



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

**MAÍRA SILVA DE MORAIS**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES DE ENZIMAS DE  
REPARO DO DNA E A PROGRESSÃO DO CÂNCER GÁSTRICO**

**Fortaleza**

**2016**

MAÍRA SILVA DE MORAIS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES DE ENZIMAS DE  
REPARO E A PROGRESSÃO DO CÂNCER GÁSTRICO**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas do departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvia Helena Baren Rabenhorst

FORTALEZA

2016

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

---

M826a Morais, Maíra Silva de.

Associação entre polimorfismos em genes de enzimas de reparo do DNA e a progressão do câncer gástrico. / Maíra Silva de Morais. – 2016.

62 f. : il.; color.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Silvia Helena Baren Rabenhorst.

1. Câncer. 2. Reparo do DNA. 3. Gastrite. I. Título.

---

CDD 570

MAÍRA SILVA DE MORAIS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES DE ENZIMAS DE  
REPARO DO DNA E A PROGRESSÃO DO CÂNCER GÁSTRICO**

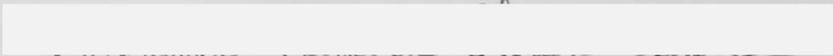
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas do departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 19 / 02 / 2016 .

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
**Profª. Drª. Silvia Helena BarenRabenhorst (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes**  
**Instituto do Câncer do Ceará – ICC**

  
\_\_\_\_\_  
**Ma. Morgana Maria de Oliveira Barbosa**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi o que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Marília e Pedro Ângelo, por me tornarem capaz de enfrentar novos desafios e todas as etapas dessa fase tendo vocês como exemplo. Nossa cumplicidade foi essencial em todos os momentos dessa jornada.

Ao Levi, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido mais viva. De quem eu mais cobrei apoio e atenção, mas que sei que estas foram coisas que jamais me faltaram. E porque é ele que divide comigo os planos e sonhos para o futuro.

À professora Silvia Helena Baren Rabenhorst, que acreditou e investiu em mim, mesmo quando eu tinha dúvidas sobre o que eu tinha de bom. Pelo seu espírito inovador e empreendedor na tarefa de multiplicar seus conhecimentos, pelas diversas oportunidades e pela sua disciplina e dedicação nos ensinando, acima de tudo a importância do trabalho em grupo.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições, e por dividirem comigo este momento tão importante e esperado.

Às minha amigas Morgana e Iacelle que entraram na minha vida como uma brisa leve carregando o que há de melhor nos sentimentos de amizade e companheirismo, assim como seus ensinamentos, ajudando a me tornar uma pessoa melhor.

Aos amigos Victor Gentil, Georgia Lucia, Murillo Ribeiro, Linda Kátia e Tiago Feijão, pelo companheirismo e compreensão nos momentos em que meus deveres estavam acima da nossa vontade de estar juntos.

Meu muito obrigada aos amigos do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, Luna, Aline, Débora, Eliane, Manu, Paulo, Valber, Ivna, Priscila, Fabiane e Helder, pela maravilhosa companhia do dia-a-dia, pelos ensinamentos, brincadeiras, passeios e cafés.

Em geral, a todos vocês que de uma forma ou outra estiveram ao meu lado durante estes anos de caminhada, muito obrigada.

## RESUMO

As lesões gástricas (LG) se desenvolvem a partir da mucosa normal infectada cronicamente por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e podem progredir para o câncer gástrico (CG) através de um processo com múltiplas etapas. A infecção por *H. pylori* pode causar respostas inflamatórias diferenciadas, podendo resultar em acúmulo de espécies reativas do oxigênio (ROS), cuja instabilidade causa danos oxidativos no DNA. A integridade genômica é garantida por enzimas de reparo importantes como: *XRCC-1* e *MLH1*. Porém, polimorfismos nestes genes podem influenciar a capacidade de reparo e a susceptibilidade individual do hospedeiro ao desenvolvimento do câncer gástrico associada. Assim, este estudo objetiva verificar a associação entre os polimorfismos de enzimas de reparo de *XRCC-1* G28152A e *MLH1* -93 G → A, as LG e sua progressão para o CG. Neste estudo foi obtido DNA de 369 pacientes, sendo 152 de CG e 217 com LG não-neoplásicas (LG), coletadas em quatro hospitais de Fortaleza-CE. A identificação dos polimorfismos foi feita por PCR-RFLP. Em 99% dos casos foi possível determinar os genótipos estudados. Neste estudo, foi verificado que o genótipo heterozigoto polimórfico de *XRCC-1* G28152A, conferiu risco para o desenvolvimento de CG. Por outro lado, análises estratificadas comparando Gastrite Crônica Inativa com as demais lesões mostraram que os portadores do genótipo homozigoto polimórfico *XRCC-1* 28152AA foram associados a uma proteção para a gastrite crônica ativa e o alelo polimórfico *XRCC-1* (A) foi associado a uma diminuição para a incidência dos tumores na região não cardíaca. Adicionalmente quando a metaplasia foi comparada aos subtipos histológicos de CG foi observado uma proteção para o desenvolvimento do subtipo intestinal associado aos pacientes portadores do genótipo homozigoto polimórfico de *MLH1* (AA). Os dados demonstraram que polimorfismos nas enzimas de reparo podem interferir com a eficiência do processo de reparo, mas diferem quando modificado o perfil das análises. Os achados desse estudo contribuem com o futuro estabelecimento de um perfil genotípico envolvido na progressão do CG.

**Palavras Chave:** Polimorfismos, Enzimas de Reparo, Câncer.

## ABSTRACT

Gastric lesions (LG) extends from normal mucosa infected with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and can progress to gastric cancer (GC) using a multi-step process. The *H. pylori* infection can cause different inflammatory responses and may result in accumulation of reactive oxygen species (ROS), whose instability causes oxidative DNA damage. The genomic integrity is guaranteed by major repair enzymes as *XRCC-1* and *MLH1*. However, polymorphisms in these genes may influence the ability to repair and individual susceptibility of the host associated with the development of gastric cancer. Thus, this study aimed to investigate the association between polymorphisms of *XRCC-1* G28152A and *MLH1* -93 G>A repair enzymes, the LG and its progression to the CG. This study was obtained DNA from 369 patients, 152 CG and 217 with pre-malignant LG (LG), collected in four hospitals in Fortaleza-CE. The identification of the polymorphism was performed by PCR-RFLP. In 99% of cases it was possible to determine the genotypes. In this study it was found that the polymorphic homozygote genotype *XRCC-1* G28152A, gave risk for the development of GC. On the other hand, stratified analyzes comparing GCI with other lesions showed that carriers the homozygous genotype polymorphic *XRCC-1* 28152AA were associated with protection for the active chronic gastritis and polymorphic allele *XRCC-1* (A), a decrease for incidence of tumors in the region not cardia. Additionally when the metaplasia was compared to histological subtypes of CG was observed a protection for the development of the intestinal subtype associated with patients polymorphic homozygous genotype of *MLH1* (AA). The data showed that polymorphisms in repair enzymes can interfere with the healing process efficiency, but differ when the modified profile analysis. Our findings contribute to the future establishment of a genotypic profile involved in the progression of CG.

**Keywords:** Polymorphism, Repair Enzymes, Cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fontes e exemplos de dano ao DNA.....	15
Figura 2 – Esquema dos danos ao DNA, suas vias de reparo e os fatores envolvidos nessas vias.....	17
Figura 3 – Etapas da via de reparo por excisão de bases (BER).....	18
Figura 4 – Etapas da via de reparo de bases mal pareadas (MMR).....	20
Figura 5 - Sítios anatômicos do estômago.....	23
Figura 6 - Esquema do modelo de carcinogênese gástrica sugerido por Correa.....	25
Figura 7 - Estimativa de novos casos de câncer nas regiões brasileiras em 2016.....	26
Figura 8 - Exemplos de fragmentos de restrição em géis de poliacrilamida.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers e enzimas de restrição das PCR’s para os genes das enzimas de reparo.....	29
Tabela 2 – Distribuição dos casos de LG e CG quanto à idade e sexo.....	31
Tabela 3 – Distribuição dos casos de LG e CG quanto à idade e sexo, nos diferentes tipos de lesões.....	32
Tabela 4 – Distribuição dos polimorfismos de <i>XRCC-1</i> G28152A e <i>MLH1</i> -93G>A nas lesões gástricas.....	33
Tabela 5 - Associação entre diferentes tipos de lesões gástricas (LG) e os genótipos das enzimas <i>XRCC-1</i> G28152A e <i>MLH1</i> -93G>A.....	34
Tabela 6 - Associação entre gastrite crônica inativa (GCI) e CG na região não-cárdia, e os genótipos das enzimas <i>XRCC-1</i> G28152A e <i>MLH1</i> -93G>A.....	35
Tabela 7 - Associação entre metaplasia (M) e os subtipos histológicos de CG, quanto aos genótipos das enzimas <i>XRCC-1</i> G28152A e <i>MLH1</i> -93G>A.....	36
Tabela 8 - Associação entre os subtipos histológicos, as regiões anatômicas de CG, quanto aos genótipos das enzimas <i>XRCC-1</i> G28152A e <i>MLH1</i> -93G>A.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Adenina

AP – Apurinico/Apirimidinico

*APE-1* – “Endonuclease Apurinica/Apirimidinica 1”

Arg – Aminoácido Arginina

*ATM* – “*Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase*”

BER – Reparo por excisão de bases

BSA – Albumina Bovina Sérica

*BRCA2* – “*Breast Cancer 2*”

*cagA* – “*Cytotoxin-Associated Gene A*”

*cagE* - “*Cytotoxin-Associated Gene E*”

*CHK2* – Ponto de Verificação Quinase 2

CPD - Dímeros de ciclobutano-pirimidina

CTAB - Brometo de Cetil-Trimetilamônio

DEPC - Dietilpirocarbonato

DE-USA – Denver, Estados Unidos da América

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxinucleotídeos tri-fosfato

DSB – Quebra de Fita Dupla

*E. Coli* – *Echerichia Coli*

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

*FEN1* – Endonuclease Flap 1”

G - Guanina

Gln – Aminoácido Glutamina

*H. pylori* – *Helicobacter pylori*

HR – Reparo por Recombinação Homóloga

KCl – Cloreto de Potássio

Ku 70 – Proteína KU 70

Ku 80 - Proteína KU 80

M - Molar

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

*MLH1* – “*mutL homolog 1*”

*MLH3* - “*mutL homolog 3*”

mL - Mililitro

mM - Milimolar

MMR – Reparo de Bases Mal Pareadas

*MRE 11* – “*Meiotic Recombination 11*”

MRN – Complexo de proteínas consistindo MRE 11, RAD 50 e NBS 1

*MSH2* – “*mutS homolog 2*”

*MSH6* – “*mutS homolog 6*”

*MSH3* – “*mutS homolog 3*”

*MutS* – “*MutatorS*”

*MutL* – “*MutatorL*”

NaCl - Cloreto de Sódio

*NBS 1* – “*Nijmegen Breakage Syndrome 1*”

NCBI – Centro Nacional de Informação e Biotecnologia

NER – Reparo por excisão de nucleotídeos

ng - Nanograma

NHR – Reparo por Recombinação não homologa

*PARP* - Enzima Poli (ADP-Ribose) Polimerase-1

pb – Pares de Bases

PCR-RFL – Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo no comprimento de fragmentos

pH - Potencial Hidrogeniônico

*PMS2* – “*Post-Meiotic Segregation Increased 1*”

*p53* – Proteína Tumoral 53

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SSB – Quebra de Fita Simples

*RAD 51* – “*Radiation sensitive 51*”

*RAD 50* - “*Radiation sensitive 50*”

RNA – Ácido Ribonucleico

*RPA* – “Proteína de Replicação A”

RPM - Rotações por Minuto

Taq- *Thermus aquaticus*

Tris-HCl - Tris-(Hidroximetil)aminometano hidrocloreto

U - Unidades

UV - Ultravioleta

*vacA* – “*Vacuolating Cytotoxin A*”

*XRCC-3* - “*X-ray repair Complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*”

*XRCC-1* - “*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*”

6-4PP – 6-4-Fosfoprodutos

μM – Micromolar

μL – Microlitro

® - Marca Registrada

# SUMÁRIO

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Danos ao DNA .....	14
1.2 Sistemas de reparo ao DNA.....	15
1.3 Polimorfismos.....	21
1.4 Lesões gástricas.....	22
1.5 Epidemiologia do câncer gástrico .....	25
1.6 Pergunta de Partida.....	26
1.7 Hipótese .....	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
2.1 População de estudo.....	27
2.2 Extração do DNA .....	27
2.2 Detecção dos Polimorfismos.....	28
2.3 Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS .....	31
3.1 População de Estudo.....	31
3.2 Comparação dos polimorfismos XRCC-1 G28152A e MLH1 -93G>A, entre LGs e CGs .....	33
-93G>A.....	36
4. DISCUSSÃO .....	38
5. CONCLUSÃO .....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS .....	51
<b>Anexo I - Parecer do Comitê de Ética –Câncer Gástrico .....</b>	<b>51</b>
<b>Anexo II - Parecer do Comitê de Ética – LG Pré-Neplásticas .....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Amostras de Câncer Gástrico ..</b>	<b>53</b>
<b>Anexo IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Amostras de LG Pré-Neplásticas</b>	<b>55</b>
<b>Anexo V - Questionário de coleta de dados – Amostras de CG .....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo VI - Questionário de coleta de dados – Amostras de LG Pré-Neplásticas .....</b>	<b>58</b>
APÊNDICES .....	60
<b>Apêndice A - Tabela de associações dos casos de Lesões Gástricas Não Malignas .....</b>	<b>60</b>
<b>Apêndice B - Tabela de associações entre os subtipos de Câncer Gástricos e GCI .....</b>	<b>61</b>

<b>Apêndice C - Tabela de associações entre sítios de localização dos tumores gástricos e GCI</b>	<b>62</b>
<b>Apêndice D - Tabela de associações entre os subtipos histológicos de CG e a Metaplasia.</b>	<b>63</b>
<b>Apêndice E - Tabela de associações entre os subtipos histológicos de CG e a Metaplasia .</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Danos ao DNA

A transmissão da informação genética e manutenção da integridade do material genômico são dois fatores fundamentais para a sobrevivência dos organismos e perpetuação das espécies (ZHOU; ELLEDGE, 2000). O principal objetivo de cada forma de vida existente é entregar seu material genético intacto e inalterado, para a próxima geração. Isso deve ser alcançado apesar do constante ataque, de diferentes fontes, sobre a molécula de DNA. Todos os dias cada célula do corpo humano recebe dezenas de milhares de lesões (JACKSON; BARTEK, 2009). De radiação UV, produtos químicos genotóxicos, e radiação ionizante, à subprodutos do metabolismo celular, tais como espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, as nossas células estão sendo constantemente agredidas por potenciais agentes mutagênicos (CHOUDHARY, *et al*, 2009).

