



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ICAELLE ROSSAS LUCENA

**POLIMORFISMOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA 1
(IL-1RA) COMO FATOR DE RISCO PARA O CÂNCER GÁSTRICO NA
POPULAÇÃO DO CEARÁ**

FORTALEZA

2016

ICAELLE ROSSAS LUCENA

**POLIMORFISMOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA 1
(IL-1RA) COMO FATOR DE RISCO PARA O CÂNCER GÁSTRICO NA
POPULAÇÃO DO CEARÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biologia. Área de concentração:
Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Barem
Rabenhorst.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

L698p Lucena, Icaelle Rossas.
Polimorfismos do antagonista do receptor da interleucina 1 (IL-1RA) como fator de risco para o
câncer gástrico na população do Ceará / Icaelle Rossas Lucena. – 2016.
37 f. : il., color.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de
Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

1. Interleucinas. 2. Helicobacter Pylori. 3. Neoplasias gástricas. I. Título.

CDD 570

ICAELLE ROSSAS LUCENA

**POLIMORFISMOS DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA 1
(IL-1RA) COMO FATOR DE RISCO PARA O CÂNCER GÁSTRICO NA
POPULAÇÃO DO CEARÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biologia. Área de concentração:
Genética e Biologia Molecular.

Aprovada em: 19/2/2016.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Maria do Socorro Queiroz Alves de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Débora Menezes da Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Rosângela Fátima Rossas Lucena e Vicente de Paulo Medina Lucena, ao meu irmão, Ícaro Rossas Lucena, às minhas tias, Fátima Medina e Maria José Medina, à minha terapeuta Rosângela Kaimaya.

AGRADECIMENTOS

À instituição de ensino **Universidade Federal do Ceará**, por me proporcionar educação e oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos **meus pais, Vicente de Paulo Medina Lucena e Rosângela Fátima Rossas Lucena**, que estiveram presente, guiando meus passos no caminho correto.

Ao **meu irmão, Ícaro Rossas Lucena, e tias, Maria José Medina e Fátima Medina**, que foram de fundamental importância para que essa etapa da minha vida fosse concluída com êxito.

À **minha terapeuta, Rosângela Augusta Kaimaya**, que acredita genuinamente em mim.

À **Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena Barem Rabenhorst** por me abrir portas na área científica, pela orientação, confiança e tempo dedicados a mim.

À **banca dessa monografia** por ceder tempo e conhecimento para completar a minha formação acadêmica.

Às **minhas amigas, Morgana Maria de Oliveira Barbosa e Maíra Silva de Moraes** pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por todas as alegrias compartilhadas.

À **Narah Maia e Natália Dias** pelas orações, incentivo, força e, principalmente, pelo carinho.

À **Joanna de Freitas, Samilly Ribeiro, Lorena Gomes, Paula Mota** e a todos aqueles que estiveram e estão próximos a mim.

Ao **Laboratório de Genética Molecular (LABGEM)**, o qual me proporcionou recursos para que meu trabalho fosse executado.

Aos **meus colegas do LABGEM, Isabelle, Ana Paula, Aline, Valber, Paulo, Eliane, Débora** que contribuíram, de alguma forma, para a construção deste trabalho.

RESUMO

O câncer gástrico (CG) representa um sério problema de saúde pública, pois é a segunda causa de mortes por neoplasias no mundo, sendo o quarto tipo de câncer mais comum. No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais incidente em homens e o quinto em mulheres. As causas para essa doença são muitas e dentre elas, a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* que pode promover uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento da carcinogênese gástrica. Por sua vez, o processo inflamatório pode ser modulado pela presença de alguns dos polimorfismos presentes em genes de interleucinas. Assim, o objetivo desse estudo foi analisar o risco do polimorfismo da interleucina anti-inflamatória IL-1RA para o desenvolvimento do CG numa amostra da população cearense. Para isso, foi extraído DNA a partir de 124 amostras tumorais (coletadas de pacientes submetidos à gastrectomia em hospitais de Fortaleza – Ceará – Brasil) e de 253 amostras de sangue (coletadas no banco de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará e Santa Casa de Misericórdia de Sobral - Ceará – Brasil) de voluntários saudáveis sem história prévia de câncer gástrico. A genotipagem dos polimorfismos foi feita por PCR. Pacientes e controles foram pareados pelo sexo e pela idade (± 2 anos), na proporção 1:2 ou 1:1, e diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste do Qui Quadrado (χ^2) ou o Teste Exato de Fisher. Alguns trabalhos, em diferentes populações, relacionam o alelo *IL1RN*2* com o risco para o CG, mas o presente estudo não encontrou tal relação. O alelo polimórfico foi associado somente com o aparecimento de tumores na região cárdia do estômago e observou-se que o genótipo heterozigoto L*2 parece contribuir para o risco de câncer gástrico na população do Ceará.

Palavras-chave: câncer gástrico; *Helicobacter pylori*; interleucina IL-1RA; inflamação; polimorfismo genético.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) represents a serious public health problem, it is the second leading cause of cancer-related deaths in the world and is the fourth most common type of cancer. In Brazil, it is the third most common type of cancer in men and the fifth in women. While there are many known causes for this disease, the most prevalent involves infection by *Helicobacter pylori* bacterium. This bacterium can stimulate an exacerbated inflammatory response in the host, which promotes the development of gastric carcinogenesis. Recently, it has been found that the presence of polymorphisms in certain interleukin genes can modulate the degree of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. The objective of this study was to analyze the effects of IL-1RA anti-inflammatory interleukin polymorphisms on the development of GC in a portion of Ceará population. To this end, DNA was extracted from 124 tumor samples collected from patients undergoing gastrectomies in Fortaleza - Ceará – Brazil and 253 blood samples collected at the Centro de Hematologia e Hematoterapia do Estado do Ceará (HEMOCE) blood bank and the Santa Casa de Misericórdia de Sobral hospital in Fortaleza - Ceará - Brazil in healthy volunteers without a medical history of gastric cancer. The polymorphisms were identified by PCR. Patients and controls were matched for sex and age (± 2 years), in the ratios 1:2 or 1:1, and statistically significant differences were evaluated by Chi Square (χ^2) or Fisher's exact test. Previous research conducted in different populations associate the *IL1RN*2* allele with an increased GC risk, but the current study found no evidence to support this claim. This polymorphic allele was only associated with the appearance of tumors in the cárdia region of the stomach, whereas the heterozygous genotype L*2 seems to contribute to an increased risk of GC in the Ceará population.

