENWALD JE, ROSS MI, MANSFIELD PF, CORMIER JN, PRIETO VG, DUVIC M, GRIMM EA, WEI Q. Genetic variants of the ADPRT, XRCC1 and APE1 genes and risk of cutaneous melanoma. *Carcinogenesis*. 2006. 27: 1894–1901.

LI WQ, ZHANG L, MA JL, ZHANG Y, LI JY, PAN KF, YOU WC. Association between genetic polymorphisms of DNA base excision repair genes and evolution of precancerous gastric lesions in a Chinese population. *Carcinogenesis*. 2009. 3:500-505.

LI, C., HU, Z., LIU, Z., WANG, L., GERSHENWALD, J. E., LEE, J. E., PRIETO, V. G., DUVIC, M., GRIMM, E. A., WEI, Q. Polymorphisms of the neuronal and inducible nitric oxide synthase genes and the risk of cutaneous melanoma. *ACS*. 2007. 109: 1570-1578.

LIMA VP, DE LIMA MA, FERREIRA MV, BARROS MA, RABENHORST SH. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *Int J Infect Dis*. 2010. 14: 613-617.

LIMA, V.P., LIMA, M.A.P., FERREIRA, M.V.P., BARROS, M.A.P., RABENHORST, S.H.B. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *Int. J. Inf. Dis*. 2010. 14: 613-617.

LIU Y, KANEKO S, SOBUE T. Trends in reported incidences of gastric cancer by tumour location, from 1975 to 1989 in Japan. *Int J Epidemiol*. 2004. 33:808-815.

LIU ZF, CHEN CY, TANG W, ZHANG JY, GONG YQ, JIA JH. Gene-expression profiles in gastric epithelial cells stimulated with spiral and coccoid *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1009-15.

LOPES LF, BACCHI MM, ELGUI-DE-OLIVEIRA D, ZANATI SG, ALVARENGA M, BACCHI CE. Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2004.37:1707-1712.

LU A, LI X, GU Y, WRIGHT PM, CHANG D. Repair of Oxidative DNA damage (Review). *Cell Biochem Biophys*. 2001. 35: 141-170.

LUNDEGÅRDH G, LINDGREN A, ROHUL A, NYRÉN O, HANSSON LE, BERGSTRÖM R, ADAMI HO. Intestinal and diffuse types of gastric cancer: secular trends in Sweden since 1951. *Br J Cancer*. 1991. 64:1182-1186.

MABLEY, J. G.; PACHER, P.; DEB, A.; WALLACE, R.; ELDER, R. H.; SZABO, C. Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. *The FASEB Journal*. 2004. 1-18.

MARTÍN MC, MARTINEZ A, MENDOZA JL, TAXONERA C, DÍAZ-RUBIO M, FERNÁNDEZ-ARQUERO M, DE LA CONCHA EG, URCELAY E. Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility. *Immunogenetics*. 2007. 59: 833-837.

MISHRA SK, DAS BR. (ADP-ribosyl)ation pattern of chromosomal proteins during ageing. *Cell Mol Biol*. 1992. 38:457-62.

MONTECUCCO C, RAPPUOLI R. Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* Survives in the Human Stomach. *Mol. Cell Biol.* 2001. 2: 457- 466.

NAGATA, K.; YU, H.; NISHIKAWA, M.; KASHIBA, M.; NAKAMURA, A.; SATO, E. F.; TAMURA, T.; INOUE, M. *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J. Biol. Chem.* 1998. 278: 14071-14073.

NCBI – National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 07 de Jul 2010.

NGUYEN LT, UCHIDA T, MURAKAMI K, FUJIOKA T, MORIYAMA M. *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J. Med. Microbiol.* 2008. 57: 1445–1453.

NIKITIN AG, CHUDAKOVA DA, STROKOV IA, BURSA TR, CHISTIYAKOV DA, NOSIKOV VV. Leu54Phe and Val762Ala polymorphisms in the poly(ADP-ribose)polymerase-1 gene are associated with diabetic polyneuropathy in Russian type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008. 79:446-452.

NOMURA A, STEMMERMANN GN, CHYOU PH, KATO I, PEREZ-PEREZ GI, BLASER MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med.* 1991. 325:1132-1136.

OWEN RJ, PETERS TM, VAREA R, TEARE EL, SAVERYMUTTU S. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in England: prevalence of cag pathogenicity island markers and IS605 presence in relation to patient age and severity of gastric disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001. 30: 65-71.