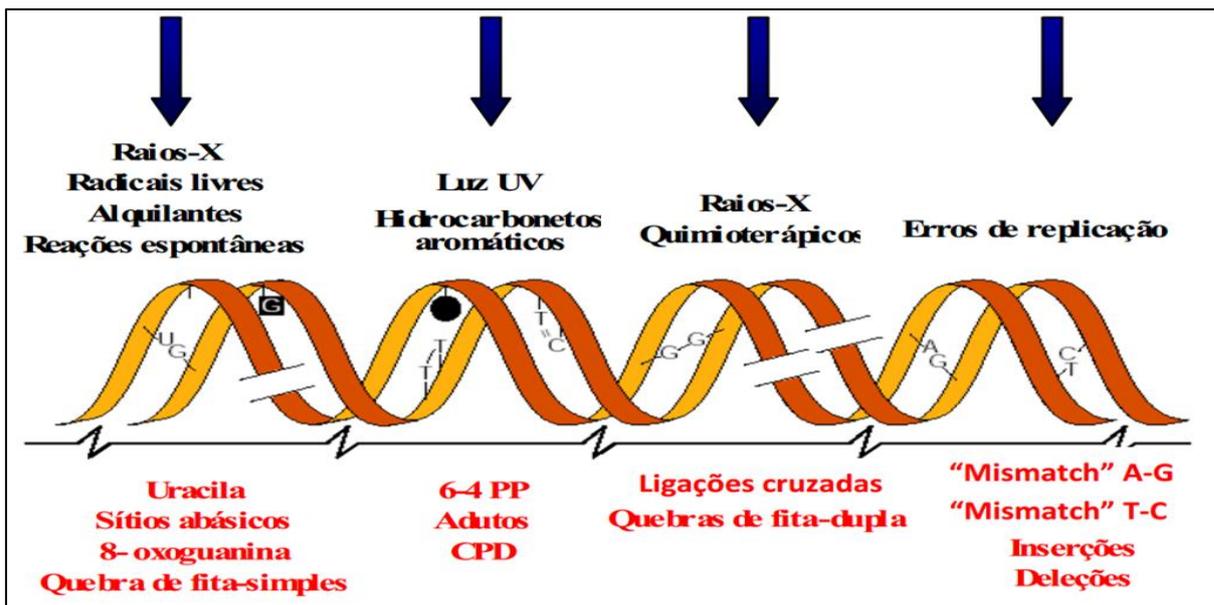
Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são produzidas como subprodutos da respiração oxidativa ou por meio de eventos do ciclo redox envolvendo agentes tóxicos ambientais e reações Fenton mediadas por metais pesados (VALKO *et al*, 2006). Além disso, estas espécies reativas são produzidas por macrófagos e neutrófilos em locais de inflamação e infecções (KAWANISHI *et al*, 2006). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. O oxigênio é metabolizado dentro das células através de uma série de reduções de um elétron, com a produção de intermediários reativos e potencialmente danosos chamados de espécies reativas de oxigênio (EROS) (LU *et al*, 2001). O organismo humano sofre ação constante dessas espécies reativas de oxigênio. As EROS são geradas em níveis normais endogenamente em diversas condições fisiológicas, como 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 seu excesso apresenta efeitos prejudiciais. Estas promovem uma série de reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas incluindo o DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As lesões ao DNA causados pela EROS incluem a formação de adutos, que prejudicam o emparelhamento de bases e/ou bloqueiam a replicação e transcrição do DNA, podem ocasionar a perda de bases e quebra de fita simples da cadeia de DNA (“*Single-Strand-Breaks*” - SSB). Algumas irregularidades na molécula de DNA surgem através de processos fisiológicos, como o mal pareamento de bases ocasionalmente introduzidas durante

a replicação do DNA (JACKSON; BARTEK, 2009). Sequências de repetição simples parecem ser particularmente propensas a erros de incorporação incorrecta pela polimerase (MARTÍN-LÓPEZ; FISHEL, 2013). Uma variedade de lesões também resulta em distorções significativas na dupla-hélice da molécula de DNA. Dentre os chamados “bulkys” de ligações cruzadas entre bases, podemos destacar as CPDs e 6-4PPs, principais lesões induzidas por luz UV. Lesões do tipo 6-4PPs resultam em distorções mais severas no DNA em relação a CPDs (PEARLMAN; PIRKLE; KIM 1985) (Figura 1).

Essas lesões podem bloquear a replicação e transcrição genômica, e podem levar a mutações caso não sejam reparadas ou sejam reparadas inadequadamente. Dependendo da extensão do dano, a célula pode reparar o erro ou não. Caso não repare, a célula pode seguir uma via apoptótica ou mutagênica. (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Figura 1: Fontes e exemplos de dano ao DNA.



Traduzida de HOIJMAKERS, 2011

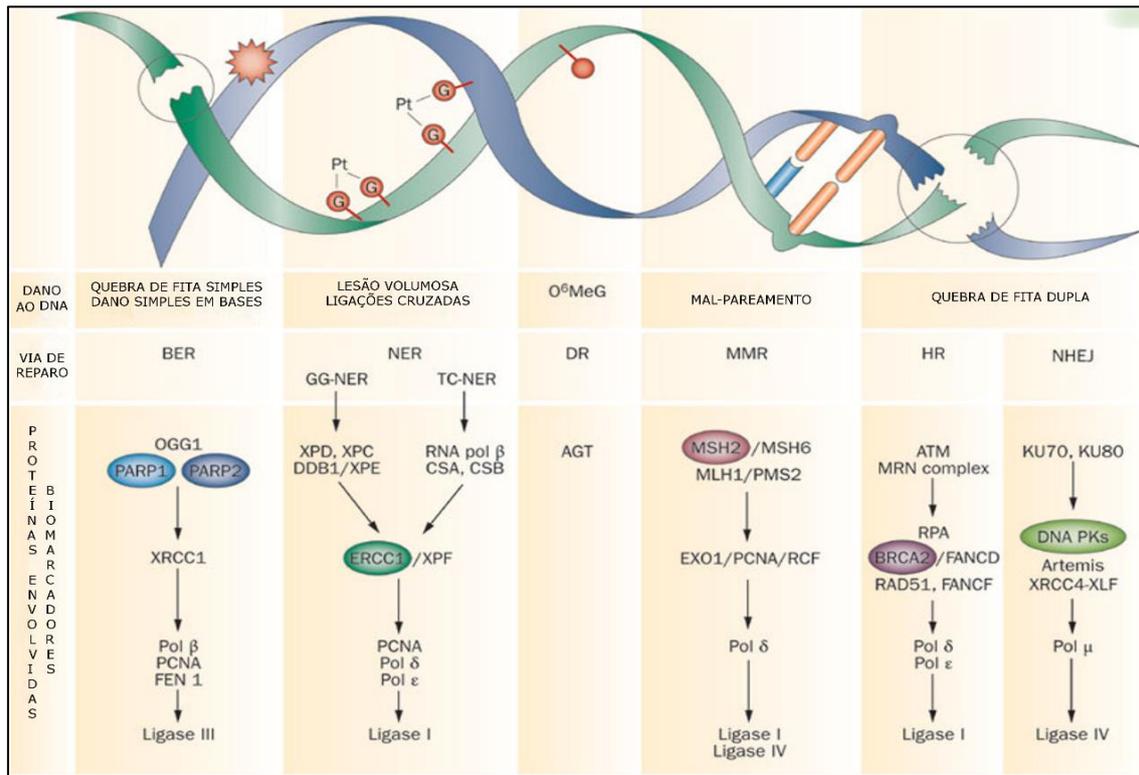
## 1.2 Sistemas de reparo ao DNA

Os mecanismos de reparo de DNA são processos fundamentais na proteção das células contra danos, assegurando a transmissão fiel das informações genéticas de geração para geração (FRIEDBERG *et al*, 2006). Trata-se de um conjunto de reações da célula para assegurar a estabilidade genômica. Em contrapartida a instabilidade genômica é compreendida como um estado do genoma no qual ocorre um aumento na extensão de danos ao DNA. Isso pode ser resultado de aumento nas taxas de dano induzido ao DNA, ao reparo

aberrante ou a ambos. A célula frente ao dano corrige o erro (sistemas de reparo) ou induz a apoptose caso o erro não seja reparado (PAWLOWSKA; BLASIAK, 2015).

Para combater estas ameaças, vários sistemas evoluíram para detectar danos no DNA, sinalizar a sua presença e mediar a sua reparação. Tais respostas, que têm impacto sobre uma ampla gama de eventos celulares, são biologicamente significativas, pois evitam diversas doenças humanas. Há uma variedade de vias para o reparo dessas lesões infligidas ao DNA. Os componentes envolvidos nas decisões de qual via tomar irão variar de acordo com a maneira em que o genoma tenha sido danificado, a quem pertence e a sua estabilidade global. De maneira geral, os danos ao DNA resultantes da exposição a agentes tóxicos podem ser corrigidos por enzimas codificadas por uma ou mais vias de reparo do DNA trabalhando de maneira integrada (BERRA; MENCK, 2006). Existem cinco principais vias de reparo, incluindo o reparo por excisão de bases (BER – “*Base Excision Repair*”), reparo por excisão de nucleotídeos (NER – “*Nucleotide Excision Repair*”), reparo de bases mal pareadas e reparo por recombinação homóloga (HR) e recombinação não-homóloga (NHR) (LU *et al*, 2001) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema dos danos ao DNA, suas vias de reparo e os fatores envolvidos nessas vias.

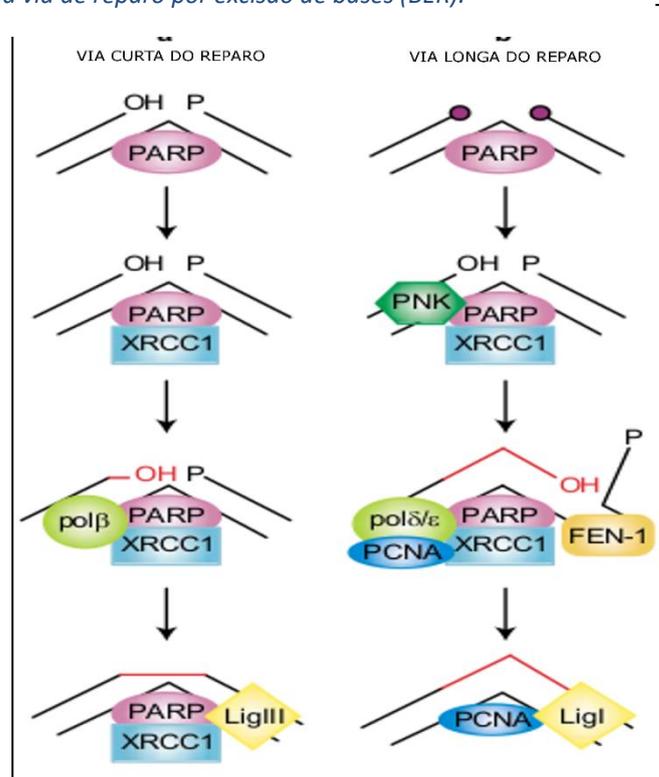


Fonte: Traduzida de Postel-Vinay, 2012.

O mecanismo molecular do BER inicia-se pelo reconhecimento e excisão de bases danificadas pelas DNA glicosilases sem ou com atividade 3'-AP liase associada (LINDHAL; WOOD, 1999). Cada glicosilase é específica para um número limitado de bases modificadas. A excisão da base resulta num sítio Apurinico/Apirimidico (AP), que é reconhecido por outro grupo de enzimas, as AP-endonucleases (*APE-1*), que fazem a incisão na extremidade 3' ou 5' do sítio AP, gerando uma lacuna. Esta é preenchida através de polimerização e ligação de novos nucleotídeos a sequência de DNA (SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003). A polimerização pode ser completada por duas vias: a via curta ("Short-Patch Repair"), que remove apenas um nucleotídeo. Esta via utiliza poucos fatores, como a polimerase β e DNA ligase III estimulada pela *XRCC-1* ("X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1"). Já a via longa ("Long Patch Repair") remove de 2-8 nucleotídeos, e requer uma série de fatores que também estão envolvidos em replicação, como a DNA polimerase δ ou ε (aparentemente estimuladas pela β), FEN1, DNA ligase I e provavelmente RPA. O gene *XRCC-1* é responsável por uma proteína esqueleto que se associa diretamente com outras proteínas, tais como DNA-polimerase-β, *PARP* (ADP-ribose polimerase) e a DNA-ligase III num complexo, para facilitar os processos de reparo por excisão de bases (BER) ou reparo de quebra de cadeia simples. A proteína *XRCC-1* pode se ligar diretamente tanto a fita de DNA

cortada, quanto à fita com uma fenda e associada à DNA-polimerase- $\beta$ , sugerindo que esta proteína possa estar independentemente envolvida com o reconhecimento do dano ao DNA (SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003) (Figura 3).

Figura 3 - Etapas da via de reparo por excisão de bases (BER).



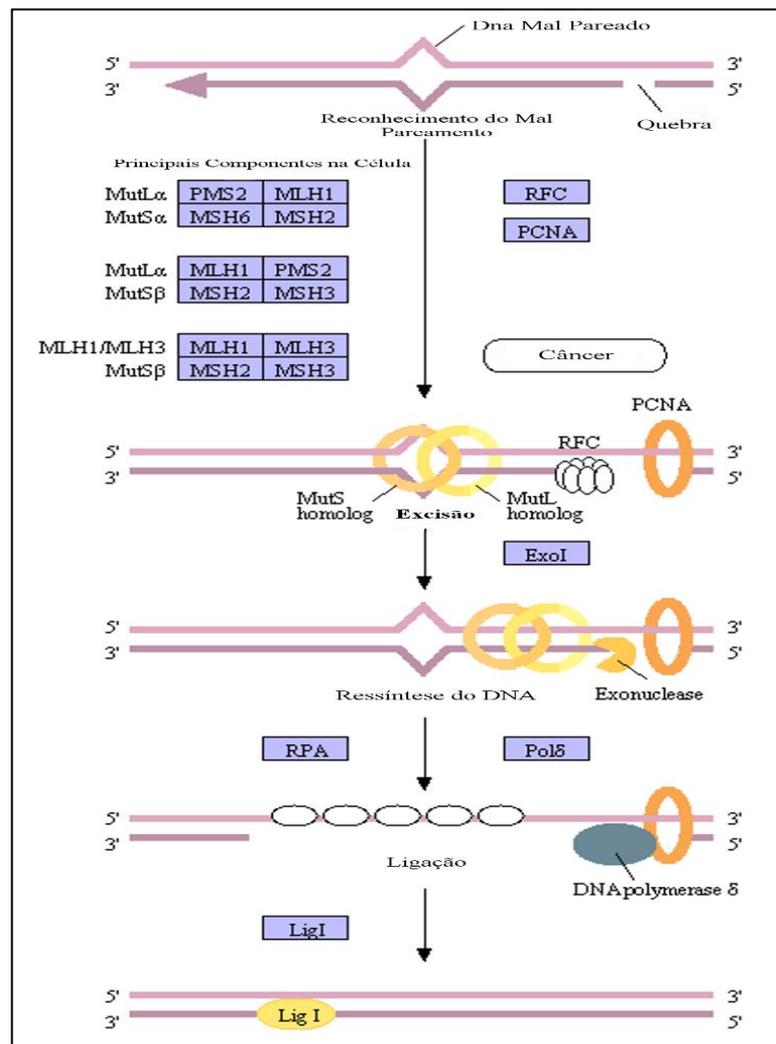
Fonte: Traduzida de Curtin, 2005

Além disso, quando dois SSBs surgem muito próximos, ou quando o aparto de replicação do DNA encontra um SSB ou determinadas outras lesões, as quebras de cadeias duplas (“*Double-Strand-Breaks*” - *DSBs*) são formadas. Embora *DSBs* não ocorram tão freqüentemente quanto as outras lesões acima citadas, elas são difíceis de reparar e extremamente tóxicas (KHANNA; JACKSON, 2001). Dois mecanismos principais podem ser citados para o reparo dessas *DSB*: recombinação homóloga (HR) e recombinação não homóloga (NHR). O reparo por recombinação homóloga (HR) é equipado para manter a fidelidade na sequência da molécula de DNA. Já o reparo por recombinação não-homóloga é propenso a erros e pode atuar em qualquer fase do ciclo celular (JACKSON; BARTEK, 2009). Esse processo pode levar a perda da sequência de DNA. Por outro lado, a imprecisão de NHR na abertura das estruturas em hairpin do DNA contribui para a diversidade do sistema imunológico (SOULAS-SPRAUEL *et al*, 2007).