Key words: gastric cancer; *Helicobacter pylori*; interleukin IL-1RA; inflammation; genetic polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Funcionamento do sistema imunológico.....	13
Figura 2 -Diferentes vias de diferenciação das células TCD4+, as citocinas indutoras e as produzidas após a diferenciação.....	14
Figura 3 -Mecanismos de combate a bactérias intracelulares.....	16
Figura 4 -Respostas do sistema imune a bactérias extracelulares.....	17
Figura 5 -Alelos do gene <i>IL1RN</i>	20
Figura 6 -Exemplos de produtos de PCR de <i>IL1RN</i> em géis de poliacrilamida.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> usados para genotipar <i>IL1RN</i>	24
Tabela 2 -Frequência por sexo e idade dos pacientes com CG e da população pareada e frequência dos subtipos histopatológicos e localização anatômica dos tumores gástricos.....	25
Tabela 3 -Frequência genotípica de <i>IL1RN</i> e análise de risco entre CG e controle.....	26
Tabela 4 -Relação entre faixas etárias distintas e os genótipos da interleucina IL- 1RA.....	26
Tabela 5 -Análises genotípicas entre subtipos histopatológicos e população.....	27
Tabela 6 -Análises genotípicas entre localização anatômica e população.....	28
Tabela 7 -Análise de risco dos genótipos de acordo com os subtipos histológicos e a localização anatômica.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cag-PAI	Ilha de patogenicidade <i>cag</i>
CG	Câncer gástrico
C3b	Subunidade da molécula C3 do sistema complemento
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> – Brometo de cetiltrimetil amônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IC	Intervalo de Confiança
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
Igs	Imunoglobulinas
LPS	Lipopolissacarídeo
NK	Natural Killer
NOD 1	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> – Risco Relativo
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TBE	Tris Borato EDTA
Th	Células T auxiliares (helper)
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> – Fator de Crescimento Transformante
TLR	Receptor Toll-like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> – Variação do Número de Sequências Repetidas

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
α	Alfa
%	Porcentagem
\pm	Mais ou menos
g	Gramas
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
mM	Milimolar
HCl	Ácido Clorídrico
°C	Graus Celsius
min	Minutos
μ L	Microlitro
TM	Marca Comercial
®	Marca Registrada
μ M	Micromolar
ng	Nanograma
seg	Segundos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Sistema Imunológico	13
1.1.1	Funcionamento	13
1.1.2	Resposta a Patógenos	15
1.2	<i>Helicobacter pylori</i>, agente etiológico ao câncer gástrico	18
1.2.1	Fatores de virulência da <i>H. pylori</i> e resposta imune do hospedeiro	19
1.3	Polimorfismos genéticos de <i>IL1RN</i> e câncer gástrico	20
2	PERGUNTA DE PARTIDA	21
3	HIPÓTESE	21
4	OBJETIVOS	21
4.1	Objetivo geral	21
4.2	Objetivos específicos	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1	Sujeitos	22
5.2	Extração de DNA	22
5.3	Genotipagem do polimorfismo da interleucina IL-1RA	23
5.4	Análises estatísticas	24
6	RESULTADOS	25
6.1	População do estudo	25
6.2	Frequência dos polimorfismos do gene <i>IL1RN</i> nos pacientes e na população controle	25
6.2.1	Associação dos polimorfismos com parâmetros histopatológicos	27
7	DISCUSSÃO	29
8	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
	ANEXO A	35
	ANEXO B	36
	ANEXO C	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Imunológico

1.1.1. Funcionamento

O sistema imunológico atua contra antígenos com potencial patogênico e participa do controle homeostático junto aos sistemas endócrino e nervoso. São três as linhas de defesa do sistema imune: barreiras mecânicas, químicas e biológicas; imunidade inata e imunidade adquirida (SILVA, 1997).

Após as barreiras físicas, químicas e biológicas, as primeiras células do sistema imunológico que entram em ação são os macrófagos (contra protozoários e bactérias intracelulares) e neutrófilos (contra bactérias). Inicialmente, elas fagocitam micro-organismos e restos celulares, digerem-nos e apresentam seus antígenos ao meio extracelular através da membrana plasmática (Figura 1). Junto a esses fagócitos, células dendríticas, células *Natural Killer*(NK) e o sistema complemento constituem a imunidade inata (D'ELIOS *et al.*, 2011).

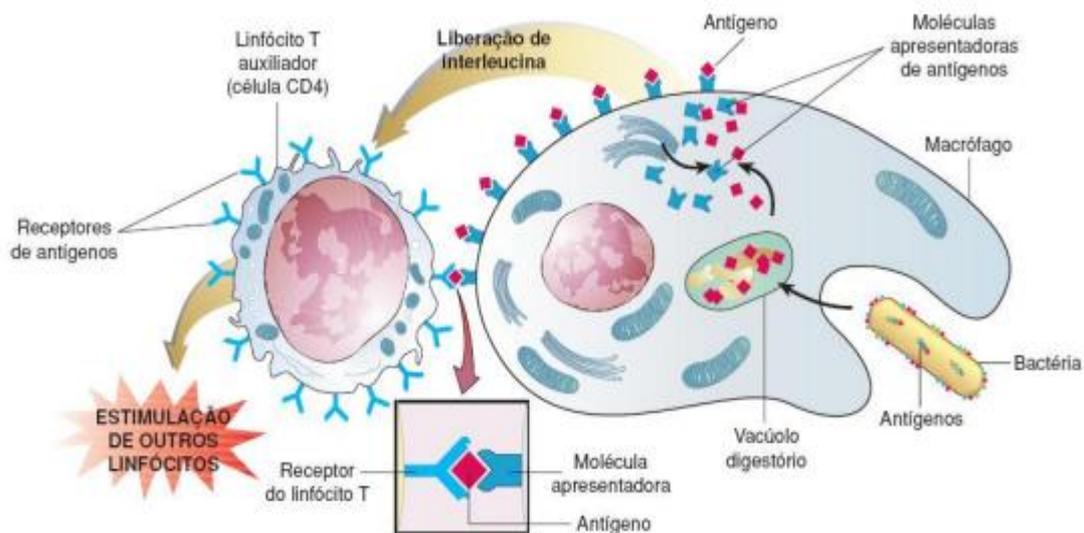


Figura 1- Funcionamento do sistema imunológico. Fonte: <http://saibamaissobrevacinas.wordpress.com> (2011).

Linfócitos T (células do sistema imune adaptativo/adquirido) podem ter ação citotóxica (realizada pelas células TCD8+) ou reconhecer os antígenos apresentados pelos

fagócitos, unir-se a estes e ativá-los através da liberação de citocinas, promovendo a destruição do agente infeccioso intracelular (função exercida pelas células TCD4+) (MACHADO *et al.*, 2004). As células T citotóxicas causam a morte da célula infectada através de perforinas e granzimas, que são grânulos citoplasmáticos capazes de destruir outras células. Também podem ativar fagócitos e induzir a inflamação, através da liberação de IFN- γ e TNF (LORENZI *et al.*, 2012).

As células T auxiliares (TCD4+), quando ainda não efectoras, são chamadas de linfócitos TCD4+ virgens, podendo proliferar e se diferenciar de acordo com as proteínas que as estimulam. A diferenciação resulta em células efectoras com características funcionais próprias, com um padrão de produção de diferentes tipos de citocinas e, conseqüentemente, com respostas imunes distintas. Atualmente, são conhecidos alguns tipos desses linfócitos, dentre eles: Th1, Th2, Th17 e TREG, sendo que os Th1, Th2 e TREG são conhecidos há mais de 20 anos e os Th17 foram estudados somente no ano 2000 (Figura 2) (SOUZA *et al.*, 2010).