PARDINI B, NACCARATI A, NOVOTNY J, SMERHOVSKY Z, VODICKOVA L, POLAKOVA V, HANOVA M, SLYSKOVA J, TULUPOVA E, KUMAR R, BORTLIK M, BARALE R, HEMMINKI K, VODICKA P. DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic. *Mutat Res.* 2008. 638:146-153.

PARILDAR-KARPUZOĞLU H, DOĞRU-ABBASOĞLU S, HANAGASI HA, KARADAĞ B, GÜRVIT H, EMRE M, UYSAL M. Single nucleotide polymorphisms in base-excision repair genes hOGG1, APE1 and XRCC1 do not alter risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2008. 442:287-191.

PARSONNET, J.; VANDERSTEEN, D.; GOATES, J.; SIBLEY, R.K.; PRITIKIN, J.; CHANG, Y. *Helicobacter pylori* infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991. 83: 640-643.

PAZ-ELIZUR T, BEN-YOSEF R, ELINGER D, VEXLER A, KRUPSKY M, BERREBI A, SHANI A, SCHECHTMAN E, FREEDMAN L, LIVNEH Z. Reduced repair of the oxidative 8-oxoguanine DNA damage and risk of head and neck cancer. *Cancer Res.* 2006. 11683-11689.

PEREIRA, L.P.; WAISBERG, J.; ANDRÉ, E.A.; ZANOTO, A.; MENDES JÚNIOR, J.P.; SOARES, H.P. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Arq Gastroenterol.* 2001. 38: 240-246.

POURQUIER,P. La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. Bull Cancer. 2006. 124-44

PRINZ, C.; SCHÖNIGER, M.; RAD, R.; BECKER, I.; KEIDITSCH, E.; WAGENPFEIL, S.; CLASSEN, M.; RÖSCH, T.; SCHEPP, W.; GERHARD, M. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. Cancer Res. 2001. 61: 1903-1909.

QU Y, TANG Y, CAO D, WU F, LIU J, LU G, ZHANG Z, XIA Z. Genetic polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. Int J Hyg Environ Health. 2007. 210: 679-689.

QU Y, TANG Y, CAO D, WU F, LIU J, LU G, ZHANG Z, XIA Z. Genetic polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. Int J Hyg Environ Health. 2007. 210:679-689.

QU Y., TANG, Y., CAO, D., WU F., LIU, J., LU G., ZHANG Z., XIA Z. Genetic Polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. Int. J. Hyg. Environ. Helthy. 2007. 679-689.

QUESADA P, FARAONE-MENNELLA MR, JONES R, MALANGA M, FARINA B. ADP-ribosylation of nuclear proteins in rat ventral prostate during ageing. Biochem Biophys Res Commun. 1990. 170:900-907.

RAMÍREZ RA, SÁNCHEZ SR. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Rev. Gastroenterol. 2008. 28: 258-66.

RAMÍREZ RAMOS A, SÁNCHEZ SÁNCHEZ R. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Rev. Gastroenterol. 2008. 28: 258-66.

REYES-LEON, A.; ATHERTON, J. C.; ARGENT, R. H.; PUENTE, J. L. TORRESI, J. Heterogeneity in the Activity of Mexican *Helicobacter pylori* Strains in Gastric Epithelial Cells and Its Association with Diversity in the *cagA* Gene. Infection and Immunity. 2007. 75: 3445-3454.

ROHR P, DA SILVA J, ERDTMANN B, SAFFI J, GUECHEVA TN, HENRIQUES JA, KVITKO K. BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. Environ Mol Mutagen. 2010. [Epub ahead of print]

RUYCK, K. D.; SZAUMKESSEL, M.; RUDDER, I. D.; DEHOORNE, A.; VRAL, A.; CLAES, K.; VELGHE, A.; MEERBEECK, J. V.; THIERENS, H. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. Mut. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mut. 2007. 631: 101-110.

SABERNAWEB: Disponível em: <http://www.saberweb.com.br>. Acesso em: 21 Abr 2010

SARIBASAK H, SALIH BA, YAMAOKA Y, SANDER E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. J Clin Microbiol. 2004. 42:1648-1651.

SHEN J, WANG R, WANG L, XU Y, WANG X. A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer. *World. J. Gastroenterol.* 2004. 10: 3278-3283.

SOZZI M., TOMASINI M. L., VINDIGNI C., ZANUSSI S., TEDESCHI R., BASAGLIA G., FIGURA N., De PAOLI P. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *J. Lab. and Clin. Med.* 2005. 146: 262-70.

SUERBAUM S; JOSENHANS C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature.* 2007. 441-452.

SUGIMOTO M, YAMAOKA Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2009. 57: 45–56.