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (“*Nucleotide Excision Repair*” - NER) é considerado um dos mais versáteis e flexíveis por reparar lesões do tipo CPD e 6-4PP, que causam distorções na dupla hélice do DNA. Lesões do tipo 6-4PP apresentam uma taxa de reconhecimento e incisão pela via NER superior ao observado para CPD, sugerindo assim que, dependendo do grau de distorção na molécula de DNA, os danos são reconhecidos e reparados de modo mais eficiente (CHANDRASEKHAR; VAN HOUTEN, 2000). Pode-se resumir esta via em 5 passos: reconhecimento do dano, incisão, excisão, síntese de reparação e ligação.(NOUSPIKEL, 2009). Além disso, NER pode trabalhar em conjunto com a transcrição. Transcrição acoplada ao reparo assegura que, cadeias contendo genes ativos são reparadas com uma prioridade mais elevada do que o resto do genoma, provavelmente devido a RNA polimerase II, que atua como um sensor de danos (DEACONESCU; ARTSIMOVITCH; GRIGORIEFF, 2012).

No reparo do dano de bases mal pareadas (“*Mismatch Repair*” - MMR), a detecção do dano e de loops de inserção/deleção desencadeia uma incisão de fita simples na molécula de DNA, e então se tornam alvo de enzimas nuclease, polimerase e ligase que irão reparar o erro (JACKSON; BARTEK, 2009). Essa via é responsável, principalmente, pela eliminação de erros de bases mal pareadas e de alças inserção-deleção que surgem como consequência do deslizamento da DNA polimerase durante a replicação (JIRICNY; NYSTRÖM-LAHTI, 2000). O sistema MMR é composto por dois complexos de proteínas: o MutS e o MutL. A operação desse sistema requer que o complexo de proteínas MutL, que compreende as proteínas *MLH1* (*mutL homolog 1*), *PMS1* (*postmeiotic increased segregation 1*), *PMS2* (*postmeiotic segregation Increased 2*) e *MLH3* (*mutL homolog 3*), se ligue à MutSa ou à MutSβ. Estas últimas, fazem parte do complexo MutS, e correspondem à *MSH2* (*mutS homolog 2*) e *MSH6* (*mutS homolog 6*), e *MSH2* e *MSH3* (*mutS homolog 3*), respectivamente (KOLODNER; MARSISCHKY, 1999). O gene humano homólogo ao gene *mutL* de *E. coli*, *MLH1* (MutL homolog1), produz uma das enzimas envolvida no reparo de erro de pareamento (mismatch repair MMR) onde juntamente com outras proteínas reconhece lesões no DNA sendo responsável pelo recrutamento de proteínas necessárias para a excisão e o reparo. O gene de *MLH1* está localizado na posição 3p22.2. (Figura 4).

Figura 4 - Etapas da via de reparo de bases mal pareadas (MMR)



Fonte: Adaptado de Kanehisa Laboratories

Se o produto dessas vias falha em reparar o dano devido a alguma deficiência funcional, a célula acumula uma quantidade excessiva de danos. Os danos não reparados podem levar a mutações, incluindo alterações cromossômicas que, por sua vez, podem alterar as sinalizações para apoptose, desregular o crescimento celular e induzir a carcinogênese (CHRISTMANN *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos indicam que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), de uma variedade de genes relacionados ao reparo do DNA, estão associados com o risco do desenvolvimento de diferentes tipos de tumores (GOODE; ULRICH; POTTER, 2002).

### 1.3 Polimorfismos

Polimorfismos genéticos são variações 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-sinônimas (quando um aminoácido é alterado) (HUNT *et al.*, 2009). Ao comparar duas sequências de DNA, essa sequência sendo uma combinação linear de quatro nucleótidos, posição por posição, onde quer que você se depare com diferentes nucleotídeos na mesma posição, isso é um SNP. Acredita-se que SNPs reflitam mutações passadas que eram em sua maioria (mas não exclusivamente) eventos únicos, e dois indivíduos que compartilham de um alelo variante são, assim, marcados com uma herança evolutiva comum. Em outras palavras, nossos genes têm ancestrais, e análise de padrões comuns de variação de SNP pode identificá-los. Eles fornecem uma rica fonte de informações sobre a história evolutiva das populações humanas (STONEKING, 2001).

Muitos genes de reparo do DNA carregam polimorfismos e estudos de associação genética sobre o risco de câncer têm-se centrado na identificação de efeitos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nesses genes com o desenvolvimento de diversos tipos de tumores (LI *et al.*, 2011). Pelo menos 125 variantes de substituição de nucleotídeos em 37 genes de reparo do DNA foram identificados em humanos, incluindo genes do BER, NER, HR e MMR (SMITH *et al.*, 2003). Esses polimorfismos alteram as funções das proteínas, por eles codificadas, e alteram a capacidade de reparação do DNA. Apesar dos esforços, informações neste âmbito ainda são escassas (CAPELLÁ *et al.*, 2008, QIAN *et al.*, 2011).

Polimorfismos de *MLH1* podem ter um efeito sobre a capacidade de reparação do DNA e, por conseguinte, o risco de câncer, especialmente a substituição G>A da região promotora -93 (DOMINGO *et al.*, 2005). Esse polimorfismo parece ter potencial de afetar a regulação da expressão gênica, alterando dessa forma a eficiência do reparo da via MMR. Ele tem sido relatado com um risco aumentado de câncer colorretal, associada a alta instabilidade de microssatélite (MSI) (RAPTIS *et al.*, 2007). O genótipo homocigoto polimórfico tem sido relacionado a um risco três vezes maior de câncer colorretal com imunohistoquímica negativa para *MLH1* (ALLAN *et al.*, 2008), bem como foi demonstrado que esse genótipo está associado com o fenótipo metilado de *MLH1* (CHEN *et al.*, 2007)

Um dos polimorfismos, encontrados mais frequentemente em sítios conservados de *XRCCI*, leva a uma substituição G → A no codon 399 do exon 10 do gene, levando a alteração de um aminoácido arginina (Arg) por uma Glutamina (Gln). O alelo 399Gln está localizado no lado ácido-carboxílico terminal da poliadenosina ribose-difosfato, domínio de interação da polimerase (WANG *et al*, 2003).

Os polimorfismos genéticos nos genes de reparo *XRCC-1* (G28152A) e *MLH1* (-93 G→A) já foram identificados, e estudos sugerem que esses polimorfismos podem estar associados com risco ao câncer (LI *et al*, 2011).

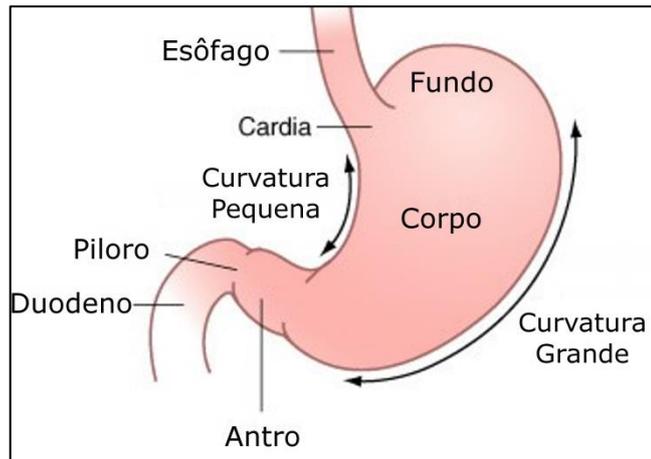
#### 1.4 Lesões gástricas

Por um longo período do século passado, acreditou-se que as gastrites e úlceras pépticas eram causadas por inúmeros fatores fisiológicos, sendo o mais importante deles a hipersecreção de ácido clorídrico pelas células oxínticas do estômago (BANASCH E SCHMITZ, 2007). Em 1983, Warren e Marshal desmistificaram a ideia de que apenas os fatores fisiológicos eram causadores destas doenças gástricas quando obtiveram um isolado de *Helicobacter pylori* do estômago humano em cultura. Marshal ingeriu uma suspensão desta cultura bacteriana e provou que o microrganismo isolado provocava gastrite.

As lesões gástricas podem estar localizadas em qualquer parte do estômago, que se divide em cinco regiões anatômicas: cárdia, porção cônica e estreita situada imediatamente após a união gastresofágica; fundo gástrico, região em forma de cúpula do estomago proximal que se estende no sentido superior lateral à região da cárdia; corpo gástrico, que compreende o restante do estômago proximal que vai até a incisura angular; antro gástrico; e região pré-pilórica, sendo separado deste pelo piloro (KUMAR; KUMAR; DIXIT, 2011) (Figura 5).

Denomina-se de gastrite a inflamação aguda ou crônica da mucosa gástrica. A fase aguda da gastrite é de curta duração e a resposta imune elimina a infecção, mas não a colonização de *H. pylori*. Desta forma, em algumas semanas, ocorre a produção gradual de células inflamatórias crônicas (ATHERTON *et al*, 1997), levando a gastrite aguda à progredir para uma gastrite crônica. A gastrite crônica é um processo de longa duração caracterizada pelo aumento de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria. Apresenta variações de intensidade dependendo do agente agressor e do desenvolvimento da resposta do hospedeiro ao dano podendo variar desde uma inflamação superficial até a atrofia da mucosa (DANI; PASSOS, 2011).

Figura 5 – Sítios anatômicos do estômago.



Fonte: <http://www.misodor.com/images/45FF1.jpg>

Com a progressão da injúria na mucosa e a conseqüente destruição das glândulas, a atrofia é estabelecida. Esta é a primeira alteração sugestiva de malignidade (KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014; CORREA, 1992). A perda de tecido glandular leva ao afinamento da mucosa provocando danos graves que podem apresentar erosão ou ulceração da mucosa com destruição da camada glandular (LAUWERS; SRIVASTAVA, 2007). A úlcera péptica é uma doença heterogênea com comprometimento de toda a espessura da mucosa e invasão da parede muscular (TARNAWSKI, 2005). Pacientes com úlcera gástrica tem um risco de 1,8 vezes mais chances de desenvolver câncer de estômago (HANSSON *et al.*, 1996).

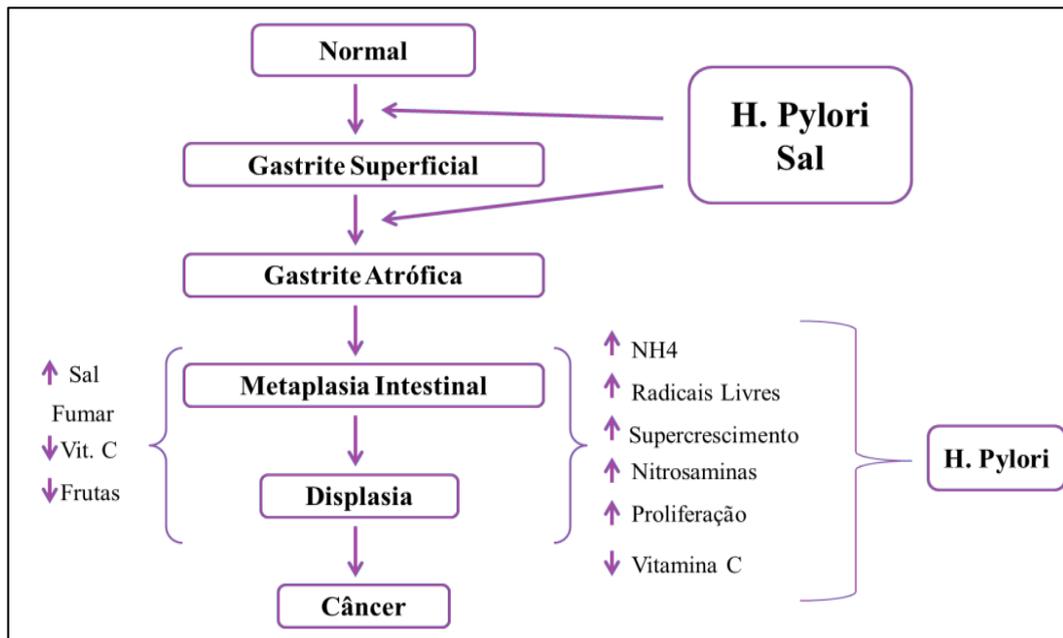
A metaplasia é uma alteração reversível onde um tipo celular diferenciado é substituído por outro tipo celular diferenciado e representa, muitas vezes, uma mudança indesejável pela possibilidade de induzir transformações malignas no epitélio metaplásico (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Na metaplasia intestinal há substituição do epitélio gástrico por epitélio intestinal em resposta a irritação persistente da mucosa provocada pela infecção por *H. pylori*. Esta lesão pode aumentar a suscetibilidade a carcinogênese gástrica em até 10 vezes, via seqüência: metaplasia - displasia - carcinoma (MARQUES-SILVA *et al.*, 2014). Numa seqüência bem definida da carcinogênese a displasia epitelial gástrica precede o desenvolvimento da maioria dos adenocarcinomas. A displasia epitelial gástrica é uma proliferação epitelial neoplásica caracterizada por variação na arquitetura celular e atipia. Essas alterações displásicas podem se tornar tão graves a ponto de constituírem um carcinoma *in situ* (LAUWERS; SRIVASTAVA, 2007).

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). Segundo a classificação histológica de Lauren essas neoplasias podem ser definidas em dois tipos distintos: o tipo intestinal (bem diferenciado) e o tipo difuso (pouco diferenciado). Esses exemplares histológicos diferem entre si com relação às características epidemiológicas e prognósticas (BORK; BARONE, 2007; ESPEJO; NAVARRETE, 2003; IARC, 2000).

O adenocarcinoma difuso compreende o tipo menos frequente e é caracterizado por apresentar pior prognóstico. Nesse tipo de tumor as células apresentam-se menos aderentes, que difusamente adentraram o estroma gástrico resultando em pequenos grupos ou mesmo em células tumorais solitárias, com pouca formação de glândulas e apresentando, algumas vezes, um vacúolo citoplasmático claro. Esse tipo de tumor acomete, principalmente, pessoas mais jovens, geralmente é hereditário e não se desenvolve em etapas. Isto compreende maior propagação intra e trans parietal e está associado com o mau prognóstico em comparação com o tipo intestinal (HAMILTON; MELTZER, 2006; HARTGRINK, *et al.*, 2009).

