



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MORGANA MARIA DE OLIVEIRA BARBOZA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS E ENZIMAS DE REPARO
E GENES DE VIRULÊNCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* NA PROGRESSÃO DAS
DOENÇAS GÁSTRICAS: INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES**

FORTALEZA

2019

MORGANA MARIA DE OLIVEIRA BARBOZA

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS E ENZIMAS DE REPARO E
GENES DE VIRULÊNCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* NA PROGRESSÃO
DAS DOENÇAS GÁSTRICAS: INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia no ponto focal na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B214p Barboza, Morgana Maria de Oliveira.
Polimorfismos genéticos de interleucinas e enzimas de reparo e genes de virulência de *Helicobacter pylori* na progressão das doenças gástricas: investigação de biomarcadores / Morgana Maria de Oliveira Barboza. – 2019.
142 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.
1. Gastropatias. 2. Polimorfismo . 3. Interleucinas. 4. Reparo do DNA. 5. *Helicobacter pylori*. I. Título.
CDD 660.6
-

MORGANA MARIA DE OLIVEIRA BARBOZA

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINAS E ENZIMAS DE REPARO E
GENES DE VIRULÊNCIA DE *HELICOBACTER PYLORI* NA PROGRESSÃO
DAS DOENÇAS GÁSTRICAS: INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia
da Universidade Federal do Ceará como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Biotecnologia. Área de concentração:
Biotecnologia em Saúde.

Aprovado em: 24/07/2019

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Salim Khayat
Universidade Federal do Pará (UFPA)

À minha família, que pacientemente suportou todos os dissabores, me amou e me apoiou. Ao “seu Pedro” (*in memoriam*), patriarca da minha segunda família, porque ele queria ver os filhos formados.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelos incontáveis milagres que testemunho, por me confortar com Seu amor e pela força que vem do alto.

Ao programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste em Biotecnologia pela oportunidade e compreensão e, especialmente, aos coordenadores, Prof. Dr. Ivanildo Silva que teve muita sensibilidade e compreensão e à Dra. Vânia Melo.

À CAPES, pelo financiamento que permitiu tantas horas de trabalho no laboratório.

À minha orientadora, Dra. Silvia Helena, por tudo! Pela oportunidade, pelo aprendizado científico e tantos outros, pela sua sensibilidade e pelo seu esforço. Eu sei, foi muito difícil! Muito obrigada! Que sua caminhada seja um sucesso ainda maior.

Aos membros da banca, Prof. Dra. Raquel Montenegro, Dra. Débora Castelo Branco, Dr. Edson Teixeira, Dr. André Salim, Dr. Reinaldo Oriá e Dra. Caroline Nunes por seu precioso tempo e conhecimento dedicados a apreciação deste trabalho.

Ao Dr. Reginaldo Costa, um exemplo de pessoa, de liderança e de profissionalismo. Meu maior articulador no Instituto do Câncer do Ceará. Esteve comigo quando precisei de mais amostras e apoiou o trabalho desde o início. Obrigada pelas conversas deliciosas (eram quase sempre sobre comida!) e por tudo que vi e aprendi sobre endoscopia.

Aos colaboradores dos hospitais parceiros: HUWC, HGF, SCMF, HOL, HJB e ICC.

A todos os pacientes que participaram deste estudo. Sem eles, nada seria possível. Que no futuro possamos trazer alívio.

Aos profs. Drs. João Paulo e Gustavo da UFC e Dr. Paulo da Unifor pelas diversas discussões sobre os métodos estatísticos.

À Dra. Lidiane que me acompanhou em momentos difíceis.

Aos profissionais da CPASE, em especial, a Ivoneide, a Nelly e a Dra. Sandra. E também ao senhor Narcélio da Pós-graduação. Vocês sabem como ninguém receber e cuidar das pessoas. São uma inspiração para mim.

Ao senhor Adil pela prontidão em atender os alunos.