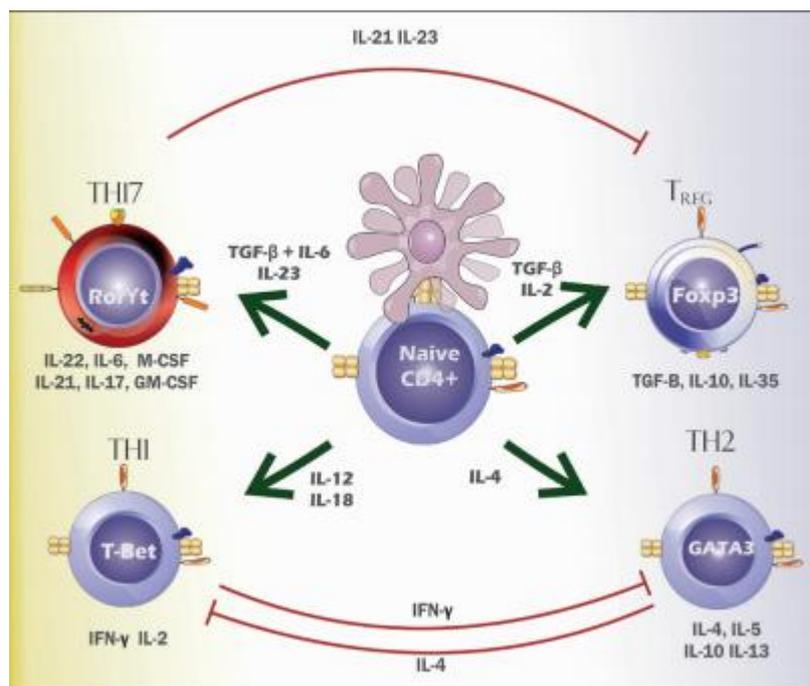


Figura 2 - Diferentes vias de diferenciação das células TCD4+, as citocinas indutoras e as produzidas após a diferenciação. Fonte: Sistema Imunitário – Parte III (2010).

Respostas Th1 atuam na ativação de macrófagos (através de citocinas como IFN γ e IL-2) e destruição de patógenos intracelulares, à medida que aumenta a produção de mediadores da oxidação, potencializando o poder microbicida das células fagocitárias ativadas. Já as Th2 são eficientes para a eliminação de micro-organismos extracelulares, por meio da produção de anticorpos e inflamação por eosinófilos. As interleucinas produzidas são

IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. As vias de diferenciação para esses dois tipos celulares são mutuamente inibitórias: quando os linfócitos virgens formam Th1, suas citocinas inibem a via de diferenciação em Th2, e vice-versa. Esse funcionamento é importante para a homeostasia do sistema imune. As respostas Th17 medeiam a inflamação precoce do tecido, pois suas células produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IL-21, IL-22, IL-23) e quimiocinas que recrutam células Th1 para os locais da inflamação. As células T reguladoras (T_{REGS}) têm poder imunossupressor, pois suas citocinas IL-10 e TGF- β suprimem a ativação de linfócitos T. Altos níveis de citocinas inflamatórias podem inibir a regulação (SOUZA *et al.*, 2010).

A resposta mediada por linfócitos B (imunidade humoral) também faz parte do sistema imune adquirido e atua na produção de imunoglobulinas, que neutralizam ou destroem antígenos de patógenos e têm elevada especificidade (JÚNIOR *et al.*, 2010).

As respostas através dos linfócitos T e B são caracterizadas pela presença de memória, embora seja uma resposta lenta. Enquanto existirem antígenos estimulando, a resposta persiste. À medida que estes vão sendo destruídos, a quantidade de linfócitos tende a diminuir. Restam, no organismo, linfócitos especiais, chamados células de memória, capazes de reconhecer os mesmos agentes infecciosos ao longo da vida do indivíduo e serem ativados para um novo combate (MENDONÇA *etal.*, 2008).

1.1.2. Resposta a patógenos

O combate a infecções por patógenos ocorre de acordo com a interação entre estes e o hospedeiro. A resposta imune depende da forma como o agente infeccioso se estabelece, ou seja, como ele invade e coloniza os tecidos, logo elas são distintas para parasitas, micro-organismos e vírus. Também se diferencia se o micro-organismo é intra ou extracelular.

- Bactérias intracelulares

Para eliminar bactérias intracelulares, inicialmente neutrófilos e macrófagos são recrutados para o local da infecção através de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α). Quando essas células são ativadas, produzem componentes bioquímicos microbicidas, como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico. Os macrófagos ativados e as células dendríticas podem liberar a interleucina IL-12 e ativar células NK, produtoras de INF γ para a ativação de macrófagos que elimina a bactéria fagocitada ou promove a lise bacteriana. Outro mecanismo de ativação de macrófagos é a presença de receptores semelhantes

aToll(TLR-Toll like receptors) que reconhecem tipos distintos de moléculas patogênicas: lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas ou flagelina de Gram-positivas e Gram-negativas (GERMAIN *et al.*, 2005).

Caso os macrófagos não eliminem a infecção, linfócitos TCD4+ (tipo Th1) e TCD8+ são ativados. A resposta Th1 envolve a liberação de $\text{INF}\gamma$ e IL-2 para ativar macrófagos. Se linfócitos T citotóxicos forem ativados, estes eliminam as células infectadas e, conseqüentemente, as bactérias intracelulares (Figura 3) (COELHO-CASTELO, 2009).

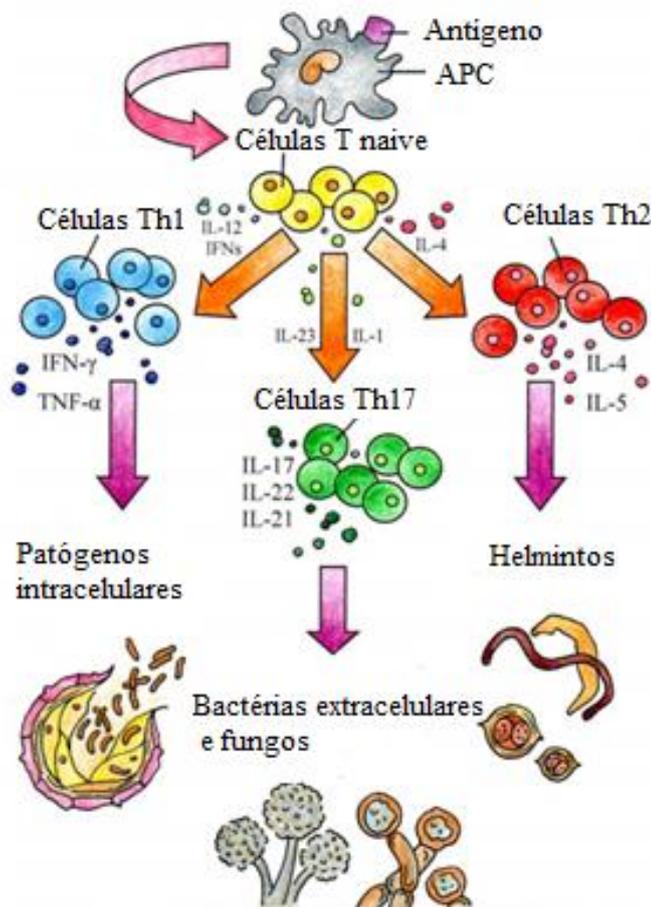


Figura 3 - Mecanismos de combate a bactérias intracelulares. Fonte: Modificado de D'Elisio *et al.*, 2011.

- Bactérias extracelulares

No combate a bactérias extracelulares, as barreiras iniciais como peristaltismo, secreção de muco gastrointestinal, pH ácido do estômago, movimentos dos cílios nas vias aéreas e tecido epitelial íntegro são de grande importância. Os principais mecanismos de defesa do sistema imune a esses micro-organismos são ativação do complemento, produção de anticorpos, fagocitose e inflamação (YAOCHITE; ANDRADE, 2007).

Para que as bactérias extracelulares sejam fagocitadas e eliminadas por neutrófilos e macrófagos, elas precisam ser opsonizadas por anticorpos (imunoglobulinas) ou moléculas do sistema complemento (C3b). As imunoglobulinas (Igs) são produzidas por linfócitos B efetores, ativados diretamente por antígenos bacterianos ou por meio de citocinas liberadas das células TCD4+ efetoras (Th2). As Igs, além da opsonização, atuam na neutralização do patógeno e na ativação do sistema complemento. Este último também é importante na opsonização, na eliminação direta da bactéria através da lise celular e/ou na promoção da inflamação (Figura 4) (MURO *et al.*, 2009).