O tipo mais frequente dentre os adenocarcinomas compreende aos tumores do tipo intestinal. Em geral, estes se apresentam como estruturas de células malignas unidas que se assemelham a glândulas gastrointestinais funcionais. Essa formação apresenta células coesas formando estruturas tubulares, comumente acompanhadas por formação papilar ou componentes sólidos. Tumores intestinais se desenvolvem através de passos sequenciais que começa com gastrite, progride para gastrite atrófica e são seguidos por metaplasia intestinal, e finalmente câncer gástrico. Esse tipo de tumor cresce expansivamente, com alta vascularização e ocorre frequentemente em pessoas idosas. Estes tumores são fortemente influenciados pelo ambiente (WU, *et al.*, 2006; HAMILTON; MELTZER, 2006). O desenvolvimento e a progressão do câncer gástrico do subtipo intestinal 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 ao câncer gástrico do tipo intestinal (Figura 6).

Figura 6 - Esquema do modelo de carcinogênese gástrica sugerido por Correa.



Fonte: Adaptado de Correa, 1992

É bem estabelecida a associação da infecção por *Helicobacter pylori* e o estabelecimento do carcinoma gástrico. A infecção por essa bactéria desempenha um papel crítico na carcinogênese gástrica, na qual uma interação, a longo prazo, entre os fatores de virulência bacterianos e a resposta inflamatória do epitélio gástrico do hospedeiro culmina na acumulação de mutações e modificações epigenética que podem levar a neoplasia.

Uma vez instalada a infecção por *H. pylori*, as células epiteliais da mucosa gástrica geram a ativação de cascatas imunológicas e inflamatórias iniciadas pela resposta imune. Nessa resposta há predomínio da produção de anticorpos e de citocinas, contribuindo para o processo inflamatório. Fatores de virulência de *H. pylori* aumentam a inflamação da mucosa gástrica e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (ROBINSON; ARGENT; ATHERTON, 2007; LADEIRA *et al.*, 2003). No processo inflamatório, gerado em resposta à infecção, 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 (EROS), em resposta a produtos da parede celular bacteriana.

### 1.5 Epidemiologia do câncer gástrico

Os tumores gástricos compõem o quarto tipo de câncer mais frequente no mundo, sendo a segunda causa de morte por câncer em ambos os sexos (LIM *et al.*, 2014). A frequência destes tumores é duas vezes maior em homens que em mulheres (WEN; MOSS,

2009). 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 2016 é de 20 mil novos casos, sendo 12.920 homens e 7.600 mulheres acometidos. O Nordeste possui elevada prevalência dessa neoplasia, sendo o segundo entre os homens e o quinto entre as mulheres, especialmente o estado do Ceará, onde os tumores gástricos representam o terceiro tipo de câncer mais comum entre homens e mulheres (INCA, 2014).

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 e nos portadores de lesões gástricas de diferentes graus os polimorfismos que influenciam 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.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estimar o risco da presença dos polimorfismos *XRCC-1* (G28152A) e *MLH1* (-93G>A) considerando lesões gástricas de diferentes gravidades. Adicionalmente, verificar se a presença desses polimorfismos no câncer gástrico predispõe a um subtipo ou sítio anatômico do seu desenvolvimento.

### *1.6 Pergunta de Partida*

Os polimorfismos das enzimas de reparo *XRCC-1* (G28152A) e *MLH1* (-93G>A) podem ser marcadores de progressão das lesões gástricas?

### *1.7 Hipótese*

Que a presença do alelo ou genótipo polimórfico de *XRCC-1* (G28152A) e *MLH1* (-93G>A) pode influenciar no desenvolvimento e progressão das lesões gástricas

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 População de estudo

Um total de 369 amostras foram coletadas. Todos os indivíduos, após serem informados sobre a pesquisa, concordaram em participar dela, assinando espontaneamente o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anxos...) Amostras de 217 pacientes com sintomas dispépticos, submetidos a endoscopia em três hospitais de Fortaleza, Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), Hospital São José e Hospital Geral de Fortaleza (HGF), que tiveram algum tipo de lesão gástrica (LG) confirmada por um patologista, foram selecionadas. Amostras LG obedeceram ao seguinte critério de exclusão: caso a cirurgia gástrica ou duodenal tenha sido executada anteriormente ou se houvesse uso recente de medicamentos anti-inflamatórios e/ou antibióticos não esteróides. Dessas amostras, dois fragmentos foram obtidos das regiões do antro e do corpo, de acordo com a localização da lesão. Os dados histopatológicos tais como subtipos tumorais e região de localização do tumor foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários.

As 152 amostras restante, compreendem aos tumores gástricos obtidos a partir de pacientes submetidos a gastrectomia total ou parcial nos hospitais: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF), Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), Hospital Geral César Cals (HGCC) e Hospital Geral de Fortaleza (HGF). Os espécimes tumorais frescos foram coletados nos centros cirúrgicos dos respectivos hospitais, imediatamente após a gastrectomia, obedecendo às condições ideais de assepsia. 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  $-80^{\circ}\text{C}$ , 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.

### 2.2 Extração do DNA

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 ressuspenso 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 ressuspenso 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).

## 2.2 Detecção dos Polimorfismos

A presença de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) nos genes que codificam as enzimas de reparo, *MLH1* e *XRCC-1*, foram detectados por meio da análise do DNA genômico, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase PCR-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). Amostras distintas, sabidamente possuidoras dos sítios de clivagem para cada enzima de restrição específica, foram usadas como controle das reações de restrição enzimática. As reações para determinar a presença de polimorfismos nestes genes foram conduzidas no Laboratório de Genética Molecular – LABGEM da Universidade Federal do Ceará. Em cada uma das reações de PCR para as amostras de CG, foram utilizados na mistura o tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), pelo menos 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,6 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 0,3 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; e 100 ng de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25µL. O

produto do PCR foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

Os protocolos para as reações de PCR das amostras de LG sofreram uma pequena alteração. As reações para essas amostras foram realizadas segundo os protocolos a seguir para cada um dos genes A mistura da reação de PCR para amplificação do fragmento de 259pb do gene de *MLH1* para detecção do polimorfismo rs1800734 ocorreu em um volume de 20 µL utilizando Green MasterMix® (Promega, Madison, USA), de acordo com protocolo do fabricante com adição de 2µL de Tween 20 1%, 0.4µL de cada primer e 1 µL de amostra de DNA a uma concentração de 25ng e completando o volume com 6,2 µL de água de injeção. O mix seguiu para o termociclador onde foi submetido a variações de temperatura de acordo com o seguinte

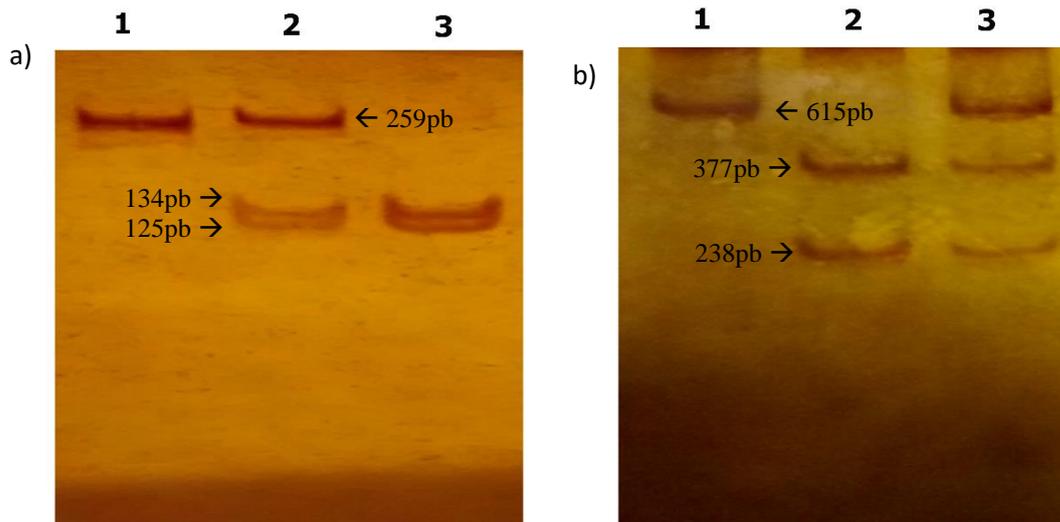
Tabela 1 - Primers e enzimas de restrição das PCR's para os genes das enzimas de reparo.

Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos Iniciadores	Enzima de Restrição	PCR (pb)	Referência
<i>MLH1</i> -93G>A	F 5'AGTAGCCGCTTCAGGGA3' R 5'CTCGTCCAGCCGCCGAATAA3'	<i>PvuIII</i>	259	Chen, <i>et al.</i> , 2005
<i>XRCC-1</i> G2	F 5'TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA3' R 5'TCCTCCAGCCTTTTCTGATA3'	<i>MspI</i>	615	Yin, <i>et al.</i> , 2009

Para o polimorfismo rs25487 de *XRCC-1* a reação de PCR ocorreu utilizando 8 µL de água com BSA, 10 µL de Green MasterMix® (Promega, Madison, USA), de acordo com protocolo do fabricante com adição de 0.5µL de cada primer e 1 µL de amostra de DNA a uma concentração de 25ng. O mix seguiu para o termociclador onde foi submetido a variações de temperatura de acordo com o seguinte programa: 94° durante 5 minutos para fase de desnaturação inicial da fita de DNA, seguida por 35 ciclos de 94° por 1 minuto, 54° por 1 minuto e 72° por 2 minutos, para então ocorrer a fase de extensão final a 72° por 5 minutos. Os produtos do PCR foram observados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com Brometo de Etídeo, para confirmação da amplificação e seguiram para o processo de restrição enzimática.

Em todos os casos, os produtos foram submetidos à digestão enzimática com 5U da endonuclease de restrição específica descrita na Tabela 1, acrescida do tampão sugerido pelo fabricante em um volume final de 20 $\mu$ L. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e posteriormente corados com nitrato de prata.

Figura 7 - Exemplos de fragmentos de restrição em géis de poliacrilamida



Legenda: Exemplos de fragmentos de restrição em géis de poliacrilamida: [a] *MLH1* -93G>A (1) Homozigoto Polimorfico, Heterozigoto (2) e (3) Homozigoto para o alelo variante; [b] *XRCC-1* G28152A (1) Produto de PCR e Homozigoto para o alelo variante, (2) Homozigoto Selvagem e (3) Heterozigoto.

### 2.3 Análise estatística

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<sup>®</sup> 2007 e Microsoft Office Word<sup>®</sup> 2007 (Microsoft<sup>®</sup>, USA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico EPINFO<sup>®</sup> versão 7.0 realizando-se o Teste do  $\chi^2$  e Teste Exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significantes, valores de  $p \leq 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 População de Estudo

Dentre os 215 casos de LG 41,2% (89/215) eram do sexo masculino e 59,8% (128/215) do sexo feminino, com razão de 1,43 mulheres para cada homem. A mediana de idade foi de 52 anos, variando de 8 a 88 anos de idade. A lesão mais frequente foi a gastrite crônica ativa (GCA) 57,3% (118/206), enquanto gastrite crônica inativa (GCI), úlcera e metaplasia contam com apenas 20,4%, 3,4% e 18,9% dos casos respectivamente. O grupo câncer gástrico contou com 152 pacientes, sendo 63,8% (97/152) homens e 36,2% (55/152) mulheres, com uma razão masculino/feminino estimada de 1,76:1. A mediana das idades foi 65 anos, variando entre 23 e 92 anos. O subtipo intestinal foi levemente mais frequente que o difuso com 54,1% (79/152) dos casos *versus* 45,9% (67/152) do subtipo difuso. Considerando o sítio anatômico, a região não-cárdica foi a mais frequente compreendendo 79,6% (121/152) quando comparado aos tumores localizados na região cárdica com 20,4% (31/152) dos casos. A análise desses dados mostrou risco para o desenvolvimento de CG em homens [ $p=0,00001$ ; O.R.=2,53 (1,65 – 3,88)] quando comparadas as LG (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos casos de LG e CG quanto à idade e sexo.

	LG n (%)		CG n (%)	O.R. (95% CI)	P
SEXO					
F	128 (59,8)	F	55 (36,2)	Ref	1
M	89 (41,2)	M	97 (63,8)	2,53 (1,65 – 3,88)	0,00001*
IDADE					
<52	114 (53)	<65	74 (48,7)	Ref	1
>52	102 (47)	>65	78 (51,3)	1,17 (0,77 – 1,78)	0,43

Quando o sexo foi comparado entre as lesões, tendo como referência a GCI, que é considerada a lesão mais leve, observou-se que os homens foram mais frequentes nas metaplasias [ $p=0,009$ ; O.R.=3,30 (1,32 – 8,28)] e no câncer gástrico intestinal [ $p=0,0008$ ; O.R.3,74 (1,70 – 8,24)].

Tabela 3 - Distribuição dos casos de LG e CG quanto à idade e sexo, nos diferentes tipos de lesões.

	<b>Gastrite Crônica Inativa</b> n (%)	<b>Gastrite Crônica Ativa</b> n (%)	<b>OR</b> <b>(95% CI)</b>	<b>p</b>	<b>Metaplasia</b> n (%)	<b>OR</b> <b>(95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>							
Mulheres	25 (59,5)	65 (55,1)	<i>Ref</i>	1	12 (30,7)	<i>Ref</i>	1
Homens	17 (40,5)	53 (44,9)	1,19 (0,58 - 2,45)	0,75	27 (69,3)	3,30 (1,32 - 8,28)	0,009*
<b>Idade</b>							
< 52	21 (30)	67 (56,7)	<i>Ref</i>	1	10 (26,3)	<i>Ref</i>	1
≥ 52	21 (70)	51 (43,3)	0,76 (0,37 - 1,54)	0,44	28 (73,7)	2,80 (1,09 - 7,18)	0,02*
Total	42	118			39		
	<b>Gastrite Crônica Inativa</b> n (%)	<b>Câncer Gástrico Intestinal</b> n (%)	<b>OR</b> <b>(95% CI)</b>	<b>p</b>	<b>Câncer Gástrico Difuso</b> n (%)	<b>OR</b> <b>(95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>							
Mulheres	25 (59,5)	22 (28,2)	<i>Ref</i>	1	29 (43,3)	<i>Ref</i>	1
Homens	17 (40,5)	56 (71,8)	3,74 (1,70- 8,24)	0,0008*	38 (56,7)	1,92 (0,88 - 4,21)	0,09
<b>Idade</b>							
<65	21 (50)	28 (35,9)	<i>Ref</i>	1	39 (58,2)	<i>Ref</i>	1
≥65	21 (50)	50 (64,1)	1,78 (0,83 - 3,82)	0,13	28 (41,8)	0,71 (0,33 - 1,55)	0,40
Total	42	78			67		

Para as análises de idade, o ponto de corte considerado foi calculado pela mediana das lesões e do câncer gástrico separadamente. Considerando esse ponto de corte foi observado que os pacientes com metaplasia eram significativamente mais frequentes nos indivíduos acima de 52 anos de idade [ $p=0.02$ ;  $O.R.=2,80$  (1,09 - 7, 18)].