SUGIMURA H, KOHNO T, WAKAI K, NAGURA K, GENKA K, IGARASHI H, MORRIS BJ, BABA S, OHNO Y, MING C, LI Z, WANG J, TAKEZAKI T, TAJIMA K, VARGA T, SAWAGUCHI T, LUM JK, MARTINSON JJ, TSUGANE S, IWAMASA T, SHINMURA K, YOKOTA J. hOGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prevent.* 1999. 8: 669–674.

THOMAZINI, C.M.; PINHEIRO, N. A.; PARDINI, M.I.; NARESSE, L.E.; RODRIGUES, M. A. M. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: distribution of *cagA* and *vacA* genotypes in patients with gastric carcinoma. *J. Bras Patol Med Lab.* 2006. 42:25-30.

TIWARI SK, MANOJ G, KUMAR GV, SIVARAM G, HASSAN SI, PRABHAKAR B, DEVI U, JALALUDDIN S, KUMAR K, AHMED S, ABID Z, HABEEB MA, KHAN AA, HABIBULLAH CM. Prognostic significance of genotyping *Helicobacter pylori* infection in patients in younger age groups with gastric cancer. *Postgrad Med J.* 2008. 84:193-197.

TOMASINI, M.L.; ZANUSSI, S.; SOZZI, M.; TEDESCHI, R.; BASAGLIA, G.; DE PAOLI, P. Heterogeneity of *cag* genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 976-980.

TOMBOLA, F.; MORBIATO, L.; GIUDICE, G. D.; RAPPUOLI, R.; ZORATTI, M.; PAPINI, E. The *Helicobacter pylori vacA* toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J. Clin. Invest.* 2001. 108: 929-937.

TSUKINO H, HANAOKA T, OTANI T, IWASAKI M, KOBAYASHI M, HARA M, NATSUKAWA S, SHAURA K, KOIZUMI Y, KASUGA Y, TSUGANE S. hOGG1 Ser326Cys polymorphism, interaction with environmental exposures, and gastric cancer risk in Japanese populations. *Cancer Sci.* 2004. 95:977-983.

UCSC – Genome Bioinformatics. Disponível em: <http://genome.cse.ucsc.edu/> Acesso em: 19 de Jul 2010.

VERDECCHIA A, CORAZZIARI I, GATTA G, LISI D, FAIVRE J, FORMAN D; EUROCCARE Working Group. Explaining gastric cancer survival differences among European countries. *Int J Cancer.* 2004. 109:737-741.

VODICKA, P.; STETINA, R.; POLAKOVA, V.; TULUPOVA, E.; NACCARATI, A.; VODICKOVA, L.; KUMAR, R.; HANOVA, M.; PARDINI, B.; SLYSKOVA, J.; MUSAK, L.; PALMA, G D.; SOUCEK, P.; HEMMINKI, K. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis*. 2007. 28: 657-664.

WANG SS, DAVIS S, CERHAN JR, HARTGE P, SEVERSON RK, COZEN W, LAN Q, WELCH R, CHANOCK SJ , ROTHMAN N. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 2006. 27: 1828–1834.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 2001. 40: 1249–1259.

WEN S, MOSS SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2009. 282: 1-8.

WERNER M, BECKER KF, KELLER G, HÖFLER H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001. 127: 207-216.

WGO-Practice Guidelines: *Helicobacter pylori* em Países em Desenvolvimento. 2006.

WU C, LEE Y, WANG T, LEE L, KONG W, CHEN E, WEI M, LIANG Y, HWANG T. Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. *Oncol. Rep.* 2006. 15: 57-64.

YE F, BRAUERT, NIEHUS, DRILICA K, JOSENHANS C, SUERBAUM S. Flagellar and global gene regulation in *Helicobacter pylori* modulated by changes in DNA supercoiling. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007. 297: 65–81.

YOO EJ, PARK SY, CHO NY, KIM N, LEE HS, KANG GH. *Helicobacter pylori*-infection-associated CpG island hypermethylation in the stomach and its possible association with polycomb repressive marks. *Virchows Arch.* 2008. 452:515-524.

ZAWILAK A, ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA J. Organization of the *Helicobacter pylori* genome. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2001. 55: 355-67.

ZHAI X, LIU J, HU Z, WANG S, QING J, WANG X, JIN G, GAO J, WANG X, SHEN H. Polymorphisms of ADPRT Val762Ala and XRCC1 Arg399Glu and risk of breast cancer in Chinese women: a case control analysis. *Oncol Rep.* 2006. 15:247-252.