Ao LABGEM pelo aprendizado. Agradeço a Isabelle, Ana Paula, Débora, Eliane e Issac que me ensinaram a rotina e as técnicas que ainda não conhecia. Aos diversos IC's que passaram pelo laboratório, especialmente a Bárbara que esteve junta comigo na execução de parte deste trabalho, à Fabiane por ter me acompanhado em alguns momentos na coleta e ao Helder por

sua presença agradável. E o mais rico que levo do laboratório são as amigas que ali encontrei: Icaelle e Maíra.

À família Sousa de Moraes, minha segunda família! Sempre torcendo pelo meu bem, me acolhendo quando mais precisei, pelas tardes de café que foram tão aconchegantes. Agradeço especialmente a Maíra que me presenteou com esta família, ajudou com alguns polimorfismos, ensinou o método de extração *in house*, colaborou com a elaboração das minhas figuras, segurou minhas lágrimas e esteve sempre comigo. Amiga, você sabe o quanto ajudou neste trabalho. Amo você!

À minha família! Não há palavras suficientes para descrever o que eles representam na minha vida. São meus maiores fãs, meus amores, meu aconchego. Meus amores, amo vocês!

Aos meus amigos Sabrynna, Hassa, Leandro e Jota unidos pelas dificuldades e celebrando as superações. E à Priscila, sempre otimista e me acompanhando com suas orações.

Ao Eliclécio, meu amigo lindo, esteve comigo nos momentos bons e naqueles não tão bons assim. Ficou comigo até tarde ajudando com as referências. Amo você! Conte comigo!

Ao Bolinho (Luiz Felipe) que chegou no finalzinho já ajudando nas figuras do CART.

Aos meus filhos, Emanuele, Késia e Leo, e a agregada Regiane. Eles perceberam quando precisei de ajuda e estavam sempre juntos de mim com uma palavra motivadora e boas vibrações.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, ajudaram na construção deste trabalho.

Muito obrigada!

“E é por Cristo que temos tal confiança em Deus; Não que sejamos capazes, por nós, de pensar alguma coisa, como de nós mesmos; mas a nossa capacidade vem de Deus.”

2 Coríntios 3:4,5.

RESUMO

As doenças gástricas são muito frequentes e diversificadas, podendo, eventualmente, evoluir para o câncer. Fatores como infecção por *H. pylori* e polimorfismos genéticos do hospedeiro podem estar envolvidos no desfecho da doença. Desta forma, avaliamos a influência dos genes de *H. pylori* e polimorfismos genéticos das interleucinas *IL6-174*, *IL8-251*, *IL1 β -511* e *IL1RN* em lesões gástricas não malignas e das enzimas do sistema de reparo ao DNA *APE1 T2197G*, *XRCC1 G28152A*, *XRCC3 T18067C*, *MLH1-93 G>A* e *MGMT A533G* em lesões gástricas de diferentes gravidades. No primeiro ensaio, foram analisadas amostras de biópsias de pacientes submetidos à endoscopia. Na segunda investigação, incluímos pacientes encaminhados a gastrectomia. A detecção da presença e genes de *H. pylori* e a genotipagem de *IL1RN* foram realizadas por meio de PCR e os genótipos das demais interleucinas e enzimas de reparo foram identificados por RFLP-PCR. No estudo I, utilizamos 192 amostras, 40 casos de gastrite crônica inativa (GCI), 112 casos de gastrite crônica ativa (GCA) e 40 casos de metaplasia intestinal (MI). Para os polimorfismos de *IL6* e *IL8* encontramos uma associação do genótipo heterozigoto e o alelo polimórfico, respectivamente, com a GCI, principalmente em mulheres. Enquanto *IL8* polimórfico associou-se a GCA. Cepas de *H. pylori* positivas para os genes *cagA*, *cagE* e *virB11* foram mais frequentes na GCA e o gene *cagE* foi mais associado a MI. Na interação parasita-hospedeiro, pacientes portadores dos alelos polimórficos de *IL1B*, *IL1RN* ou *IL8* eram infectados com cepas mais virulentas. No estudo II, foram utilizadas 504 amostras, 102 GCI, 178 GCA, 74 MI e 150 cânceres gástrico subtipo intestinal (CG). Neste estudo, pacientes portadores do alelo polimórfico *XRCC1* associaram-se a uma diminuição do risco (O.R. 0.43) para o desenvolvimento de IM e GC, principalmente em homens, enquanto para *XRCC3* as mulheres heterozigotas mostraram uma redução do risco para a IM (O.R. 0.38). Por outro lado, o genótipo heterozigoto de *MLH1* estava associado ao CG em mulheres (O.R.6.69). Em análise haplotípica, verificamos que o heterozigoto de *XRCC1* em diversas combinações (*XRCC1* GA+ *MGMT* AA; *APE* TT e TG; *MLH1* GG) diminui o risco para IM e CG. Indivíduos com genótipo homozigoto selvagem de *MLH1* associaram-se a GCI enquanto os homozigotos polimórficos evoluíam para GCA na presença de cepas menos virulentas (sem *cagPAI/s2m2*). Os polimorfismos estudados podem ser biomarcadores prognósticos do câncer de estômago quando avaliados em conjunto com genes de *H. pylori*.