Em 99% (215/217) dos casos de LG foi possível determinar os genótipos estudados, dois casos não amplificaram para ambos os polimorfismos estudados. Na distribuição genotípica de acordo com as lesões, o genótipo mais frequente foi o homocigoto selvagem para ambas as enzimas (Tabelas 3, 4 e 5). Análises não estratificadas dos polimorfismos entre as lesões gástricas mostrou somente associação significativa para *XRCC-1* G28152A, com risco para o desenvolvimento de CG [ $p=0,004$ ;  $O.R.$  2,29 (1,27 - 4,12)] (Tabela 3).

Tabela 4 - Distribuição dos polimorfismos de *XRCC-1* G28152A e *MLH1* -93G>A nas lesões gástricas

	LG n (%)	CG n (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)
<i>MLH1</i> -93G>A				
GG	103 (47,9)	74 (58,3)	1	Ref
GA	89 (41,4)	43 (33,8)	0,09	0,67 (0,41 – 1,07)
AA	23 (10,7)	10 (7,9)	0,21	0,60 (0,27 – 1,34)
Alelo G	192	117	1	Ref
Alelo A	112	53	0,21	0,77 (0,52 – 1,15)
Total	215	127		
<i>XRCC-1</i> G28152A				
GG	93 (43,2)	68 (54)	1	Ref
GA	25 (11,6)	42 (33,3)	0,004*	2,29 (1,27 – 4,12)
AA	33 (15,3)	16 (12,7)	0,23	0,66 (0,33 – 1,30)
Alelo G	118	110	1	Ref
Alelo A	58	58	0,75	1,07 (0,68 – 1,67)
Total	215	127		

Legendas: LG = Lesão Gástrica; CG = Câncer Gástrico

### 3.2 Comparação dos polimorfismos *XRCC-1* G28152A e *MLH1* -93G>A, entre LGs e CGs

Devido a natureza da lesão, a gastrite crônica inativa (GCI) foi considerada como a lesão mais branda, pois não apresenta infiltrado neutrofilico, e nesse estudo foi utilizada como referencia para as análises do risco da progressão das lesões incluindo o câncer gástrico. Este último também foi comparado com a metaplasia por esta se tratar de um dos estágios finais descrito na cascata de Correa como antecessora do CG Intestinal.

Nestas análises somente o polimorfismo de *XRCC-1* G28152A mostrou dados significativos. Pelas tabelas 4 e 5 observa-se que os portadores do genótipo homozigoto polimorfo *XRCC-1* (AA) foram associados a uma proteção para a gastrite crônica ativa [ $p=0.001$ ; O.R.=0,20 (0,07 – 0,57)] e o alelo polimorfo *XRCC-1* (A), uma diminuição para a incidência dos tumores na região não cardia. Apesar de não significativo, observa-se também uma tendência para o risco metaplasia, em portadores do genótipo variante de *MLH1* -93G>A (AA) [ $p=0.06$ ; O.R.= 5,03 (0,92 – 27,43)].

Tabela 5 - Associação entre diferentes tipos de lesões gástricas (LG) e os genótipos das enzimas XRCC-1 G28152A e MLH1 -93G&gt;A.

	<b>Gatrite Crônica Ativa n (%)</b>	<b>Gatrite Crônica Inativa n (%)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>	<b>Metaplasia n (%)</b>	<b>Gatrite Crônica Inativa n (%)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>
<i>MLH1</i> -93G>A								
GG	57 (49,1)	23 (54,7)	<i>Ref</i>	1,00	16 (41)	23 (54,7)	<i>Ref</i>	1,00
GA	48 (41,3)	17 (40,4)	1,13 (0,54 – 2,37)	0,72	16 (41)	17 (40,4)	1,35 (0,53 – 3,44)	0,52
AA	11 (9,4)	2 (4,7)	2,21 (0,45 – 10,80)	0,50	7 (18)	2 (4,7)	5,03 (0,92 – 27,43)	0,06
Alelo G	105 (90,51)	40 (95,2)	<i>Ref</i>	1,00	32 (82)	40 (95,2)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	59 (50,9)	19 (45,2)	1,18 (0,62 – 2,22)	0,60	23 (59)	19 (45,2)	1,51 (0,70 – 3,25)	0,28
Total	116	42			39	42		
<i>XRCC-1</i> G28152A								
GG	46 (39,6)	18 (42,8)	<i>Ref</i>	1,00	19 (48,7)	18 (42,8)	<i>Ref</i>	1,00
GA	55 (47,4)	16 (38,1)	1,34 (0,61 – 2,93)	0,58	13 (33,3)	16 (38,1)	0,76 (0,29 – 2,04)	0,59
AA	15 (13)	8 (19)	0,20 (0,07 – 0,57)	0,001**	7 (18)	8 (19)	0,8 (0,24 – 2,75)	0,75
Alelo G	101 (87)	34 (81)	<i>Ref</i>	1,00	32 (82)	34 (81)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	70 (60,4)	24 (57,1)	0,98 (0,53 – 1,79)	0,95	20 (51,3)	24 (57,1)	0,88 (0,41 – 1,90)	0,75
Total	116	42			39	42		

Tabela 6 - Associação entre gastrite crônica inativa (GCI) e CG na região não-cárdia, e os genótipos das enzimas XRCC-1 G28152A e MLH1 -93G>A.

	<b>Câncer Gástrico Não Cárdia n (%)</b>	<b>Gastrite Crônica Inativa n (%)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>
<i>MLH1</i>				
<i>-93G&gt;A</i>				
GG	60 (61,2)	23 (54,7)	<i>Ref</i>	1,00
GA	29 (29,6)	17 (40,4)	0,65 (0,30 – 1,40)	0,27
AA	9 (9,2)	2 (4,7)	1,72 (0,34 – 8,59)	0,75
Alelo G	89 (90,8)	40 (95,2)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	38 (38,7)	19 (45,2)	0,89 (0,46 – 1,74)	0,75
Total	98	42		
<i>XRCC-1</i>				
<i>G28152A</i>				
GG	56 (57,7)	18 (42,8)	<i>Ref</i>	1,00
GA	27 (27,8)	16 (38,1)	0,54 (0,24 – 1,22)	0,13
AA	14 (14,4)	8 (19)	0,56 (0,20 – 1,55)	0,26
Alelo G	83 (85,6)	34 (81)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	41 (42,3)	24 (57,1)	0,49 (0,25 – 0,97)	0,03*
Total	98	42		

Quando as análises entre metaplasia e o CG foram realizadas considerando os subtipos histológicos foi observado uma proteção para o desenvolvimento do subtipo intestinal associado aos pacientes portadores do genótipo homozigoto polimórfico de *MLH1* (AA) [ $p=0,03$ ; O.R.= 0,19 (0,03 – 0,98)]. Por outro lado, nos portadores do genótipo de *MLH1* -93G>A heterozigoto polimórfico (GA) foi observado uma tendência à proteção ao subtipo difuso, já que apesar da significância encontrada, o IC não confirma o achado [ $p=0,05$ ; O.R.= 0,41 (0,16 – 1,04)] (Tabela 6).

Os casos de câncer gástrico também foram analisados entre si considerando os subtipos histológicos e as regiões de localização do tumor. Somente foi observada uma diferença estatística quanto às regiões de localização do tumor, na qual o genótipo heterozigoto de *XRCC-1* G28152A apresentou associação significativa para o risco no desenvolvimento de tumores na região cárdia [ $p=0,03$ ; O.R.=2,59 (1,06 – 6,29)] (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação entre metaplasia (M) e os subtipos histológicos de CG, quanto aos genótipos das enzimas XRCC-1 G28152A e MLH1 -93G&gt;A.

	<b>Câncer Gástrico Intestinal</b> n (%)	<b>Metaplasia</b> n (%)	<b>OR</b> <b>(95% CI)</b>	<b>p</b>	<b>Câncer Gástrico Difuso</b> n (%)	<b>Metaplasia</b> n (%)	<b>OR</b> <b>(95% CI)</b>	<b>p</b>
<i>MLH1</i>								
<i>-93G&gt;A</i>								
GG	36 (53,7)	16 (41)	<i>Ref</i>	1,00	36 (63,2)	16 (41)	<i>Ref</i>	1,00
GA	28 (41,8)	16 (41)	0,77 (0,33 – 1,82)	0,56	15 (26,3)	16 (41)	0,41 (0,16 – 1,04)	0,05
AA	3 (4,5)	7 (18)	0,19 (0,03 – 0,98)	0,03*	6 (10,5)	7 (18)	0,38 (0,11 – 1,31)	0,11
Alelo G	64 (95,5)	32 (82)	<i>Ref</i>	1,00	51 (89,5)	32 (82)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	31 (46,3)	23 (59)	0,67 (0,33 – 1,33)	0,25	21 (36,8)	23 (59)	0,57 (0,27 – 1,19)	0,13
Total	67	39			57	39		
<i>XRCC-1</i>								
<i>G28152A</i>								
GG	34 (51,5)	19 (48,7)	<i>Ref</i>	1,00	33 (57,9)	19 (48,7)	<i>Ref</i>	1,00
GA	24 (36,4)	13 (33,3)	1,03 (0,42 – 2,48)	0,94	17 (29,8)	13 (33,3)	0,75 (0,30 – 1,88)	0,54
AA	8 (12,1)	7 (18)	0,63 (0,20 – 2,03)	0,44	7 (12,3)	7 (18)	0,57 (0,17 – 1,89)	0,36
Alelo G	58 (87,9)	32 (82)	<i>Ref</i>	1,00	50 (87,7)	32 (82)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	32 (48,5)	20 (51,3)	0,88 (0,43 – 1,78)	0,72	24 (42,1)	20 (51,3)	0,76 (0,36 – 1,61)	0,48
Total	67	39			57	39		

Tabela 8 - Associação entre os subtipos histológicos, as regiões anatômicas de CG, quanto aos genótipos das enzimas XRCC-1 G28152A e MLH1 -93G&gt;A.

	<b>Câncer Gástrico Cárdia n (%)</b>	<b>Câncer Gástrico Não Cárdia n (%)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>	<b>Câncer Gástrico Difuso n (%)</b>	<b>Câncer Gástrico Intestinal n (%)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>
<i>MLH1</i>								
<i>-93G&gt;A</i>								
GG	14 (48,3)	60 (61,2)	<i>Ref</i>	1,00	36 (63,2)	36 (53,7)	<i>Ref</i>	1,00
GA	14 (48,3)	29 (29,6)	2,06 (0,87 – 4,90)	0,09	15 (26,3)	28 (41,8)	0,53 (0,24 – 1,16)	0,11
AA	1 (3,4)	9 (9,2)	0,47 (0,05 – 4,07)	0,68	6 (10,5)	3 (4,5)	2 (0,46 – 8,61)	0,48
Alelo G	28 (96,6)	89 (90,8)	<i>Ref</i>	1,00	51 (89,5)	64 (95,5)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	15 (51,7)	38 (38,7)	1,25 (0,60 – 2,61)	0,54	21 (36,8)	31 (46,3)	0,85 (0,43 – 1,65)	0,63
Total	29	98			43	67		
<i>XRCC-1</i>								
<i>G28152A</i>								
GG	12 (41,4)	56 (57,7)	<i>Ref</i>	1,00	33 (57,9)	34 (51,5)	<i>Ref</i>	1,00
GA	15 (51,7)	27 (27,8)	2,59 (1,06 – 6,29)	0,03*	17 (29,8)	24 (36,4)	0,72 (0,33 – 1,59)	0,43
AA	2 (6,9)	14 (14,4)	0,66 (0,13 – 3,32)	1,00	7 (12,3)	8 (12,1)	0,90 (0,29 – 2,76)	0,85
Alelo G	27 (93,1)	83 (85,6)	<i>Ref</i>	1,00	50 (87,7)	58 (87,9)	<i>Ref</i>	1,00
Alelo A	17 (58,6)	41 (42,3)	1,27 (0,62 – 2,60)	0,50	24 (42,1)	32 (48,5)	0,87 (0,45 – 1,66)	0,67
Total	29	98			43	67		

#### 4. DISCUSSÃO

As amostras de LG corresponderam a 217 pacientes com sintomas dispépticos e 152 casos de câncer gástrico foram incluídos nesse estudo. É interessante notar aumento significativo do risco observado para os homens com a progressão das lesões quando comparado a lesão mais branda (GCI) com metaplasia e com o CG intestinal. Esse é um dado esperado, já que nos dados epidemiológicos, o homem é mais frequente. As razões para tais diferenças não são claras. Exposições ambientais ou profissionais podem desempenhar um papel importante. Por exemplo, os homens têm sido historicamente mais propensos a fumar, embora as taxas elevadas em homens parecem persistir, mesmo em países onde os homens e as mulheres têm padrões de fumo semelhantes (FREEDMAN *et al.*, 2010). Alternativamente, as diferenças de sexo podem refletir diferenças fisiológicas. Os níveis de estrógenos podem proteger contra o desenvolvimento de GC. Nas mulheres, a menopausa retardada e aumento de fertilidade pode diminuir o risco de GC, enquanto que as drogas anti-estrogênio podem aumentar as taxas de CG (SHEH *et al.*, 2011; DERAKHSHAN *et al.*, 2009).

Quando o gênero foi comparado no CG considerando os subtipos e o sítio anatomico, observou-se que diferindo dos tumores não-cárdia, tumores da região cárdia foram mais frequentes nos homens, corroborando com estudos que já relataram uma associação entre os tumores na região cárdia e o sexo masculino em várias partes do mundo (BROWN; DEVESA, 2002; FREEDMAN *et al.*, 2010; AMORI *et al.*, 2016). Nas amostras referentes ao CG, os homens foram mais acometidos do que as mulheres, o que reproduz as estimativas do INCA, nas quais a relação homem/mulher é de 1,79 (INCA 2014).

A mediana de idades nas lesões gástricas, também ficou dentro do esperado já citado na literatura, com pequenas variações em diferentes grupos étnicos (SONG *et al.*, 2015; CHOI; SONNENBERG, 2015; MARAN *et al.*, 2013). Considerando os CG, na maioria das populações há um aumento progressivo no risco com a idade, com prevalência entre 50 e 70 anos, reproduzido pelo presente estudo ao se deparar com mais da metade (51,3%) dos pacientes integrantes desta pesquisa apresentando idade maior ou igual a 65 anos e a menor idade encontrada foi a de 23 anos (CREW; NEUGUT, 2006, PARKIN, 2006).

Quanto a região anatômica a mais frequente (79,6% dos casos) foi a região não-cárdica. O encontro dessa região como a mais frequente corrobora com outros estudos que apontam a posição distal do estômago como o sítio mais frequente dos tumores gástricos em países em desenvolvimento e no Japão do que na América do Norte, Norte e Oeste da Europa e Austrália/Nova Zelândia, bem como estudo realizado no estado do Ceará (PARKIN, 2006; DA COSTA *et al.*, 2015).

Considerando o subtipo histológico, verificaram-se frequências similares dos tipos intestinal e difuso. Embora o tipo intestinal seja apontado como o mais frequente pela IARC (2000), Ang e Fock, 2014 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, onde foram observadas, para os tumores do tipo intestinal, frequências que variaram de 51%, a 58,6% em estudos realizados no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2004, CREW; NEUGUT, 2006).