Tanto as bactérias intracelulares como as extracelulares podem desenvolver mecanismos de escape ao sistema imune. No caso das intracelulares, elas podem escapar da ação das substâncias produzidas nos fagolisossomos (vesículas fagocíticas no interior dos macrófagos), rompendo sua membrana e invadindo o citosol, ou inibindo a sua formação. Os macrófagos não as eliminando, pode haver o estabelecimento de uma infecção crônica com a formação de uma estrutura conhecida como granuloma, onde linfócitos T circundam os macrófagos infectados, podendo ocorrer fibrose no tecido. As bactérias extracelulares também podem escapar da fagocitose, produzindo substâncias antifagocíticas (COELHO-CASTELO, 2009).

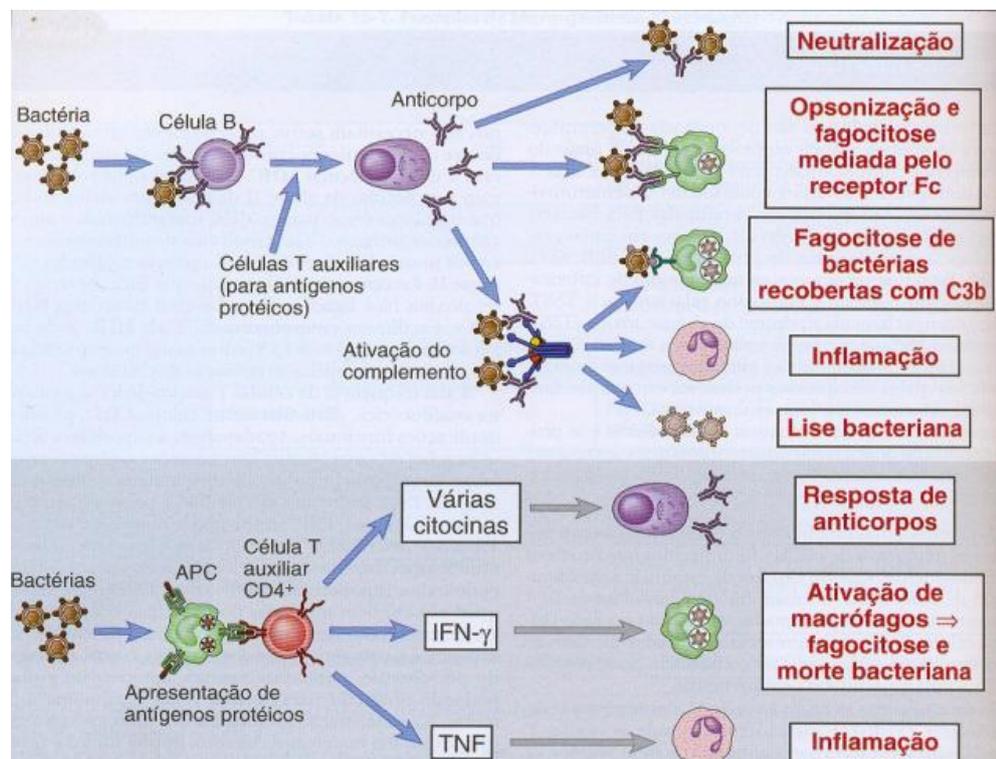


Figura 4 - Respostas do sistema imune a bactérias extracelulares. Fonte: Abbas *et al.*, 2008.

- Resposta imune à *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria extracelular, Gram-negativa, que infecta o trato gastrointestinal do homem. Apesar de bem adaptada ao seu hospedeiro, em determinadas condições, pode causar lesões gástricas de diferentes gravidades, incluindo o câncer gástrico. Inicialmente, a bactéria é reconhecida por receptores semelhantes a *Toll* ou NOD 1 (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) de macrófagos e células dendríticas, que liberam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que recrutam neutrófilos e outros leucócitos para o local da infecção. Esta resposta pode ser ineficiente devido à ação de enzimas bacterianas (catalase, por exemplo) que a protegem; e a redução do ácido gástrico, característica dessa fase inicial da resposta, favorece a colonização do tecido (DUNN *et al.*, 1997). Os radicais livres de oxigênio liberados pelas células fagocíticas podem provocar lesão oxidativa no tecido e modificar a estrutura do DNA, processos considerados carcinogênicos (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Respostas do sistema imune adquirido também são estimuladas devido à liberação de citocinas pelas células do sistema imune inato. Normalmente, há o predomínio da resposta Th1 em relação à Th2, o que não elimina o micro-organismo e torna o processo inflamatório exacerbado, causando danos ao tecido do hospedeiro (LADEIRA *et al.*, 2003). As células TREGS regulam a resposta Th1 se a densidade de bactérias for bem elevada. Anticorpos específicos são produzidos por linfócitos B em resposta à *H. pylori*, podendo esta se manter protegida e inacessível aos anticorpos produzidos (ISMAIL *et al.*, 2003).

1.2. *Helicobacter pylori*, agente etiológico do câncer gástrico

A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* é um dos fatores etiológicos mais relevantes para o desenvolvimento do câncer gástrico, que representa hoje um sério problema de saúde pública, pois é a segunda causa de mortes por neoplasias no mundo, sendo o quarto tipo de câncer mais comum (INCA, 2016). A bactéria é amplamente distribuída na população mundial e sabe-se que menos de 1% das pessoas infectadas por ela desenvolvem câncer gástrico, fato que pode ser explicado por características do micro-organismo e do hospedeiro e pela relação estabelecida entre eles. Embora as causas das afecções gástricas sejam diversas (alimentação, tabaco, álcool), a infecção por *H. pylori*, seus fatores de virulência e a resposta imune do hospedeiro são de grande importância para que lesões se estabeleçam ou não (DUNN *et al.*, 1997).

1.2.1. Fatores de virulência de *H. pylori* e resposta imune do hospedeiro

Os fatores de virulência de *H. pylori* estão relacionados à bioquímica e à genética desses organismos. Para que ocorra a colonização do tecido gástrico, é necessário atravessar a camada de muco que o protege, e para isso lipases e proteases da bactéria a degradam. Por ter forma espiral e apresentar flagelos, a *H. pylori* tem facilidade em ultrapassar essa camada e entrar em contato com as células epiteliais do estômago. Enzimas (a catalase, por exemplo) do micro-organismo o protegem da ação das primeiras células de defesa do sistema imune do hospedeiro (macrófagos e neutrófilos), e a presença da urease confere resistência ao pH ácido do ambiente a ser colonizado (LADEIRA *et al.*, 2003).

Os resultados clínicos mais graves normalmente estão associados a cepas bacterianas mais virulentas. Dentre esses fatores de virulência estão a ilha de patogenicidade *cag* (*cytotoxin associated gene pathogenicity island* - *cag*-PAI), com aproximadamente 31 genes, e uma variação de alelos do gene *vacA*. Este gene produz uma proteína citotóxica capaz de formar poros na membrana da célula, aumentando sua permeabilidade e induzindo à apoptose (LIMA *et al.*, 2009).