Palavras-chaves: Gastropatias. Polimorfismo. Interleucinas. Reparo do DNA. *H. pylori*.

ABSTRACT

Gastric diseases are very frequent and diverse, and may eventually develop into cancer. Factors such as *H. pylori* infection and host genetic polymorphisms may be involved in the outcome of the disease. In this way, we evaluated the influence of *H. pylori* genes and genetic polymorphisms of interleukins *IL6-174*, *IL8-251*, *IL1 β -511* and *IL1RN* on non-malignant gastric lesions and the DNA repair system enzymes *APE1 T2197G*, *XRCC1 G28152A*, *XRCC3 T18067C*, *MLH1-93 G> A* and *MGMT A533G* in gastric lesions of different severities. In the first trial, biopsy specimens from patients submitted to endoscopy were analyzed. In the second investigation, we included patients referred for gastrectomy. Detection of presence and *H. pylori* genes and *IL1RN* genotyping were performed by PCR and the genotypes of the other interleukins and repair enzymes were identified by RFLP-PCR. In study I, we used 192 samples, 40 cases of chronic inactive gastritis (ICG), 112 cases of chronic active gastritis (GCA) and 40 cases of intestinal metaplasia (MI). For the *IL6* and *IL8* polymorphisms we found an association of the heterozygous genotype and the polymorphic allele, respectively, with GCI, mainly in women. While polymorphic *IL8* was associated with GCA. *H. pylori* strains positive for the *cagA*, *cagE* and *virB11* genes were more frequent in GCA and the *cagE* gene was more associated with MI. In the parasite-host interaction, patients carrying the polymorphic alleles of *IL1B*, *IL1RN* or *IL8* were infected with more virulent strains. In study II, 504 samples were used, 102 GCI, 178 GCA, 74 MI and 150 intestinal gastric cancers (CG). In this study, patients with the *XRCC1* polymorphic allele were associated with a decreased risk for the development of MI and GC (O.R. 0.43), especially in men, while for *XRCC3* the heterozygous women showed a reduced risk for MI (O.R. 0.38). On the other hand, the heterozygote genotype of *MLH1* was associated with CG in women (O.R. 6.69). In a haplotypic analysis, we verified that the *XRCC1* heterozygote in several combinations (*XRCC1 GA* + *MGMT AA*, *APE TT* and *TG*, *MLH1 GG*) decreases the risk for MI and CG. Individuals with wild-type *MLH1* homozygous genotypes were associated to GCI while polymorphic homozygotes progressed to GCA in the presence of less virulent strains (without *cagPAI/s2m2*). The polymorphisms studied may be biomarkers of stomach cancer when evaluated in conjunction with *H. pylori* genes.