Considerando os polimorfismos estudados, apesar de polimorfismos nos genes de várias enzimas de reparo do DNA serem bastante estudados em vários tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico, devido ao seu papel crítico na manutenção da integridade do genoma (GOODE; ULRICH; POTTER, 2002; HUNG, *et al.*, 2005; CAPÉLLA, *et al.*, 2008), não há muitos estudos relativos aos polimorfismos de *MLH1* e *XRCC-1* ou em lesões gástricas que não câncer. Assim, o estudo aqui proposto teve como objetivo, associar os polimorfismos *XRCC1* G28152A e *MLH1* -93G>A em lesões gástricas de diferentes gravidades incluindo o câncer gástrico, este último considerando os subtipos histopatológicos e sítios anatômicos.

Quando o total das lesões foi comparado aos casos de câncer gástrico com relação à distribuição genotípica dos polimorfismos estudados, foi encontrado um aumento de 1,29 vezes no risco para a progressão para o câncer associado genótipo heterozigoto polimórfico *XRCC1* 28152GA. É biologicamente plausível supor que esses polimorfismos podem ter significado funcional. O polimorfismo modifica o sítio de interação com a polimerase (WANG *et al.*, 2003) e adicionalmente, Lunn *et al.* (1999) demonstraram que o alelo polimórfico do gene *XRCC-1* G28152A está associado a

níveis mais elevados lesões ao DNA (adutos) ocasionada por aflatoxina-B1 e glicoforina, sugerindo assim que esse polimorfismo resulta em reparo ineficiente do DNA, justificando a associação encontrada. Apenas um estudo desenvolvido na região Sul do Brasil compara o polimorfismo de *XRCC1* G28152A em lesões gástricas com CG, sem encontrar nenhuma associação significativa (DUARTE *et al*, 2005). Entretanto as frequências do polimorfismo *XRCC-1* G28152A encontradas por Duarte e colaboradores diferiu das do presente estudo nos casos de lesões gástricas que não o câncer, no qual as frequências aqui encontradas estavam menores no genótipo heterozigoto (11,6% x 45%) e maiores no genótipo homozigoto polimórfico (15,3% x 6,5%). Podendo, assim, justificar os resultados conflitantes.

Dados sobre a associação do polimorfismo de *XRCC1* G28152A e risco ao câncer, são inconsistentes na literatura. Ghosh *et al.* (2016), em estudo caso controle com paciente da Índia não observaram associação com esse polimorfismo. Enquanto Shen *et al.* (2000), também em um estudo caso-controle, encontraram aumento no risco de CG para indivíduos portadores do genótipo variante para o mesmo polimorfismo do gene *XRCC1*. Ratnasinghe *et al.* (2004) encontraram uma redução significativa na incidência de CG em portadores do alelo polimórfico de *XRCC1* 28152A.

Quando as lesões foram estratificadas e comparadas considerando o diagnóstico histopatológico, o genótipo homozigoto polimorfismo *XRCC1* 28152AA foi associado a proteção para o desenvolvimento de gastrite crônica ativa e o alelo A para CG não cárdia. O reparo do DNA é um componente essencial da resposta a danos no DNA celular (DDR), é a reação da célula para lidar com insultos genômicos endógenos e exógenos, que podem interferir com o processo de transferência de informação genética, perturbar o ciclo celular e induzem a morte celular. No entanto, para proteger de apoptose excessiva, as células cancerosas podem tolerar algumas lesões do DNA, o que pode aumentar a instabilidade do genoma e levar ao câncer (PAWLOWSKA *et al*, 2015). Esse mecanismo pode ser uma possível explicação para os achados controversos em estudos com o polimorfismo G28152A de *XRCC-1*.

Contrastando com a proteção um risco foi observado para os tumores localizados na cárdia. Esse dado pode estar relacionado com dados relatados de outro estudo no qual encontraram o genótipo *XRCC-1* 28152AA ligado ao aumento do risco de câncer relacionados com o tabaco entre fumantes leves, mas diminuição do risco entre os

fumantes pesados (TUIMALA *et al.*, 2004). A incidência de câncer na cárdia já foi postulada por ser influenciada com fatores ambientais, mais especificamente o tabagismo (CAI *et al.*, 2003, LAGERGREN *et al.*, 2000; TUIMALA *et al.*, 2004)

Considerando o polimorfismo -93G>Ade *MLH1*, associação significativa foi encontrada apenas quando comparadas metaplasia com os subtipos de CG. Foi observada uma proteção em portadores do genótipo homozigoto polimórfico (AA) para o desenvolvimento do subtipo intestinal. O gene humano homólogo de mutL (*MLH1*) é um dos principais genes na via MMR desempenhando um papel importante não só no reconhecimento e no reparo de pares de base de DNA mal pareadas, mas também em outros processos celulares vitais incluindo a parada do ciclo celular, estresse oxidativo, e apoptose. O polimorfismo localizado na posição -93 do resíduo de adenina do codon de iniciação é relatado afetar a expressão do gene *MLH1* em cultura de linhagens celulares oncogénica e não oncogénica alterando a ligação de fatores de transcrição ao promotor de *MLH1* com diferente grau de afinidade dependendo do fator de transcrição (PAN *et al.*, 2011; PERERA *et al.*, 2011). Há também estudos que mostram o aumento da susceptibilidade da sequência promotora à metilação em carcinoma colo retal (MIYAKURA *et al.*, 2014).

Muitos estudos têm avaliado a relação do polimorfismo-93G>Ade *MLH1*, com o risco de câncer, porém os resultados permanecem contraditórios. Alguns estudos relataram a relação da presença do alelo polimórfico de *MLH1*-93G>A com o risco de câncer colorretal (CRC) (RAPTIS *et al.*, 2007; ALLAN *et al.*, 2008; NIZAM *et al.*, 2013). No entanto, na população mexicana um estudo constatou a existência de um risco significativamente reduzido de CRC para o genótipo -93A/A (MUNIZ-MENDOZA *et al.*, 2012) corroborando com os dados encontrados neste estudo. Contudo, estudos envolvendo o gene *MLH1* e CG estão mais focados em entender o papel da metilação desse gene no desenvolvimento da carcinogênese gástrica. Apenas um trabalho foi identificado relatando associação significativa do polimorfismo -93G>A de *MLH1* com CG, no qual encontraram um aumento no risco para o desenvolvimento dessa doença em indivíduos portadores do alelo *MLH1* -93A (ZHU *et al.*, 2016). Para explicar esses resultados discordantes, foi proposto que o polimorfismo -93G>A de *MLH1* pode ser cis-ativado com variantes desconhecidas na região mínima para transcrição – definida entre -320 e -76 por Arita *et al.* (2003) – e co-modula a expressão

de *MLH1*. Na verdade, esses autores provaram que mutantes individuais na região -91 a -96 mostraram menor atividade no promotor (13-17%) e que mutantes duplos ou triplos para esse e outros polimorfismos desse gene, apresentaram atividade moderada (30%) (ARITA *et al*, 2003). No entanto, não existe qualquer evidência conclusiva de que o alelo -93A reduza a atividade do promotor, e nenhum elemento nuclear para a transcrição de *MLH1* foi identificado (MEI *et al*, 2010; PERERA *et al*, 2011).

## 5. CONCLUSÃO

A análise entre os tumores e as demais lesões agrupadas mostrou aumento significativo do risco para o desenvolvimento de CG para o genótipo AA de *XRCC-1* G28152A. Por outro lado, análises estratificadas revelaram proteção para os portadores do genótipo homozigoto polimorfico *XRCC-1* 28152AA, associados a gastrite crônica ativa e o alelo polimorfico *XRCC-1* (A), uma diminuição para a incidência dos tumores na região não cardia. Adicionalmente quando a metaplasia foi comparada aos subtipos histológicos de CG foi observado uma proteção para o desenvolvimento do subtipo intestinal associado aos pacientes portadores do genótipo homozigoto polimórfico de *MLH1-93G>A* (AA). Baseado nessas análises é possível afirmar que os polimorfismos em enzimas de reparo estudados podem vir a ser bons marcadores de progressão para o desenvolvimento do CG. Porém mais estudos no âmbito da análise comparativa entre os diferentes tipos de lesões se fazem necessários para confirmar esse achado, e para entender melhor os fatores envolvidos na progressão e desenvolvimento do CG.

Adicionalmente, os resultados envolvendo o sexo destacam a relevância de analisar outros parâmetros do hospedeiro a fim de encontrar uma associação distinta que possa auxiliar no estabelecimento de fatores de risco.

## REFERÊNCIAS

- ALLAN J. M. *et al.*. MLH1-93G>A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 123, p. 2456-9, 2008.
- AMORI, N. *et al.* Epidemiology and trend of common cancers in Iran (2004-2008). **European Journal of Cancer Care**, 2016.
- ANG, T. L.; FOCK, K. M. Clinical epidemiology of gastric cancer. **Singapore Medical Journal**, v. 55, n. 12, p. 621-628, 2014.
- ARITA, M.; ZHONG, X.; MIN, Z.; HEMMI, H. Multiple sites required for expression in 5'-flanking region of the hMLH1 gene. **Gene** v. 306, p. 57-65, 2003
- ATHERTON, J. C. *et al.* Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 112, n. 1, p. 92 - 99, 1997.
- BANASCH, M.; SCHMITZ, F. Diagnosis and treatment of gastrinoma in the era of proton pump inhibitors. **Wien Klin Wochenschr.** v.119, n. 19-20, p. 573-578, 2007.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- 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**. v. 29, p. 1340-1344, 2006.
- BROWN, L. M.; DEVESA, S. S. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 11, p. 235-56, 2002.
- 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**, v. 5, p. 114-115, 2007.
- CAI, L.; ZHENG, Z. L.; ZHANG, Z. F. Risk factors for the gastric cardia cancer: a case-control study in Fujian Province. **World J Gastroenterol**, v. 9, n. 2, p. 214-218, 2003.
- CAPELLÁ, G. *et al.* DNA repair polymorphisms and the risk of stomach adenocarcinoma and severe chronic gastritis in the EPIC-EURGAST study. **Int. J. Epidemiol**, v. 37, p. 1316-1325, 2008.
- CÉSAR, A. C. G.; SILVA, A. E.; TAJARA, E. H. Fatores Genéticos e Ambientais Envolvidos na Carcinogênese Gástrica. **Arq. Gastroenterol**, v. 39, p. 253-259, 2002.
- CHANDRASEKHAR, D.; VAN HOUTEN, B. In vivo formation and repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts measured at the gene and

nucleotide level in *Escherichia coli*. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 450, n. 1, p. 19-40, 2000.

CHEN, H. et al. Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of MLH1. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1684–1688, 2007.

CHOI, C. E.; SONNENBERG, A. High Prevalence of Gastric Preneoplastic Lesions in East Asians and Hispanics in the USA. **Digestive Diseases and Sciences**, p. 2070–2076, 2015.

CHOUDHARY, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. **Science**, v. 325, p. 834-40, 2009.

CHRISTMANN, M. *et al.* Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3–34, 2003.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - First American Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res.** n. 52, p. 6735-6740, 1992.

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

CURTIN, N. J. PARP inhibitors for cancer therapy. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 7, n. 4, p. 1–20, 2005.

CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 801–17, 2012.

DA COSTA, D. M. *et al.* Characterization of Gastric Cardia Tumors: Differences in *Helicobacter pylori* Strains and Genetic Polymorphisms. **Digestive Diseases and Sciences**, p. 2712–2717, 2015.

DANI, R.; PASSOS, D. **Gastroenterologia Essencial**. 4<sup>a</sup> Ed., São Paulo: Guanabara Koogan, 2011.

DEACONESCU, A. M.; ARTSIMOVITCH, I.; GRIGORIEFF, N. Interplay of DNA repair with transcription: from structures to mechanisms. **Trends Biochem Sci**, v. 37, p.543-552, 2012.

DERAKHSHAN, M. H. *et al.* Oesophageal and gastric intestinal-type adenocarcinomas show the same male predominance due to a 17 year delayed development in females. **Gut**, v. 58, p. 16–23, 2009.

DOMINGO, E. *et al.* BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. **Oncogene**, v. 24, p. 3995–3998, 2005.

DUARTE, M. C. *et al.* Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3,

interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 11, n. 42, p. 6593–6600, 2005.

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

FOLLE, G. A. Nuclear architecture, chromosome domains and genetic damage. **Mutation, Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 172-183, 2008.

FREEDMAN, N. D. *et al.* Male predominance of upper gastrointestinal adenocarcinoma cannot be explained by differences in tobacco smoking in men versus women. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 13, p. 2473–2478, 2010.

FRIEDBERG, E. C. *et al.* DNA repair and mutagenesis. **ASM Pres**, Washington, 2006.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.11, n. 12, p. 1513–1530, 2002.

GHOSH, S. *et al.* Association of DNA repair and xenobiotic pathway gene polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer patients in West Bengal, India. **Tumor Biology**, 2016.

HAMILTON, J. P.; MELTZER, S. J. A review of the genomics of gastric cancer. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, p. 416-425, 2006.

HANSSON, L. E. *et al.* The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. **N Engl J Med**, n. 335, p. 242-249, 1996.

HARTGRINK, H. H. *et al.* Gastric cancer. **Lancet**, v. 374, p. 477–90, 2009.

HUNG, R. J. *et al.* Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol**, v. 162, p. 925-942, 2005.

HUNT, R. *et al.* Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? **Methods Mol. Biol**, v. 578, p. 23-39, 2009.

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 2015: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2014.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2015.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–8, 2009.

JIRICNY, J.; NYSTRÖM-LAHTI, M. Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 10, p. 157-161, 2000.

KAWANISHI, S. *et al.* Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. **Biol. Chem**, v. 387, p. 365–372. 2006.

KAYAÇETIN, S.; GÜREŞÇİ, S. What is gastritis? What is gastropathy? How is it classified? **Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 3, p. 233–247, 2014.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. **Nature Genet**, v. 27, p. 247–254. 2001

KOLODNER, R. D.; MARSISCHKY, G. T. Eukaryotic DNA mismatch repair. **Curr Opin Genet Dev**, v. 9, p. 89-96, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A. A.; ASTER J. C. **Pathologic Basis of Disease**, 9<sup>a</sup> Ed., Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2013.

KUMAR, S.; KUMAR, A.; DIXIT, V. K. Genetic diversity in strains of *Helicobacter pylori* from India and their relatedness to strains from other parts of the world. **Infect Genet Evol**, v. 1, n. 11, p. 242-7, 2011.

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

LAGERGREN, J. *et al.* The role of tobacco, snuff and alcohol use in the etiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. **International Journal of Cancer**, v. 85, n. 3, p. 340–346, 2000.

LAUREN, P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 64, p. 31-49, 1965.

LAUWERS, G. Y.; SRIVASTAVA, A. Gastric Preneoplastic Lesions and Epithelial Dysplasia. **Gastroenterol Clin N Am**. n. 36, p. 813–829, 2007.

LI, Z. *et al.* Genetic Polymorphism of DNA Base-excision Repair Genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and Their Correlation with Risk of Lung Cancer in a Chinese Population. **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 3, p. 226–234, 2011.