ZHANG Q, LI Y, LI X, ZHOU W, SHI B, CHEN H, YUAN W. PARP-1 Val762Ala polymorphism, CagA+ *H. pylori* infection and risk for gastric cancer in Han Chinese population. *Mol. Biol. Rep.* 2009. 36: 1461-7

ZHOU W, YAMAZAKI S, YAMAKAWA A, OHTANI M, ITO Y, KEIDA Y, HIGASHI H, HATAKEYAMA M, SI J, AZUMA T. The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004. 40:81-87.

Anexo I

Protocolo de Coleta no Centro cirúrgico

Durante todo o procedimento utilizar máscara e luvas estéreis.

- 1- Conferir o material a ser utilizado para coleta (Identificação do pacientes, máquina fotográfica, régua, caneta para tubo, criotubo estéril e protocolo a ser preenchido);
- 2- Identificar os tubos com o número da amostra, tipo de mucosa (tumoral ou normal) e a data (Ex.: CG-01-N1/D-M-2004);
- 3- Após a retirada da peça, colocá-la em cuba estéril e lavá-la com soro fisiológico estéril (se necessário). Secá-la com compressa estéril;
- 4- colocar a peça em um campo azul estéril, em seguida a régua e a identificação logo abaixo da peça, tirar uma foto panorâmica e uma foto somente do tumor utilizando flash (total 2 fotos);
- 5- Com o auxílio de pinça e bisturi estéreis, coletar primeiramente quatro espécimes da mucosa normal (o mais distante do tumor), em seguida quatro espécimes do tumor (preferencialmente as bordas, evitando as áreas de necrose e fibrose), colocar o material colhido dentro do criotubo estéril e acondicioná-los imediatamente em recipiente com gelo;
- 6- Tirar uma foto da peça pós-coleta com flash e sem régua;
- 7- Preencher o cadastro do tecido da peça cirúrgica em duplicata e desenhar um esboço marcando os locais dos quais foram coletados, bem como as margens cirúrgicas e o tamanho do tumor;
- 8- Transportar imediatamente os tubos para armazenagem em nitrogênio líquido.

Anexo –II

Parecer do Comitê de Ética

Anexo - III**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Instituição: DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu

Investigadora Responsável: Silvia Helena Barem Rabenhorst

Título: ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS

Eu, _____ por este meio, fui informado(a), em detalhes sobre o estudo intitulado: ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo em questão pretende associar fatores genéticos e ambientais, que podem levar ao desenvolvimento do carcinoma gástrico, de modo a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria denominada *H. pylori* e de um vírus denominado EBV. Esses serão detectados através da presença do material genético destes agentes infectantes no tumor. Serão também observadas as alterações genéticas das células tumorais. Estas alterações serão vistas pela expressão de proteínas, ou pela análise do DNA/RNA do tumor.

Cerca de 150 pacientes serão incluídos no presente estudo. Portanto, concordando em participar serei um dos pacientes deste estudo que envolve diversas instituições, permitindo coleta de material necessário para o estudo. Não haverá mudança ou perdas em relação à análise pelo patologista do meu material. Paralelamente, serão anotadas algumas questões referentes à minha pessoa, no que diz respeito a dados pessoais como a data de nascimento e relativo a hábitos de vida e a minha doença. Estas informações serão retiradas do meu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a mim.

Minha participação não terá benefício direto imediato, em princípio, mas que poderá estar contribuindo para que se entendam melhor os fatores de risco e alterações que propiciem o aparecimento do câncer gástrico. A identificação dos fatores de risco para câncer gástrico servirá para direcionar medidas preventivas. Por outro lado as alterações dos materiais genéticos encontradas nas células tumorais poderão ser usadas como fatores que auxiliarão no diagnóstico, prognóstico e também como alvos das novas terapias que estão sendo agora desenvolvidas.

Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao meu prontuário.

Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos onde recebo atendimento médico. Se tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a esse estudo ou aos

meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar a Dra. Silvia Helena Rabenhorst no telefone 3288 8206 ou 9994 5689.