Dentre os genes *cag*-PAI, o *cagE*, *cagA* e *virB11* podem representar importantes fatores de virulência. O *cagE* codifica uma proteína que induz a produção da IL-8 pelas células do epitélio gástrico; o *virB11* auxilia no transporte da proteína CagA na célula hospedeira, e o *cagA* codifica uma proteína com caráter imunogênico (CagA) injetável na célula do hospedeiro, capaz de alterar sua morfologia e funcionalidade (LIMA *et al.*, 2011). As cepas *cagA* positivas normalmente são mais virulentas, levando a uma resposta mais intensa do sistema imune do indivíduo infectado, com uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-8. A IL-1 β , por exemplo. Isso promove a resposta inflamatória e inibe a secreção gástrica, o que favorece o aparecimento de lesões na mucosa gástrica. Se essa resposta for exacerbada, devido a uma infecção crônica, pode evoluir para o câncer gástrico (LADEIRA *et al.*, 2002).

Outra interleucina, conhecida como antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), atua no controle da inflamação, pois compete pelos mesmos receptores da citocina promotora da inflamação que antagoniza (IL-1) (AL-MOUNDHRI *et al.*, 2006).

Diferenças na expressão dessas interleucinas podem favorecer o desenvolvimento de doenças gástricas. Logo, um fator de risco relevante para o câncer gástrico é a existência de polimorfismos genéticos de interleucinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como a IL-

1 β e a IL-1RA respectivamente, e como eles interferem na expressão destas (SANTOS *et al.*, 2012).

1.3. Polimorfismo genético de *IL1RN* e câncer gástrico

Polimorfismos genéticos são variações alélicas para o mesmo gene, cujos alelos tenham uma frequência igual ou superior a 1% na população. Dentre os tipos de polimorfismos mais comuns estão as substituições de uma única base (SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*) e as variações do número de sequências repetidas (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*). Este último caracteriza um dos tipos de polimorfismos mais estudados do gene *IL1RN* (responsável pela expressão da interleucina IL-1RA), localizado no braço longo do cromossomo dois (2q). Os alelos se diferenciam pela quantidade de repetições de 86 pares de base (pb), tendo os longos de três a seis repetições (*IL1RN**L) e o curto, duas repetições (*IL1RN**2) (Figura 5) (AL-MOUNDHRI *et al.*, 2006).

Como a interleucina expressa por esse gene compete pelo receptor da IL-1 (citocina pró-inflamatória), ela apresenta caráter anti-inflamatório, diminuindo o efeito danoso da proteína que antagoniza (EL-OMAR *et al.*, 2000). O polimorfismo *IL1RN* VNTR pode favorecer a elevação do nível da IL-1 β e conseqüente aumento do processo inflamatório em resposta à infecção por *H. pylori*, contribuindo para o desenvolvimento do CG (GATTI *et al.*, 2004).

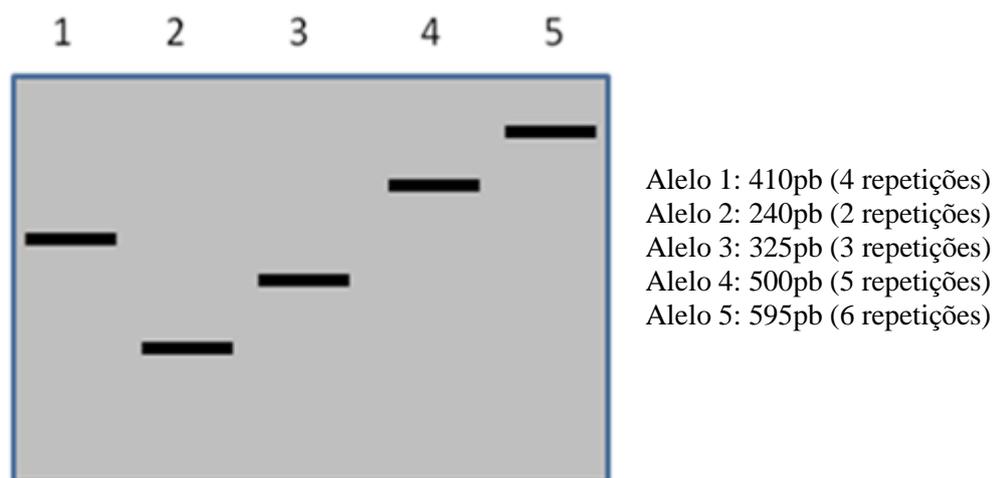


Figura 5 - Alelos do gene *IL-1RN*

2. PERGUNTA DE PARTIDA

O polimorfismo genético da interleucina IL-1RA é um fator de risco para o aparecimento do câncer gástrico (CG) na população do Ceará?

3. HIPÓTESE

O alelo polimórfico *IL1RN**2 do gene *IL1RN* pode representar um fator de risco para o aparecimento do câncer gástrico na amostra estudada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar se o polimorfismo genético do gene da interleucina IL-1RA representa um fator de risco para o câncer gástrico numa amostra da população cearense.

4.2 Objetivos específicos

-Determinar a frequência genotípica do polimorfismo *IL1RN* VNTR em pacientes com câncer gástrico e em população sem história prévia deste câncer, no Ceará.

-Estimar o risco da presença do alelo polimórfico para o desenvolvimento do câncer gástrico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Sujeitos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Geral de Fortaleza (Anexo A) e pelo Comitê de Ética do Hospital da Universidade Federal do Ceará (Anexo B), Brasil. Todos os indivíduos que participaram das análises assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C).

Um total de 124 amostras de tumores gástricos de pacientes diagnosticados com câncer gástrico (CG), que foram submetidos à gastrectomia, foi obtido nos hospitais Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF), Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), Hospital Geral César Cals (HGCC), Hospital Geral de Fortaleza (HGF). A classificação histológica para o câncer gástrico foi feita de acordo com a classificação de Lauren, sendo que estes dados foram coletados dos laudos patológicos. Somente as amostras que continham um percentual igual ou superior a 80% de células tumorais foram dirigidas para a extração do DNA genômico.

O grupo controle foi composto por 253 voluntários saudáveis recrutados no banco de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e Santa Casa de Misericórdia de Sobral, sem história prévia de câncer gástrico. Todos os indivíduos eram geneticamente não relacionados e da mesma região geográfica (estado do Ceará, Nordeste do Brasil) e foram pareados pelo sexo e pela idade (± 2 anos).

5.2. Extração de DNA

O DNA genômico das amostras do CG foi extraído de tecido tumoral congelado utilizando o brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), técnica adaptada do método de 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 a proporção de 6mL 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 2.000 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 2.000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado 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 ressuscitado 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. O DNA foi quantificado usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 3300 (Wilmington, DE, EUA). Já a extração de sangue foi realizada pelo método salting-out descrito por Miller (1988).

5.3. Genotipagem dos polimorfismos da interleucina IL-1RA

No segundo íntron do gene *IL1RN*, existe um número variável de repetições em tandem (VNTR) com uma sequência de nucleotídeos de 86pb como seu elemento de repetição. Neste trabalho, foram encontrados alelos com 3, 4 e 5 repetições, todos chamados de longos (*IL1RN**L), e com 2 repetições, o curto polimórfico (*IL1RN**2) (Figura 6).