LINDHAL, T.; WOOD, R.D. Quality control by DNA repair. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1897-905, 1999.

LINDOR, N. M.; LINDOR, C. J.; GREENE, M. H. Hereditary neoplastic syndromes. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds.: *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd ed. New York, NY: Oxford University Press, p. 562-76. 2006.

- LOPES, L. F. *et al.* Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 1707-171, 2004.
- LU, A. *et al.* Repair of Oxidative DNA damage (Review). **Cell BiochemBiophys**, v. 35, p. 141-170, 2001.
- LUNN, R. M. *et al.* XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. **Cancer Res**, v. 59, p. 2557–61, 1999.
- MARAN, S. *et al.* Gastric precancerous lesions are associated with gene variants in *Helicobacter pylori*-susceptible ethnic Malays. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 23, p. 3615–3622, 2013.
- MARQUES-SILVA, L. *et al.* Prevalence of gastric precancerous conditions: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 26, p. 378–387, 2014.
- MARSHAL, L. B. J.; ARMSTRONG, J. A.; MCGECHIE, D. B. Attempt to fulfill Koch's postulate for *pyloric Campilobacter*. **Med. F. Austr.**, v. 142, p. 436 – 439, 1985.
- MARTÍN-LÓPEZ, J.V.; FISHEL, R. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. **Fam. Cancer**, v. 12, p. 159–168, 2013.
- MASSON, J. Y. *et al.* Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. **Genes Dev**; v. 15, p. 3296-3307, 2001.
- MEI, M. *et al.* The MLH1 -93 promoter variant influences gene expression. **Cancer Epidemiol**, v.34, p. 93-95, 2010.
- MIYAKURA, Y. *et al.* Haplotype defined by the MLH1-93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers. **BMC research notes**, v. 7, p. 835, 2014.
- MUNIZ-MENDOZA, R. *et al.* MLH1 and XRCC1 polymorphisms in Mexican patients with colorectal cancer. **Genet Mol Res**, v. 11, p. 2315, 2012.
- NIZAM, Z. M. *et al.* Contribution of the MLH1–93G>A promoter polymorphism in modulating susceptibility risk in Malaysian colorectal cancer patients. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, p. 619–24, 2013.
- NOUSPIKEL T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. **Cell Mol Life Sci**; v. 66, p. 994-1009, 2009
- PAN, X. M. *et al.* The association between MLH1 -93 G>A polymorphism of DNA mismatch repair and cancer susceptibility: A meta-analysis. **Mutagenesis**, v. 26, n. 5, p. 667–673, 2011.

PAWLOWSKA, E.; BLASIAK, J. DNA repair—a double-edged sword in the genomic stability of cancer cells—the case of chronic myeloid leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 27535–27549, 2015.

PARKIN, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 12, p. 3030–3044, 2006.

PEARLMAN, D.; PIRKLE, D. H.; KIM S. H. Molecular models for DNA damage by photoreaction. **Science**, v. 227, n. 4692, p. 1304–1308, 1985.

PEREIRA, L.P. *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* in gastric cancer. **Arq Gastroenterol**, v. 38, p. 240–246, 2001.

PERERA, S. *et al.* Functional effects of the MLH1-93G>A polymorphism on MLH1/EPM2AIP1 promoter activity. **Oncology Reports**, v. 25, n. 3, p. 809–815, 2011.

POSTEL-VINAY, S. *et al.* The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 9, n. 3, p. 144–155, 2012.

QIAN, B. *et al.* Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. **Lung Cancer**, v. 73, n. 2, p. 138–146, 2011.

RAPTIS, S. *et al.* MLH1–93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst.**; v. 99, p. 463–74, 2007.

RATNASINGHE, L. D. *et al.* Polymorphisms of XRCC1 and risk of esophageal and gastric cardia cancer. **Cancer Letters**, v. 216, n. 2, p. 157–164, 2004.

ROBINSON, K.; ARGENT, R. H.; ATHERTON, J. C. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**; v. 21, p. 237–259, 2007.

SHEH, A. *et al.* 17 $\beta$ -Estradiol and Tamoxifen Prevent Gastric Cancer by Modulating Leukocyte Recruitment and Oncogenic Pathways in *Helicobacter Pylori*-Infected INS-GAS Male Mice. **Cancer Prev Res**, v. 4, p. 1426–35, 2011.

SHRIVASTAV, M.; DE HARO, L. P.; NICKOLOFF, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Res**, v. 18, p. 134–147, 2008.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Cienc. Cult.**, v.66, n.1, p. 38–42, 2014.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repairs of oxidative DNA damage. **Mutat. Res.**, v. 531, n.1–2, p. 231–51, 2003.

SMITH, T. R. *et al.* DNA-Repair Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, p. 1200–1204, 2003.

SONG, H. *et al.* Incidence of gastric cancer among patients with gastric precancerous lesions: observational cohort study in a low risk Western population. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 351, p. h3867, 2015.

SOULAS-SPRAUEL, P. *et al.* V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: A paradigm to study the regulation of DNA end-joining. **Oncogene**, v. 26, p. 7780–7791, 2007.

STONEKING, M. Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past... **Nature**, v. 409, p. 821-822, 2001.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 24-33, 2005.

TUIMALA, J. *et al.* Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: Effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 554, n. 1-2, p. 319–333, 2004.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact**, v. 160, p. 1–40, 2006

VERDECCHIA, A. *et al.* Explaining gastric cancer survival differences among European countries. **International Journal of Cancer**, v. 109, n. 5, p. 737–741, 2004.

WANG, Y. *et al.* From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. **DNA Repair**, v. 2, n. 8, p. 901–908, 2003.

WERNER, M. *et al.* Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**, v. 127, p. 207-216, 2001.

WU, C. *et al.* Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. **Oncol. Rep.**, v. 15, p. 57-64, 2006.

ZHOU, B. S.; ELLEDGE, S. J. Checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433–439, 2000.

ZHU, H. *et al.* Polymorphisms in mismatch repair genes are associated with risk and microsatellite instability of gastric cancer, and interact with life exposures. **Gene**, v. 579, n. 1, p. 52–57, 2016.

## ANEXOS

## Anexo I - Parecer do Comitê de Ética – Câncer Gástrico

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](mailto: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 II - Parecer do Comitê de Ética – LG Pré-Neplasticas*



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF**

Fortaleza, 12 de julho 2010.

Ilma.sra. comunicamos-lhe o parecer do CEP

Pesquisadora: **Ana Paula Santos do Carmo**

Projeto Intitulado: **Identificação genotípica e prevalência de cepas da helicobacter pylori responsáveis pelo desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos: estudos em lesões precursoras.**

Área de conhecimento: **Ciências da Saúde / Medicina**

Data da entrada no CEP: **26/06/10**

Protocolo do CEP: **070714/10**

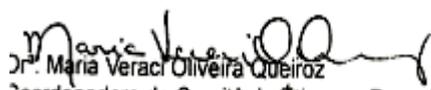
**Sumário: Objetivo principal da pesquisa** - Determinar os subtipos genéticos das cepas de helicobacter pylori, quanto à presença de genes de virulência circulantes na região estudada, em lesões gástricas de diferentes gravidades. Um número de 200 amostras de pacientes com suspeita de lesões gástricas estudadas (gastrites, úlceras e metaplasia intestinal) será coletado nos ambulatórios dos hospitais. Os locais da pesquisa serão: Hospital Universitário Walter Cantideo (HUWC), Hospital São José (HSJ) e Hospital Geral de Fortaleza (HGF), ambos em Fortaleza. A coleta será feita em condições ideais de assepsia, no momento da endoscopia. A confirmação diagnóstica será dada pelo laudo endoscópico bem como pelo exame histopatológico. Os sujeitos da pesquisa serão pessoas que se dirigem a um destes hospitais com queixa, ou suspeita de doença gástrica e que foi encaminhado ao serviço de endoscopia, o mesmo será abordado momentos antes da realização do exame pelo pesquisador cadastrado junto ao comitê de ética e ao mesmo será explicado do que se trata a pesquisa e quais os possíveis riscos inerentes de sua participação.

**Parecer:**

Informamos a V.Sa., que o Comitê de Ética em pesquisa apreciou o projeto, considerando que o mesmo atende as recomendações da Resolução 196/96 sobre pesquisa com seres humanos e considerando que o mesmo já tem aprovação de outro Comitê, observou-se os aspectos técnicos de viabilização da pesquisa e o CEP/HGF considerou o projeto aprovado.

Lembramos ao pesquisador a entrega do relatório final da pesquisa no CEP e cumprimento dos aspectos ético-legais da pesquisa.

Atenciosamente,

  
 Dr. Maria Veraci Oliveira Queiroz  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HGF

**Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Amostras de Câncer  
Gástrico**

**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 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Amostras de LG Pré-Neplásticas*

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

**Endereço:** R. Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu

**Investigadora Responsável:** Silvia Helena Barem Rabenhorst

**Título:** “ *Identificação genotípica e prevalência de cepas da Helicobacter pylori responsáveis pelo desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos: Estudos em lesões precursoras*”

Eu, \_\_\_\_\_

por este meio, fui informado (a), em detalhes sobre o estudo intitulado: “ *Identificação genotípica e prevalência de cepas da Helicobacter pylori responsáveis pelo desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos: Estudos em lesões precursoras*” 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 estão relacionados às doenças, de modo a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria denominada *Helicobacter pylori*. Para identificar esta bactéria, serão feitos estudos no laboratório, analisando o material coletado no momento da endoscopia. Cerca de 200 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, bem como o uso de todo material gerando a partir desta coleta, como lâminas, blocos e etc. . 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 hábitos de vida, como alimentação, ao consumo de bebida alcoólica e/ou cigarros e também em relação à minha doença, no que se refere aos sintomas e quando começou. 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 poderá estar contribuindo para que se entendam melhor os fatores de risco e alterações que ocorrem nas doenças gástricas. A identificação dos fatores de risco para doenças gástricas servirá para direcionar medidas preventivas. 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 à minha participação, posso contatar 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: \_\_\_\_\_

Assinatura do  
Investigador: \_\_\_\_\_

**Anexo V - Questionário de coleta de dados – Amostras de CG**

**Questionário de coleta de dados clinico – epidemiológicos**

**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 \_\_\_\_\_ Frequência \_\_\_\_\_ Fum. passivo [ ]

[ ] Álcool Tipo \_\_\_\_\_ Frequência \_\_\_\_\_

**Dados relativos à neoplasia.**

Data do primeiro diagnóstico \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Exam \_\_\_\_\_

*H. pylori* [ ]

Sítio anatômico \_\_\_\_\_ Est. Clínico T \_\_\_ N\_\_\_ M\_\_\_

Aspecto morfológico \_\_\_\_\_ Bormann \_\_\_\_\_



**Exame anatomopatológico** Nº: \_\_\_\_\_

**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**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Nº de amostra Tumoral congelada [ ] Nº de amostra Normal [ ]

Local Armazenamento: \_\_\_\_\_

*Anexo VI - Questionário de coleta de dados – Amostras de LG Pré-Neplasticas*

**Questionário de coleta de dados clinico – epidemiológicos**

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ N° Prontuário \_\_\_\_\_ código: \_\_\_\_\_  
Local da coleta \_\_\_\_\_ Amb: \_\_\_\_\_

**I – IDENTIFICAÇÃO**

Nome \_\_\_\_\_ Sexo F [ ] M [ ]  
Endereço \_\_\_\_\_  
Tel \_\_\_\_\_  
naturalidade \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Procedência \_\_\_\_\_ Ascendência \_\_\_\_\_  
Cor: [ ] caucasiano [ ] negro [ ] asiático [ ] mestiço [ ] mulato: \_\_\_\_\_  
Idade \_\_\_\_ Nasc \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ABO \_\_\_\_ Profissão \_\_\_\_\_ Grau de  
instrução \_\_\_\_\_

**II-HISTÓRIA FAMILIAR:**

Familiares com história de  
gastrite \_\_\_\_\_

—  
Familiares com história de câncer  
gástrico \_\_\_\_\_

**Hábitos:** [ ] Sal [ ] Frutas [ ] Verduras [ ] Churrasco ou Carne seca [ ] geladeira  
[ ] Tabagista Tipo \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_ Fum. passivo [ ]  
[ ] Álcool Tipo \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_

**III- DOENÇA ASSOCIADA:** \_\_\_\_\_

**IV- USO DE MEDICAMENTOS:** \_\_\_\_\_

**V- ENDOSCOPIA ANTERIOR:** [ ] Sim [ ] Não *H. pylori* [ ] Técnica \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Tratamento: \_\_\_\_\_

Biópsia : N° \_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Laudo \_\_\_\_\_

**VI-DADOS RELATIVOS À LESÃO ATUAL.** Teste de urease [ ]

Motivo da endoscopia (sintomas) \_\_\_\_\_

LAUDO ENDOSCÓPICO-

**Médico** \_\_\_\_\_

Esôfago: \_\_\_\_\_

Estômago: \_\_\_\_\_ Tipo de lesão \_\_\_\_\_

Sítio anatômico \_\_\_\_\_

Duodeno: \_\_\_\_\_

Conclusão \_\_\_\_\_



**VII- COLETA:**Região do corpo [ ] N° de fragmentos [ ] Região do antro [ ] N° de fragmentos [ ]

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

Local Armazenamento: \_\_\_\_\_ Biópsia [ ] \_\_\_\_\_

Responsável pela

coleta \_\_\_\_\_

## APÊNDICES

Apêndice A - Tabela de associações dos casos de Lesões Gástricas Não Malignas

	GCA n (%)	GCI n (%)	OR (95% CI)	P	U n (%)	GCI n (%)	OR (95% CI)	P	M n (%)	GCI n (%)	OR (95% CI)	P
Mulheres	65 (55,1)	25 (59,5)	Ref	1	3 (42,8)	25 (59,5)	Ref	1	12 (30,7)	25 (59,5)	Ref	1
Homens	53 (44,9)	17 (40,5)	1,19 (0,58 - 2,45)	0,75	4 (57,1)	17 (40,5)	1,96 (0,38 - 9,89)	0,44	27 (69,3)	17 (40,5)	3,30 (1,32 - 8,28)	0,009*
< 52	67 (56,7)	21 (50)	Ref	1	2 (28,5)	21 (50)	Ref	1	10 (26,3)	21 (50)	Ref	1
≥ 52	51 (43,3)	21 (50)	0,76 (0,37 - 1,54)	0,44	5 (71,42)	21 (50)	1,06 (0,19 - 5,72)	1,00	28 (73,7)	21 (50)	2,80 (1,09 - 7,18)	0,02*
<i>MLHI</i>												
rs1800734												
GG	57 (49,1)	23 (54,7)	Ref	1	4 (57,1)	23 (54,7)	Ref	1	16 (41)	23 (54,7)	Ref	1
GA	48 (41,3)	17 (40,4)	1,13 (0,54 - 2,37)	0,72	1 (14,2)	17 (40,4)	0,33 (0,03 - 3,30)	0,63	16 (41)	17 (40,4)	1,35 (0,53 - 3,44)	0,52
AA	11 (9,4)	2 (4,7)	2,21 (0,45 - 10,80)	0,50	2 (28,5)	2 (4,7)	5,75 (0,61 - 53,42)	0,15	7 (18)	2 (4,7)	5,03 (0,92 - 27,43)	0,06
Alelo G	105 (90,51)	40 (95,2)	Ref	1	5 (71,4)	40 (95,2)	Ref	1	32 (82)	40 (95,2)	Ref	1
Alelo A	59 (50,9)	19 (45,2)	1,18 (0,62 - 2,22)	0,60	3 (42,8)	19 (45,2)	1,26 (0,27 - 5,84)	1,00	23 (59)	19 (45,2)	1,51 (0,70 - 3,25)	0,28
<i>XRCC-1</i>												
rs25487												
GG	46 (39,6)	18 (42,8)	Ref	1	3 (42,8)	18 (42,8)	Ref	1	19 (48,7)	18 (42,8)	Ref	1
GA	55 (47,4)	16 (38,1)	1,34 (0,61 - 2,93)	0,58	3 (42,8)	16 (38,1)	1,12 (0,19 - 6,38)	1,00	13 (33,3)	16 (38,1)	0,76 (0,29 - 2,04)	0,59
AA	15 (13)	8 (19)	0,20 (0,07 - 0,57)	0,001 **	1 (14,4)	8 (19)	0,75 (0,06 - 8,36)	1,00	7 (18)	8 (19)	0,8 (0,24 - 2,75)	0,75
Alelo G	101 (87)	34 (81)	Ref	1	6 (85,7)	34 (81)	Ref	1	32 (82)	34 (81)	Ref	1
Alelo A	70 (60,4)	24 (57,1)	0,98 (0,53 - 1,79)	0,95	4 (57,1)	24 (57,1)	0,94 (0,24 - 3,71)	1,00	20 (51,3)	24 (57,1)	0,88 (0,41 - 1,90)	0,75