Assinatura do paciente: _____

Endereço do paciente: _____

Telefone: _____ Data: ____/____/____

Nome da testemunha _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do investigador: _____

Anexo – IV**Cadastro de Pacientes Submetidos à Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica**

Código CG: _____ Data ____/____/____

Nº Prontuário _____ Data de admissão no serviço hospitalar ____/____/____

Depto Responsável _____ Hospital _____

Nome _____ Sexo F [] M []

Endereço _____

Contato _____ Naturalidade _____ Procedência _____

Idade _____ Nasc ____/____/____ Cor _____ ABO _____

Grau de instrução _____ Profissão _____

História familiar:

[] Avô [] Avó [] Mãe [] Pai [] Irmão(ã) [] Tio(a) [] Filho(a) Outros _____

Hábitos: [] Sal [] Frutas [] Verduras [] Churrasco [] Carne seca [] geladeira

[] Tabagista Tipo _____ Freqüência _____ Fum. passivo []

[] Álcool Tipo _____ Freqüência _____

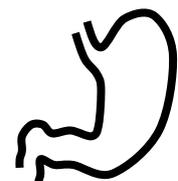
Dados relativos à neoplasia.

Data do primeiro diagnóstico ____/____/____ Exam _____

H. pylori []

Sítio anatômico _____ Est. Clínico T ____ N ____ M ____

Aspecto morfológico _____ Bormann _____



Exame anatomopatológico N°: _____

Tratamento: [] Radioterapia [] Quimioterapia [] Hormonioterapia [] Imunoterapia

Protocolo _____

Cirurgia: realizada em ____/____/____ Cirurgião _____

Responsável pela Coleta _____

Tempo de ressecção da coleta: [] <1h [] 1h [] 2h [] 3h [] < ou =4h [] Outras

Observações _____

N° de amostra Tumoral congelada [] N° de amostra Normal []

Local Armazenamento: _____

Anexo – V

Tabela de análise das três enzimas de reparo

| 3 GENOTIPOS | | A1 | A2 | A3 | A4 | B1 | B2 | B3 | B4 | C2 | C3 | C4 | Total geral |
|-------------|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------|
| | APE (T->G) | | | | | | | | | | | | |
| | OGG (C->G) | | | | | | | | | | | | |
| | PARP (A->G) | | | | | | | | | | | | |
| OGG (S) | TT/CC/AA (Selv.) | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | 1 | | | 2 | 19 |
| FIXO | TG/CC/AA | 9 | 1 | 2 | | | | 4 | | | 2 | | 18 |
| | TT/CC/AG | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | 5 |
| | TG/CC/AG | 3 | | 1 | 1 | 1 | | | 1 | | 1 | | 8 |
| | GG/CC/AA | 1 | | 1 | | 1 | | | 2 | | | 1 | 6 |
| | TT/CC/GG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | GG/CC/AG | | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | 3 |
| | TG/CC/GG | 2 | | | | | | | | | | | 2 |

| 3 GENOTIPOS | | A1 | A2 | A3 | A4 | B1 | B2 | B3 | B4 | C2 | C3 | C4 | Total geral |
|-------------|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------|
| | APE (T->G) | | | | | | | | | | | | |
| | OGG (C->G) | | | | | | | | | | | | |
| | PARP (A->G) | | | | | | | | | | | | |
| APE (S) | TT/CC/AA (Selv.) | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | 1 | | | 2 | 19 |
| FIXO | TT/CG/AA | 2 | 1 | 1 | 1 | | 1 | | | 1 | | | 8 |
| | TT/CC/AG | 2 | 1 | 1 | | | | | | | | | 5 |
| | TT/CG/AG | 3 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | 6 |
| | TT/GG/AA | | 1 | | | | | | | | | | 2 |
| | TT/CC/GG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | TT/CG/GG | 2 | | | | | | | | | | | 2 |
| | TT/GG/AG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| 3 GENOTIPOS | | A1 | A2 | A3 | A4 | B1 | B2 | B3 | B4 | C2 | C3 | C4 | Total geral |
|-------------|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------|
| | APE (T->G) | | | | | | | | | | | | |
| | OGG (C->G) | | | | | | | | | | | | |
| | PARP (A->G) | | | | | | | | | | | | |
| PARP (S) | TT/CC/AA (Selv.) | 4 | 3 | 4 | 2 | 1 | | | 1 | | | 2 | 19 |
| FIXO | TT/CG/AA | 2 | 1 | 1 | 1 | | 1 | | | 1 | | | 8 |
| | TG/CC/AA | 9 | 1 | 2 | | | | 4 | | | 2 | | 18 |
| | TG/CG/AA | 3 | 2 | 2 | 2 | | | 1 | 1 | 1 | | | 15 |
| | TT/GG/AA | | 1 | | | | | | | | | | 2 |
| | GG/CC/AA | 1 | | 1 | | 1 | | | 2 | | | 1 | 6 |
| | TG/GG/AA | | 1 | | | | 1 | | | | | | 2 |
| | GG/CG/AA | 2 | | 1 | | | | 2 | 1 | | | | 6 |

(S) Selvagem