Keywords: Stomach diseases. Polimorphisms. Interleukins. DNA Repair. *H. pylori*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Representação topográfica do estômago.....	19
Figura 2	– Representação das recomendações para a classificação das gastrites de acordo com o Sistema de Sydney.....	20
Figura 3	– Representação visual da classificação histológica de biópsias gástricas.....	20
Quadro 1	– Revisão da classificação de Sydney de 2002.....	21
Figura 4	– Avanço das lesões gástricas associada à infecção por <i>H. pylori</i>	22
Figura 5	– Representação dos sítios de infiltrado de polimorfonuclear na GCA.....	23
Figura 6	– Gastrite crônica ativa com intenso infiltrado na lâmina própria.....	24
Figura 7	– Folículos linfóides na gastrite crônica.....	24
Figura 8	– Metaplasia intestinal	25
Quadro 2	– Sistema OLGIM.....	26
Figura 9 A e B	– Câncer gástrico difuso e intestinal.....	28
Figura 10	– Da infecção por <i>H. pylori</i> ao câncer gástrico.....	29
Figura 11	– Microscopia eletrônica de <i>H. pylori</i>	32
Figura 12	– Ação da enzima uréase de <i>H. pylori</i>	33
Quadro 3	– Perfil de sensibilidade e especificidade de testes endoscópicos e não endoscópicos para identificar <i>H. pylori</i>	35
Figura 13	– Representação esquemática dos critérios para estabelecimento de colonização por <i>H. pylori</i>	36
Figura 14	– Representação de <i>cagPAI</i>	37
Figura 15	– Representação do sistema de secreção tipo IV de <i>H. pylori</i> e a translocação de <i>cagA</i>	38
Figura 16	– Desregulação das células epiteliais por CagA.....	39
Figura 17	– Reconhecimento e resposta primária à infecção por <i>H. pylori</i> e danos na mucosa gástrica.....	42
Figura 18	– Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene <i>IL1B</i> e <i>IL1RN</i>	43

Figura 19	– Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene <i>IL6</i>	44
Figura 20	– Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene <i>IL8</i>	45
Figura 21	– Ilustração esquemática do polimorfismo de <i>IL1RN</i>	47
Figura 22	– Mecanismo de dano oxidativo ao DNA na inflamação.....	50
Figura 23	– Mutação pontual por 8-nitroguanina e 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina.....	50
Figura 24	– Mecanismo de ação da via BER, destacando o papel das proteínas <i>APE-1</i> e <i>XRCC-1</i>	53
Figura 25 A e B	– Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica dos genes <i>APE1</i> (A) e <i>XRCC1</i> (B).....	53
Figura 26	– MMR: identificando o papel da proteína <i>MLH1</i>	54
Figura 27	– Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene <i>MLH1</i>	55
Figura 28	– Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene <i>MGMT</i>	55
Figura 29	– Mecanismo de ação da via HR e papel da proteína <i>XRCC3</i>	56
Figura 30	– Representação da posição cromossômica do gene <i>XRCC3</i>	56
Gráfico 1	– Distribuição das lesões gástricas não-câncer e câncer de acordo com a faixa etária.....	103
Gráfico 2	– Distribuição das lesões gástricas não-câncer e câncer de acordo com o gênero.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Oligonucleotídeos utilizados para detecção e genotipagem de <i>H. pylori</i>	66
Tabela 2	– Características da PCR-RFLP para os polimorfismos estudados.....	68
Tabela 3	– Frequência das lesões gástricas de acordo com o sexo e a idade.....	104
Tabela 4	– Análise comparativa da frequência dos polimorfismos genéticos de enzimas do reparo do DNA nas gastrites crônica inativa e ativa e cânceres gástrico intestinal do Ceará e do Pará.....	106
Tabela 5	– Análise comparativa entre as populações com câncer gástrico subtipo intestinal no Ceará e no Pará.....	107
Tabela 6	– Comparação entre gastrite crônica inativa e gastrite crônica ativa e o câncer gástrico do Pará e do Ceará de acordo com a idade.....	109
Tabela 7	– Comparação entre gastrite crônica inativa e gastrite crônica ativa o câncer do Ceará e do Pará de acordo com o gênero.....	110
Tabela 8	– Comparação de haplótipos utilizando GCI como referência.....	111
Tabela 9	– Comparação de haplótipos utilizando GCA como referência.....	112
Tabela 10	– Distribuição dos genes de <i>Helicobacter pylori</i> nas lesões não-malignas e câncer.....	113
Tabela 11	– Comparação dos genes de <i>H. pylori</i> distribuídos nas lesões gástricas não-malignas e o Câncer Gástrico do Ceará.....	115
Tabela 12	– Comparação dos genes de <i>H. pylori</i> distribuídos nas lesões gástricas não-malignas e o câncer gástrico do Pará.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
APE-1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
cagA	<i>citotoxin-associated gene A</i>
CG	Câncer gástrico
DDR	<i>Direct Reversal Repair</i>
GCA	Gastrite crônica ativa
GCI	Gastrite crônica inativa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HR	<i>Homologous Recombination</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Síntase Induzível
MGMT	<i>O6-metilguanina-DNA-metiltransferase</i>
MI	Metaplasia Intestinal
MLH-1	<i>MutL Homolog 1</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
NAP	<i>neutrophil activating protein</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Hidroxila
ON	Óxido Nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Th	Linfócito T auxiliar CD4 ⁺
TNF	<i>Tumoral necrose factor</i>
vacA	<i>Vacuolating cytotoxin A</i>
XRCC3	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 3</i>
XRCC-1	<i>X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 1</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará

HGF Hospital Geral de Fortaleza
ICC Instituto do Câncer do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	Dispepsias.....	18
2.1.1	<i>Gastrites</i>	18
2.1.1.1	<i>Gastrite Aguda</i>	21
2.1.1.2	<i>Gastrite Crônica Ativa e Inativa</i>	22
2.1.2	<i>Metaplasia intestinal</i>	24
2.2	Câncer Gástrico.....	26
2.2.1	<i>Câncer Gástrico Difuso e Intestinal</i>	27
2.3	Carcinogênese Gástrica.....	28
2.4	<i>Helicobacter pylori</i>	30
2.4.1	Descoberta.....	30
2.4.2	Taxonomia e Microbiologia.....	31
2.4.3	Diagnóstico.....	33
2.4.4	Infecção, Colonização e Fatores de Virulência de <i>H. pylori</i>	35
2.5	Resposta do Hospedeiro à Infecção por <i>H. pylori</i>	40
2.5.1	<i>Interleucina-1β e Receptor antagonista da IL-1</i>	43
2.5.2	<i>Interleucina-6</i>	44
2.5.3	<i>Interleucina - 8</i>	45
2.6	Polimorfismos Genéticos em Genes de Interleucinas.....	45
2.7	Estresse Oxidativo e Dano ao DNA e.....	49
2.8	Vias de Reparo do DNA.....	51
2.8.1	<i>BER: APE-1 (Apurinic/aprimidinic endonuclease 1) e XRCC-1 (X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 1)</i>	52
2.8.2	<i>MMR: MLH-1 (MutL Homolog 1)</i>	54
2.8.3	<i>DDR: MGMT (O6-metilguanina-DNA-metiltransferase)</i>	54
2.8.4	<i>HR: XRCC3 (X-Ray Repair Cross Complementing 3)</i>	55
2.9	Polimorfismos Genéticos em Genes do Reparo do DNA associados a Doenças Gástricas.....	57
3	PERGUNTAS DE PARTIDA.....	59
4	HIPÓTESE.....	59