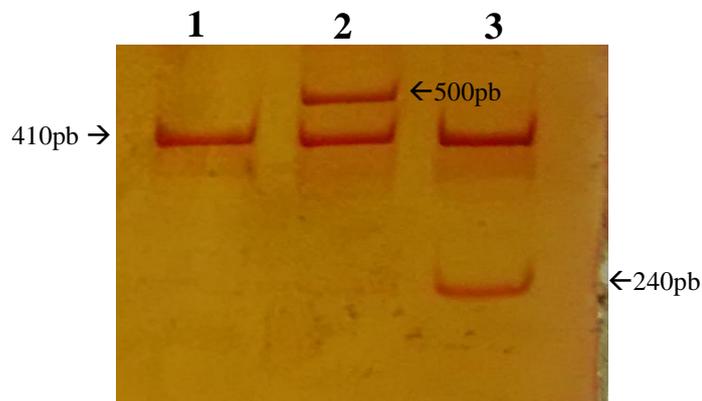


Figura 6 - Exemplos de produtos de PCR de *IL1RN* em géis de poliacrilamida

Legenda - Tamanho dos fragmentos: (1) 410pb/410pb, (2) 500pb/410pb e (3) 410pb/240pb

O polimorfismo do gene que codifica a IL-1RA foi detectado por meio da análise do DNA genômico, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *PolymeraseChain Reaction*) com algumas modificações da descrição de Tarlow *et. al.* (1993), cujo preparo do mix para amplificação do gene foi feito para um volume de 20 µl usando Green Master Mix®

(Promega, Madison, EUA), de acordo com as instruções do fabricante com a adição de 0.4 μ M de cada um dos *primers* (Tabela 1) e 25ng de amostra de DNA.

Com o uso do termociclador Mastercycler Epgradient (Eppendorf®) a desnaturação inicial foi de 95°C/5 min, foram estabelecidos 40 ciclos para desnaturação (95°C/1 min), anelamento dos *primers* (55°C/55 seg) e extensão (72°C/1 min). A extensão final se deu a 72°C/7 min.

Os amplicons gerados na reação de PCR foram homogeneizados com 1 μ L de azul de bromofenol e aplicados em gel de poliacrilamida a 6%, em tampão T.B.E. 1x numa voltagem de 80 Volts por 70 minutos. Os genótipos foram visualizados após coloração com nitrato de prata.

Tabela 1 – *Primers* usados para genotipar *IL1RN*

Polimorfismo	<i>Primers</i>
<i>IL1RN</i> (VNTR)	F: 5'- TCAGCAACACTCCTAT-3' R: 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'

5.4. Análises estatísticas

Para o estudo de risco foi feito um pareamento de 1:2 ou 1:1 entre indivíduos com CG e população controle, respectivamente; para isso foram usadas 247 amostras da população controle. Diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas pelo teste do Qui Quadrado (χ^2) ou o Teste Exato de Fisher, utilizando-se o programa estatístico Epi Info™ versão 7.1.5. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de *p* foram menores ou iguais a 0,05.

6. RESULTADOS

6.1. População do estudo

Dos 124 casos de adenocarcinoma gástrico analisados, 64,5% dos pacientes era do sexo masculino e 35,5% de pacientes do sexo feminino; com uma razão homens/mulheres de 1,8:1. A idade dos pacientes variou de 23 a 92 anos com mediana de 65 anos. Quando a idade foi distribuída por faixas etárias, observou-se que a faixa mais frequente foi a de ≥ 60 anos (70%) como mostrado na Tabela 2. Pela tabela abaixo também se verifica que não houve diferenças estatísticas entre pacientes diagnosticados com CG e indivíduos controles em relação aos parâmetros idade e sexo. Neste estudo, o tipo intestinal foi ligeiramente mais frequente que os difusos (65/124; 52,5%), sendo que 2,5% (3/124) das amostras não puderam ser classificadas, pois não constava diagnóstico nos dados coletados. A maioria dos tumores foi localizada na região não cárdia (94/124; 75,8%).

Tabela 2 - Frequência por sexo e idade dos pacientes com CG e da população pareada e frequência dos subtipos histopatológicos e localização anatômica dos tumores gástricos

Sexo	CâncerGástrico n (%)	População n (%)	<i>p</i>	OR(95% CI)
Homens	80 (64,5)	164 (65)	1.00	1.00 (0.62 – 1.62)
Mulheres	44 (35,5)	89 (35)		
Idade				
< 60	37 (30)	82 (32,5)	0.244	0.76 (0.46 – 1.24)
≥ 60	87 (70)	171 (67,5)		
Subtipohistopatológico				
Intestinal	65 (52,5)			
Difuso	56 (45)			
Localizaçãoanatômica				
Cárdia	30 (24)			
Não cárdia	94 (76)			
Total	124	253		

*Valor de *p* estatisticamente significativo (<0.05)

6.2. Frequência dos polimorfismos do gene *IL-1RN* nos pacientes e na população controle

Considerando as distribuições genóticas entre os pacientes e controles, observou-se nos pacientes uma maior frequência (58%) do genótipo heterozigoto (L*2) enquanto que nos controles o genótipo homozigoto selvagem (LL) foi o mais frequente (46%) como mostrado na Tabela 3. A análise de risco mostrou que o genótipo heterozigoto L*2 ($p = 0.0069$; $OR = 1.82$, $IC = 1.18-2.9$) foi associado com o risco para o desenvolvimento do câncer gástrico. Quando a idade foi considerada, tendo como ponto de corte a idade de 60 anos, observou-se que o risco, na análise geral, foi restrito a indivíduos com idade ≥ 60 anos (Tabela 4).

Tabela 3 – Frequência genótipica de *IL-1RN* e análise de risco entre CG e controle

<i>IL-1RN</i>	CâncerGástrico n (%)	População n (%)	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% IC)
LL	44 (35,5)	117 (46)	-	-
L2*	72 (58)	102 (40,5)	0.0069*	1.82 (1.18 – 2.97)
2*2*	8 (6,5)	34 (13,5)	0.273	0.62 (0.26 – 1.45)
Total	124	253		

*Valor de *p* estatisticamente significativo (<0.05)

Tabela 4 - Relação entre faixas etárias distintas e os genótipos da interleucina *IL-1RA*

Idade <60 <i>IL-1RN</i>	CâncerGástrico n (%)	População n (%)	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% IC)
LL	13 (35)	34 (41,5)	-	-
L2*	21 (57)	38 (46,5)	0.384	1.44 (0.62 – 3.32)
2*2*	3 (8)	10 (12)	1.000	0.78 (0.18 – 3.31)
Total	37	82		
Idade ≥ 60 <i>IL-1RN</i>	CâncerGástrico n (%)	População n (%)	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% IC)
LL	31 (35,5)	83 (48,5)	-	-
L2*	51 (58,5)	64 (37,5)	0.0067*	2.13 (1.22 – 3.70)
2*2*	5 (6)	24 (14)	0.270	0.55 (0.19 – 1.59)
Total	87	171		

*Valor de *p* estatisticamente significativo (<0.05)

6.2.1 Associação dos polimorfismos com parâmetros histopatológicos

Os genótipos do polimorfismo foram também comparados entre casos e controles categorizando o tumor de acordo com a localização anatômica e o subtipo histológico. A análise de risco para cada subtipo em relação à população controle correspondente no pareamento mostrou resultado significativo para o risco do heterozigoto para o subtipo intestinal ($p = 0.006$; $OR = 2.42$, $IC = 1.26 - 4.65$), como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Análises genótípicas entre subtipos histopatológicos e população

CG	Intestinal	População		OR	Difuso	População		OR
<i>IL-1RN</i>	n (%)	n (%)	<i>p</i>	(95% IC)	n (%)	n (%)	<i>p</i>	(95% IC)
LL	20(31)	59(46)	-	-	24(43)	54 (48)	-	-
L2*	42(64,5)	51(39,5)	0.006*	2.42 (1.26 – 4.65)	28(50)	44(39,5)	0.296	1.43 (0.72 – 2.81)
2*2*	3(4,5)	19(14,5)	0.388	2.14 (0.57 – 8.02)	4(7)	14(12,5)	0.574	0.64 (0.19 – 2.15)
Total	65	129			56	112		

*Valor de p estatisticamente significativo (<0.05)

As análises estatísticas feitas para os tumores quanto à localização anatômica, comparados aos controles pareados, mostraram uma associação de risco do genótipo heterozigoto para o desenvolvimento de tumores localizados na cárdia ($p = 0.01$; $OR = 3.55$, $IC = 1.32 - 9.53$) (Tabela 6). O risco também foi observado no modelo dominante para o alelo polimórfico e para o modelo overdominante. Tumores localizados na região não cardia também apresentaram risco, mas apenas no modelo overdominante.