Legenda: GCA = Gastrite Crônica Ativa; GCI = Gastrite Crônica Inativa; U = Úlcera; M = Metaplasia

**Apêndice B - Tabela de associações entre os subtipos de Câncer Gástricos e GCI**

	CG-I n (%)	GCI n (%)	OR (95% CI)	P	CG-D n (%)	GCI n (%)	OR (95% CI)	P	CG-D n (%)	CG-I n (%)	OR (95% CI)	P
Mulheres	22 (28,2)	25 (59,5)	Ref	1	29 (43,3)	25 (59,5)	Ref	1	29 (43,3)	22 (28,2)	Ref	1
Homens	56 (71,8)	17 (40,5)	3,74 (1,70- 8,24)	0,0008*	38 (56,7)	17 (40,5)	1,92 (0,88 – 4,21)	0,09	38 (56,7)	56 (71,8)	0,51 (0,25 – 1,02)	0,05*
< 65	28 (35,9)	21 (50)	Ref	1	39 (58,2)	21 (50)	Ref	1	39 (58,2)	28 (35,9)	Ref	1
≥ 65	50 (64,1)	21 (50)	1,78 (0,83 – 3,82)	0,13	28 (41,8)	21 (50)	0,71 (0,33 – 1,55)	0,40	28 (41,8)	50 (64,1)	0,40 (0,20 – 0,78)	0,007*
<i>MLH1</i> rs1800734												
GG	36 (53,7)	23 (54,7)	Ref	1	36 (63,2)	23 (54,7)	Ref	1	36 (63,2)	36 (53,7)	Ref	1
GA	28 (41,8)	17 (40,4)	1,05 (0,47 – 2,33)	0,90	15 (26,3)	17 (40,4)	0,56 (0,23 – 1,34)	0,19	15 (26,3)	28 (41,8)	0,53 (0,24 – 1,16)	0,11
AA	3 (4,5)	2 (4,7)	0,95 (0,14 – 6,18)	1	6 (10,5)	2 (4,7)	1,91 (0,35 – 10,32)	0,70	6 (10,5)	3 (4,5)	2 (0,46 – 8,61)	0,48
Alelo G	64 (95,5)	40 (95,2)	Ref	1	51 (89,5)	40 (95,2)	Ref	1	51 (89,5)	64 (95,5)	Ref	1
Alelo A	31 (46,3)	19 (45,2)	1,01 (0,50 – 2,04)	0,95	21 (36,8)	19 (45,2)	0,86 (0,41 – 1,82)	0,70	21 (36,8)	31 (46,3)	0,85 (0,43 – 1,65)	0,63
<i>XRCC-1</i> rs25487												
GG	34 (51,5)	18 (42,8)	Ref	1	33 (57,9)	18 (42,8)	Ref	1	33 (57,9)	34 (51,5)	Ref	1
GA	24 (36,4)	16 (38,1)	0,79 (0,33 – 1,86)	0,59	17 (29,8)	16 (38,1)	0,57 (0,23 – 1,41)	0,22	17 (29,8)	24 (36,4)	0,72 (0,33 – 1,59)	0,43
AA	8 (12,1)	8 (19)	0,52 (0,17 – 1,64)	0,26	7 (12,3)	8 (19)	0,47 (0,14 – 1,53)	0,20	7 (12,3)	8 (12,1)	0,90 (0,29 – 2,76)	0,85
Alelo G	58 (87,9)	34 (81)	Ref	1	50 (87,7)	34 (81)	Ref	1	50 (87,7)	58 (87,9)	Ref	1
Alelo A	32 (48,5)	24 (57,1)	0,78 (0,39 – 1,53)	0,47	24 (42,1)	24 (57,1)	0,68 (0,33 – 1,38)	0,28	24 (42,1)	32 (48,5)	0,87 (0,45 – 1,66)	0,67

Legenda: CG-I = Câncer Gástrico Intestinal; CG-D = Câncer Gástrico Difuso; GCI = Gastrite Crônica Inativa

Apêndice C - Tabela de associações entre sítios de localização dos tumores gástricos e GCI

	CG-C n (%)	GCI n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>	CG-NC n (%)	GCI n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>	CG-C n (%)	CG-NC n (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
Mulheres	27 (87,1)	25 (59,5)	<i>Ref</i>	1	51 (42,2)	25 (59,5)	<i>Ref</i>	1	27 (87,1)	51 (42,2)	<i>Ref</i>	1
Homens	4 (12,9)	17 (40,5)	0,21 (0,06 – 0,73)	0,01*	70 (57,8)	17 (40,5)	2,01 (0,98 – 4,12)	0,05*	4 (12,9)	70 (57,8)	0,10 (0,03 – 0,32)	0,000005 *
< 65	14 (43,7)	21 (50)	<i>Ref</i>	1	61 (50,4)	21 (50)	<i>Ref</i>	1	14 (43,7)	61 (50,4)	<i>Ref</i>	1
≥ 65	18 (56,3)	21 (50)	1,28 (0,51 – 3,23)	0,59	60 (49,6)	21 (50)	0,98 (0,48 – 1,98)	0,96	18 (56,3)	60 (49,6)	1,30 (0,59 – 2,86)	0,50
<i>MLH1</i> rs1800734												
GG	14 (48,3)	23 (54,7)	<i>Ref</i>	1	60 (61,2)	23 (54,7)	<i>Ref</i>	1	14 (48,3)	60 (61,2)	<i>Ref</i>	1
GA	14 (48,3)	17 (40,4)	1,35 (0,51 – 3,57)	0,54	29 (29,6)	17 (40,4)	0,65 (0,30 – 1,40)	0,27	14 (48,3)	29 (29,6)	2,06 (0,87 – 4,90)	0,09
AA	1 (3,4)	2 (4,7)	0,82 (0,06 – 9,91)	1,00	9 (9,2)	2 (4,7)	1,72 (0,34 – 8,59)	0,75	1 (3,4)	9 (9,2)	0,47 (0,05 – 4,07)	0,68
Alelo G	28 (96,6)	40 (95,2)	<i>Ref</i>	1	89 (90,8)	40 (95,2)	<i>Ref</i>	1	28 (96,6)	89 (90,8)	<i>Ref</i>	1
Alelo A	15 (51,7)	19 (45,2)	1,12 (0,49 – 2,59)	0,77	38 (38,7)	19 (45,2)	0,89 (0,46 – 1,74)	0,75	15 (51,7)	38 (38,7)	1,25 (0,60 – 2,61)	0,54
<i>XRCC-1</i> rs25487												
GG	12 (41,4)	18 (42,8)	<i>Ref</i>	1	56 (57,7)	18 (42,8)	<i>Ref</i>	1	12 (41,4)	56 (57,7)	<i>Ref</i>	1
GA	15 (51,7)	16 (38,1)	1,40 (0,50 – 3,87)	0,50	27 (27,8)	16 (38,1)	0,54 (0,24 – 1,22)	0,13	15 (51,7)	27 (27,8)	2,59 (1,06 – 6,29)	0,03*
AA	2 (6,9)	8 (19)	0,37 (0,06 – 2,07)	0,44	14 (14,4)	8 (19)	0,56 (0,20 – 1,55)	0,26	2 (6,9)	14 (14,4)	0,66 (0,13 – 3,32)	1,00
Alelo G	27 (93,1)	34 (81)	<i>Ref</i>	1	83 (85,6)	34 (81)	<i>Ref</i>	1	27 (93,1)	83 (85,6)	<i>Ref</i>	1
Alelo A	17 (58,6)	24 (57,1)	0,89 (0,40 – 1,98)	0,77	41 (42,3)	24 (57,1)	0,49 (0,25 – 0,97)	0,03*	17 (58,6)	41 (42,3)	1,27 (0,62 – 2,60)	0,50

Legenda: GCI = Gastrite Crônica Inativa; CG-C = Câncer Gástrico Cárdia; CG-NC = Câncer Gástrico Não-Cárdia

Apêndice D - Tabela de associações entre os subtipos histológicos de CG e a Metaplasia

	CG-I n (%)	M n (%)	OR (95% CI)	P	CG- D n (%)	M n (%)	OR (95% CI)	P
Mulheres	22 (28,2)	12 (30,7)	Ref	1,00	29 (43,3)	12 (30,7)	Ref	1,00
Homens	56 (71,8)	27 (69,3)	1,13 (0,48 – 2,62)	0,77	38 (56,7)	27 (69,3)	0,58 (0,25 – 1,34)	0,20
< 65	28 (35,9)	10 (26,3)	Ref	1,00	39 (58,2)	10 (26,3)	Ref	1,00
≥ 65	50 (64,1)	28 (73,7)	0,63 (0,27 – 1,50)	0,30	28 (41,8)	28 (73,7)	0,25 (0,10 – 0,61)	0,001*
<i>MLHI</i> rs1800734								
GG	36 (53,7)	16 (41)	Ref	1,00	36 (63,2)	16 (41)	Ref	1,00
GA	28 (41,8)	16 (41)	0,77 (0,33 – 1,82)	0,56	15 (26,3)	16 (41)	0,41 (0,16 – 1,04)	0,05*
AA	3 (4,5)	7 (18)	0,19 (0,03 – 0,98)	0,03*	6 (10,5)	7 (18)	0,38 (0,11 – 1,31)	0,11
Alelo G	64 (95,5)	32 (82)	Ref	1,00	51 (89,5)	32 (82)	Ref	1,00
Alelo A	31 (46,3)	23 (59)	0,67 (0,33 – 1,33)	0,25	21 (36,8)	23 (59)	0,57 (0,27 – 1,19)	0,13
<i>XRCC-1</i> rs25487								
GG	34 (51,5)	19 (48,7)	Ref	1,00	33 (57,9)	19 (48,7)	Ref	1,00
GA	24 (36,4)	13 (33,3)	1,03 (0,42 – 2,48)	0,94	17 (29,8)	13 (33,3)	0,75 (0,30 – 1,88)	0,54
AA	8 (12,1)	7 (18)	0,63 (0,20 – 2,03)	0,44	7 (12,3)	7 (18)	0,57 (0,17 – 1,89)	0,36
Alelo G	58 (87,9)	32 (82)	Ref	1,00	50 (87,7)	32 (82)	Ref	1,00
Alelo A	32 (48,5)	20 (51,3)	0,88 (0,43 – 1,78)	0,72	24 (42,1)	20 (51,3)	0,76 (0,36 – 1,61)	0,48

Legenda: CG-I = Câncer Gástrico Intestinal; CG-D = Câncer Gástrico Difuso; M = Metaplasia

Apêndice E - Tabela de associações entre os subtipos histológicos de CG e a Metaplasia

	<i>H. PYLORI</i>			<i>p</i>	CG-I			<i>p</i>	CG-D			<i>p</i>
	n (%)		OR (95% CI)		n (%)		OR (95% CI)		n (%)		OR (95% CI)	
	+V	-V			+V	-V			+V	-V		
<i>MLHI</i>												
GG	15 (88,2)	56 (57,1)	<i>Ref</i>	1	8 (57,1)	25 (52,1)	<i>Ref</i>	1,	7 (77,8)	29 (61,7)	<i>Ref</i>	1
GA	6 (26,1)	34 (34,7)	0,69 (0,24 – 1,95)	0,48	5 (35,7)	21 (43,7)	0,74 (0,21 – 2,62)	0,64	1 (11,1)	13 (27,6)	0,31 (0,03 – 2,86)	0,41
AA	2 (8,7)	8 (8,2)	0,93 (0,17 – 4,86)	1,00	1 (7,1)	2 (4,2)	1,56 (0,12 – 19,59)	1,00	1 (11,1)	5 (10,6)	0,82 (0,08 – 8,26)	1,00
Alelo G	21 (91,3)	90 (91,8)	<i>Ref</i>	1	13 (92,9)	46 (95,8)	<i>Ref</i>	1	8 (88,9)	42 ( )	<i>Ref</i>	1
Alelo A	8 (11,8)	42 (42,9)	0,71 (0,27 – 1,83)	0,47	6 (42,9)	23 (47,9)	0,81 (0,24 – 2,70)	0,73	2 (22,2)	18 ( )		
<i>XRCC-I</i>												
GG	17 (73,9)	49 (50,5)	<i>Ref</i>	1	11 (78,6)	22 (46,8)	<i>Ref</i>	1,00	1,00	26 (55,3)	<i>Ref</i>	1
GA	5 (21,7)	35 (36,1)	0,41 (0,13 – 1,22)	0,10	3 (21,4)	19 (40,4)	0,31 (0,07 – 1,30)	0,12	2 (22,2)	15 (31,9)	0,57 (0,10 – 3,23)	0,69
AA	1 (4,3)	13 (13,4)	0,22 (0,02 – 1,82)	0,17	0 (0)	6 (12,8)	-	-	1 (11,1)	6 (12,8)	0,72 (0,07 – 7,17)	1,00
Alelo G	22 (95,7)	84 (86,6)	<i>Ref</i>	1	-	41 (87,2)	<i>Ref</i>	-	8 (88,9)	41 (87,2)	<i>Ref</i>	1
Alelo A	6 (26,1)	48 (49,5)	0,47 (0,18 – 1,25)	0,12	-	25 (53,2)	-	-	3 (33,3)	21 (44,7)	0,73 (0,17 – 3,05)	1,00

+V = Cepas de *H. Pylori* mais Virulentas (VacS1+Ilha Cag-Pai completa); -V = Cepas de *H. Pylori* mais Virulentas (VacS1+Ilha Cag-Pai incompleta e VacS2); CG-I = Câncer Gástrico Intestinal; CG-D = Câncer Gástrico Difuso