5	OBJETIVOS.....	60
5.1	Objetivo Geral.....	60
5.2	Objetivos Específicos.....	60
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
6.1	Casuística.....	62
6.2	Aspectos Éticos.....	62
6.3	Coleta de Material Biológico e Dados Clínico-Epidemiológico.....	63
6.4	Avaliação Histopatológica.....	63
6.5	Extração do DNA.....	63
6.6	Detecção e Genotipagem de <i>H. pylori</i>.....	64
6.6.1	<i>Presença e subtipos do gene vacA</i>.....	65
6.6.1.1	<i>vacA s1 e s2</i>.....	65
6.6.1.2	<i>vacA m1 e m2</i>.....	65
6.6.2	<i>Detecção do gene cagA</i>.....	65
6.6.3	<i>Detecção do gene cagE</i>.....	66
6.6.4	<i>Detecção do gene virB11</i>.....	66
6.7	Detecção dos Polimorfismos Genéticos em Genes de Reparo do Hospedeiro.....	67
6.8	Análise Estatística.....	69
7	RESULTADOS.....	70
7.1	Artigo I - Polymorphisms of interleukins in gastric lesions: gender and <i>Helicobacter pylori</i> genes matter.....	70
7.2	Artigo II - Association of polymorphisms of DNA repair genes with gastric cancer development.....	85
7.3	Resultados	103
7.3.1	<i>Caracterização da amostra</i>	103
7.3.2	<i>Análise comparativa entre as lesões não-malignas e o Câncer Gástrico do Ceará e do Pará</i>	105
7.3.3	<i>Análise comparativa entre os Cânceres Gástricos do Ceará e do Pará</i>.....	105
7.3.4	<i>Análise comparativa entre lesões gástricas não-malignas e o câncer gástrico do Ceará e do Pará de acordo com a idade</i>.....	107
7.3.5	<i>Análise Comparativa entre as lesões não-malignas com o câncer gástrico do Ceará e do Pará de acordo com o gênero</i>.....	108

7.3.6	<i>Análise comparativa entre os haplótipos dos genes das enzimas de reparo estudadas nas lesões gástricas.....</i>	111
7.3.7	<i>Detecção de Helicobacter pylori.....</i>	113
7.3.8	<i>Comparação dos genes de H. pylori nas lesões gástricas.....</i>	113
7.3.9	<i>Análise agrupada dos genes de cagPAI de acordo com a lesão gástrica.....</i>	117
7.3.10	<i>Polimorfismos Genéticos e Helicobacter pylori.....</i>	117
8	DISCUSSÃO.....	118
9	CONCLUSÃO.....	121
	REFERÊNCIAS.....	122
	ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFC.....	133
	ANEXO II – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HGF.....	134
	ANEXO III – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO ICC.....	135
	ANEXO IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA AS AMOSTRAS DE CÂNCER GÁSTRICO.....	137
	ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA AS AMOSTRAS DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS.....	139
	ANEXO VI – FICHA DE COLETA CÂNCER GÁSTRICO.....	141
	ANEXO VII – FICHA DE COLETA DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS.....	142

INTRODUÇÃO

As doenças gástricas são um importante problema de saúde pública. Uma das causas mais comuns de visita médica, a gastrite, está envolvida em um longo processo de alterações histológicas que foram comparadas a um estado estacionário com um fluxo de entradas e saídas limitadas mas com um movimento de avanço constante. O estágio final destas transformações progressivas na mucosa está associada ao desenvolvimento do câncer gástrico do subtipo intestinal.

A estratégia mais promissora para controlar o câncer de estômago é a detecção precoce de lesões pré-neoplásicas, considerando o longo percurso evolutivo. A gastrite representa a primeira etapa no encadeamento de lesões gástricas e comumente é associada à infecção por *Helicobacter pylori*. Controversamente, mais da metade da população mundial está infectada por esta bactéria e apenas uma pequena parcela progride numa cascata de eventos, influenciada por diferentes condições internas e externas, que podem culminar no desenvolvimento do câncer, configurando uma doença multifatorial.

Dentre os fatores envolvidos na carcinogênese gástrica estão incluídos os fatores genéticos do hospedeiro e da bactéria. Como o processo inflamatório é o evento principal associado ao dano progressivo na mucosa é interessante avaliar se polimorfismos genéticos em interleucinas inflamatórias podem diferenciar o curso da doença e incitar a evolução de lesões precoces. Outro aspecto relevante que merece atenção é investigar se a capacidade do hospedeiro em reparar potenciais danos ao DNA provocados pelo estresse oxidativo do processo inflamatório podem estar envolvidos na transformação celular. Somado a isso, a infecção por cepas de *H. pylori* que possuem mais fatores de virulência, tais como: *vacA s1m1*, *cagA*, *cagE* e *virB11*, está relacionada a um maior risco de progressão de lesões pré-neoplásicas.