Não foi observado nenhuma diferença estatística entre os subtipos histopatológicos, apesar de pacientes portadores do genótipo heterozigoto polimórfico ser um pouco mais frequente no subtipo intestinal que no difuso. Também não se observou nenhuma diferença quanto à distribuição genotípica considerando as regiões anatômicas (Tabela 7).

Tabela 6 - Análises genotípicas entre localização anatômica e população

CG <i>IL-1RN</i>	Cárdia n (%)	População n (%)	<i>p</i>	<i>OR</i> (95%IC)	Não cárdia n (%)	População n (%)	<i>p</i>	<i>OR</i> (95%IC)
LL	9(30)	32(53,5)	-	-	35 (37)	84(45)	-	-
L2*	18(60)	18(30)	0.01*	3.55 (1.32 – 9.53)	54(57,5)	80(43)	0.07	1.62 (0.95 – 2.73)
2*2*	3(10)	10(16,5)	1.00	1.06 (0.24 – 4.71)	5(5,5)	23(12)	0.216	0.52 (0.18 – 1.48)
L2*+2*2*	21(70)	28(46,5)	0.03*	2.66 (1.05 – 6.76)	59(63)	103(55)	0.218	1.37 (0.82 – 2,28)
LL+L2*/2*2*	27(90)	50(83,5)	0.53	1.80 (0.45 – 7.10)	89(94,5)	164(88)	0.06	2.49 (0.91 – 6.79)
L2*/LL+2*2*	12(40)	42(70)	0.006*	3.50 (1.40 – 8.74)	40(42,5)	107(57)	0.02*	1.80 (1.09 – 2.98)
Total	30	60			94	187		

*Valor de *p* estatisticamente significativo (<0.05)**Tabela7-** Análise de risco dos genótipos de acordo com os subtipos histológicos e a localização anatômica

CG <i>IL-1RN</i>	Intestinal n (%)	Difuso n (%)	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% IC)	Cárdia n (%)	Não cárdia n (%)	<i>p</i>	<i>OR</i> (95% IC)
LL	20(31)	24(43)	-	-	9(30)	35(37)	-	-
L2*	42(64,5)	28(50)	0.129	0.55 (0.25 – 1.19)	18(60)	54(57,5)	0.574	1.29 (0.52 – 3.20)
2*2*	3(4,5)	4 (7)	1.000	1.11 (0.22 – 5.56)	3(10)	5(5,5)	0.366	2.33 (0.46 – 11.64)
Total	65	56			30	94		

*Valor de *p* estatisticamente significativo (<0.05)

7. DISCUSSÃO

O câncer gástrico representa um sério problema de saúde pública, pois é a segunda causa de mortes por neoplasias no mundo, sendo o quarto tipo de câncer mais comum. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, está havendo um declínio da incidência dessa neoplasia em vários países, principalmente nos desenvolvidos como Estados Unidos e Inglaterra. Na América Latina, é registrada uma alta mortalidade e no Japão há o maior número de casos (780/100.000 habitantes). No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais incidente em homens e o quinto em mulheres, sendo mais frequente no sexo masculino que no feminino (INCA, 2016). É uma doença mais comum entre as pessoas com mais de 60 anos de idade. De acordo com os parâmetros idade e sexo, observou-se uma conformidade entre os resultados encontrados no presente estudo e os dados da maioria das análises de risco em relação ao CG.

As causas para a carcinogênese gástrica são muitas e podem atuar conjuntamente para o seu desenvolvimento. De um modo geral, esses fatores podem ser: alimentação, tabaco, infecção, álcool, sexo, idade e outras causas (INCA, 2016). Embora as causas sejam diversas, a resposta inflamatória do hospedeiro, através da expressão de citocinas, à infecção por *H. pylori* é de grande importância para que lesões se estabeleçam. Como já dito anteriormente, polimorfismos genéticos de citocinas podem estar relacionados ao desenvolvimento do câncer gástrico. Nesse sentido, o presente estudo avaliou o risco do polimorfismo do gene da interleucina que compete pelo receptor da IL-1 β (*IL1RN*) para o desenvolvimento do CG.

A nível mundial, encontra-se uma controvérsia a respeito do papel do polimorfismo *IL1RN* VNTR para o risco na carcinogênese gástrica. Apesar da meta-análise realizada por Kamangar *et al.* (2006), com pacientes de países ocidentais, não ter encontrado associação entre o alelo polimórfico *IL1RN**2 e CG, outra meta-análise realizada por Zhang *et al.* (2012) (cujos grupos étnicos dos estudos eram descendentes de asiáticos e caucasianos) encontrou uma associação do genótipo heterozigoto com o risco para o CG. Adicionalmente, o estudo de Peleteiro *et al.* (2010) com lesões gástricas pré-cancerosas encontrou um aumento do risco associado aos genótipos homozigoto e heterozigoto, indicando a influência do alelo polimórfico para o risco de desenvolvimento do CG.

Os resultados apresentados aqui mostraram um risco somente do genótipo heterozigoto para o desenvolvimento do CG na população do Ceará, resultado semelhante à conclusão da meta-análise realizada por Zhang *et al.* (2012). Outro trabalho, não incluído

nesta meta-análise, também encontrou, no estudo feito em uma população árabe de Omã, associação somente do heterozigoto com o risco para o CG (AL-MOUNDHRI *et al.*, 2006).

A justificativa para a associação com risco vem do fato de que o alelo *IL1RN*2* está relacionado com o elevado nível de IL-1 β circulante, o que leva a uma resposta inflamatória prolongada e consequente aumento do risco para a carcinogênese (SANTOS *et al.*, 2012).

Somente seis estudos foram encontrados, até o momento da redação deste texto, com a população brasileira. Dentre eles, Oliveira *et al.* (2012) demonstraram a associação do alelo *IL1RN*2* com o risco para o CG, enquanto Gatti *et al.* (2004) não encontrou tal relação. Essa variação nos resultados pode ser explicada pela diversidade étnica da população brasileira, que influencia nas frequências genótípicas e alélicas (IOANNIDIS *et al.*, 2004).

Quando os dados foram analisados de acordo com o subtipo hisptopatológico, observou-se que o risco do genótipo heterozigoto foi restrito ao subtipo intestinal. A importância do genótipo heterozigoto é corroborada pela baixa frequência em relação ao grupo controle do genótipo homozigoto polimórfico. A meta-análise de Xue *et al.* (2010) também encontrou uma associação para o desenvolvimento do subtipo intestinal, mas em indivíduos portadores do alelo *IL1RN*2*. Por outro lado, o presente estudo encontrou associação do alelo *IL1RN*2* com o aparecimento de tumores da cárdia enquanto que Xue *et al.* (2010) observaram a relação do alelo polimórfico com a presença de tumores na região não-cárdia do estômago. A associação encontrada na meta-análise de Xue *et al.* (2010) foi evidente entre os caucasianos, mas não entre os asiáticos ou hispânicos, o que pode ser explicado por uma baixa frequência do alelo de risco nestas populações.

8. CONCLUSÃO

O genótipo heterozigoto L*2 parece aumentar o risco de câncer gástrico na população do Ceará, enquanto que o genótipo homozigoto polimórfico não apresentou risco para o desenvolvimento da doença. Não houve associação do alelo *IL1RN*2* com o risco de desenvolvimento do CG, mas ele parece influenciar no aparecimento de tumores na região cárdia do estômago. Com relação ao subtipo histopatológico, o risco do heterozigoto foi restrito ao subtipo intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. Sexta Edição. Rio de Janeiro. Elsevier. 2008
- AL-MOUNDHRI, M. S. *et al.* Interleukin-1 β gene (*IL-1B*) and interleukin 1 receptor antagonist gene (*IL-1RN*) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. **Gastric Cancer**, v. 9, p. 284–290, 2006.
- COELHO-CASTELO, A.A. M.; TROMBONE, A. P. F.; ROCHA, C. D.; LORENZI, J. C. C. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina**, v. 42, p. 127–142, 2009.
- D'ELIOS, M. M.; BENAGIANO, M.; BELLA, C. D.; AMEDEI, A. T-cell response to bacterial agents. **J Infect Dev Ctries**; v. 5, n. 9, p. 640-645, 2011.
- DUNN, B.E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 720-741, 1997.
- EL-OMAR, E. M. *et al.* Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v.404, p. 398-402, 2000.
- FOSTER, G. D.; TWELL, D. J. **Plant gene isolation: principles and practice of Clinical Bacteriology**. 2^a ed. England: John Wiley & Sons, 1996.
- GATTI LL, B. R. R.; DE ASSUMPCÃO P. P.; SMITH M. A.; PAYÃO S. L. Interleukin-1beta polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **Clin Exp Med**, v. 4, p. 93-98, 2004.
- GERMAIN, R. N. *et al.* An extended vision for dynamic high-resolution intravital immune imaging. **Semin Immunol**, v. 17, n. 6, p. 431–441, 2005.
- GUIMARÃES, J.; CORVELO, T. C.; BARILE, K. A. *Helicobacter pylori*: Fatores relacionados à sua patogênese. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, p. 33–38, 2008.
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil. In <<http://www.inca.gov.br>>. Último acesso em 13 de janeiro de 2016.
- IOANNIDIS J.P.; NTZANI E.E.; TRIKALINOS T.A. ‘Racial’ differences in genetic effects for complex diseases. **Nat Genet**, v. 36, p.1312-1318, 2004.
- ISMAIL, H. F.; FICK, P.; ZHANG, J.; LYNCH, R. G.; BERG, D. J. Depletion of neutrophils in IL-10(-/-) mice delays clearance of gastric *Helicobacter* infection and decreases the Th1 immune response to *Helicobacter*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 170, p. 3782–3789, 2003.
- JÚNIOR, M. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, p. 552–580, 2010.

KAMANGAR, F.; CHENG, C.; ABNET, C. C.; RABKIN, C. S. Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk—a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, p. 1920–1928, 2006.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Artigo**, p. 1–8, 2002.

LIMA, V. P. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (vacA, cagA, cagE and virB11) in gastric cancer in Brazilian's patients: An association with histopathological parameters. **Cancer Epidemiology**, v. 35, p. 32–37, 2011.

LIMA, V. P.; RABENHORST, S. H. B. Genes Associados à Virulência de *Helicobacter Pylori*. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, p. 389–396, 2009.

LORENZI, J. C. C.; LORENZI, V. C. B.; ZANETTE, D. L. Linfócitos T CD4+ e a Resposta Imune, p. 5–9, 2012.

MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 647–664, 2004.

MENDONÇA, V. A.; COSTA, R. D.; DE MELO, G. E. B. A.; ANTUNES, C. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 343–350, 2008.

MILLERS, A.; DYKES, D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, **Nucleic Acids Res.**, v. 16, 1988.

MURO, L. F. F. *et al.* Relação Antígeno-Anticorpo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça/SP**, v. 12, n. 4, p. 1 – 4, 2009.

OLIVEIRA, J. G.; DUARTE, M. C.; SILVA, A. E. IL-1ra anti-inflammatory cytokine polymorphism is associated with risk of gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population, but the TNF- β pro-inflammatory cytokine is not. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 7617–7625, 2012.

PELETEIRO, B.; LUNET, N.; CARRILHO, C.; DURÃES, C.; MACHADO, J. C.; LAVECCHIA, C.; BARRO, S. H. Association between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions: systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, p. 762–776, 2010.

SANTOS, J. C.; LADEIRA, M. S. P.; PEDRAZZOLI, J.; RIBEIRO, M. L. Relationship of IL-1 and TNF- β polymorphisms with *Helicobacter pylori* in gastric diseases in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 811–817, 2012.

SILVA, C. M. V. *Imunologia* Reprodução, 1997.

SOUZA, A. W. S.*et al.* Sistema imunitário: parte II. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os polos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 665–679, 2010.

TARLOW, J. K.; BLAKEMORE, A. I.; LENNARD, A.; SOLARI, R.; HUGHES, H. N.; STEINKASSERER, A.; DUFF, G. W. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. **Hum Genet**, v.91, n. 14, p. 403-404, 1993.

XUE, H.; LIN, B.; NI, P.; XU, H.; HUANG, G. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a meta-analysis. **Gastroenterol Hepatol**, v. 25, p. 1604–1617, 2010.

YAOCHITE, J. N. U.; ANDRADE, M. F. Imunidade aos agentes infecciosos, 2007.

ZHANG, Y.; LIU, C.; PENG, H.; ZHANG, J.; FENG, Q. IL1 Receptor Antagonist Gene *IL1-RN* Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism and Cancer Risk: A Literature Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1–7, 2012.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF

Fortaleza, 24 de abril de 2013.

Ilma. Sra. comunicamos-lhe o parecer do CEP

Pesquisadora: Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Projeto Intitulado: Polimorfismo de interleucinas e enzimas do sistema de reparo ao estresse oxidativo no câncer gástrico: associado com helicobacter pylori

Protocolo do CEP: 071002/10

Parecer:

O CEP-HGF aprovou a Emenda do projeto acima citado pois o mesmo já havia sido aprovado neste CEP em 07/10/10, porém o pesquisador não conseguiu amostra suficiente e com isto solicitou uma extensão do prazo para coleta de dados feito apenas um Ad-referendum.

Lembramos ao pesquisador o cumprimento da referida Resolução na condução científica do seu projeto e ainda, o encaminhamento ao CEP do relatório final da pesquisa bem como à devolução dos resultados à comunidade

Atenciosamente,


Dr^a. Ilvana Lima Verde Gomes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HGF

**ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO**

HUWC/UFC Comitê de Ética em Pesquisa Cód CEP- 047.06.09
--



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 047.06.09

Pesquisadora Responsável: Silvia Helena Barem Habenhorst

Departamento / Serviço:

Título do Projeto: “Polimorfismos de interleucinas e enzimas do sistema de reparo do câncer gástrico: associação com *Helicobacter pylori*”

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou na sessão do dia 07/07/09 o projeto de pesquisa: “**Polimorfismos de interleucinas e enzimas do sistema de reparo do câncer gástrico: associação com *Helicobacter pylori***”, tendo como pesquisadora responsável Silvia Helena Barem Habenhorst.

Baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), o Comitê de Ética resolve classificar o referido projeto como: **APROVADO.**

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 07/07/10).

Fortaleza, 07 de julho de 2009.

Dra. Mônica Cardoso Façanha
Coordenadora do CEP-HUWC

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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: _____