Desta forma, a avaliação de aspectos genéticos do hospedeiro e da bactéria podem elucidar os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico e auxiliar na identificação precoce de indivíduos de risco, o que motivou a realização deste trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dispepsias

As doenças dispépticas são muito comuns envolvendo cerca de 25% a 40% da população mundial, conseqüentemente, configuram-se como um problema de saúde pública na área de gastroenterologia, ocasionando altos investimentos em diagnóstico e tratamento além de representar 5% das visitas clínicas gerais. Comumente, as dispepsias envolvem síndromes clínicas benignas que se caracterizam por apresentar sintomas relacionados ao trato gastrointestinal superior, isto é, disfunções cloridro-pepticas que podem incluir dor aguda, crônica ou recorrente ou ainda desconforto (ASFELDT *et al.*, 2008; SILVA, 2008; EMARA; SALANA; SALEM, 2017).

De acordo com o consenso de Roma III, as dispepsias podem ser classificadas em (1) funcionais, cuja causa óbvia dos sintomas não é identificada podendo envolver achados morfológicos menores, como a gastrite, ou ainda não apresentar alterações, e (2) orgânicas, que inclui a úlcera (SILVA, 2008). Outros autores trazem à luz que a gastrite crônica e o infiltrado neutrofílico representam alterações na mucosa, mesmo que nenhuma lesão macroscópica possa ser detectada na endoscopia, e portanto a gastrite faz parte do roll de doenças orgânicas. Além disso, há um risco de progressão da lesão na doença orgânica enquanto na dispepsia funcional raramente o paciente desenvolve doença maligna, diferenciando-as quanto ao acompanhamento regular do paciente (WEI *et al.*, 2014). O câncer, por sua vez, não é uma doença péptica, mas devido ao acometimento do estômago este pode determinar sintomas dispépticos (SILVA, 2008).

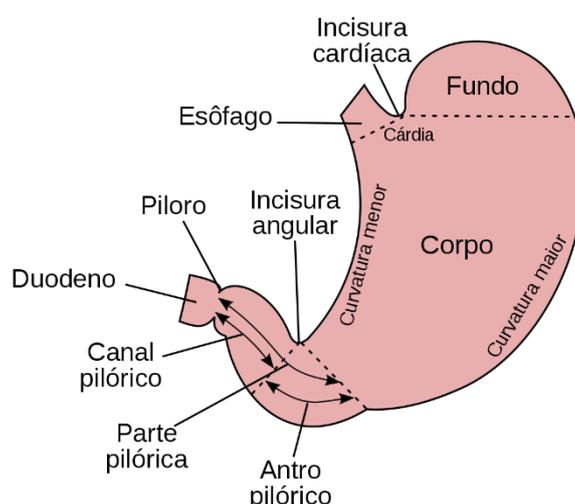
2.1.1 Gastrites

A gastrite é caracterizada por um quadro inflamatório de origem infecciosa ou auto-imune que pode ser acompanhada de dano na mucosa gástrica exibindo alterações relacionadas a etiologia e a resposta do hospedeiro. Não há uma classificação universal para as gastrites, no entanto, estas podem ser categorizadas de acordo com a duração e a etiologia gástrica (KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014).

A primeira classificação das gastrites ocorreu em 1947, categorizando-as em aguda e crônica. A gastrite crônica ainda podia ser categorizada como superficial e atrófica. Porém, com

os experimentos de Marshall e Warren na década de 80 sobre o desenvolvimento de gastrite após infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, diversos gastroenterologistas se reuniram no *World Congresso of Gastroenterology*, em Sidney, na Austrália, e decidiram por uma nova categorização orientada para etiologia tanto quanto fosse possível, objetivando maior reprodutibilidade diagnóstica e utilidade clínica. O novo sistema envolve achados topográficos, morfológicos e etiológicos, com destaque para a topologia (figuras 1 e 2) (SIPPONEN; PRICE, 2011, KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014). Ainda na década de 90, Correa elaborou um gráfico enfatizando a importância dos achados de gastrite, atrofia e metaplasia, assim, estes foram incluídos no sistema de classificação de Sydney (CORREA, 1995).

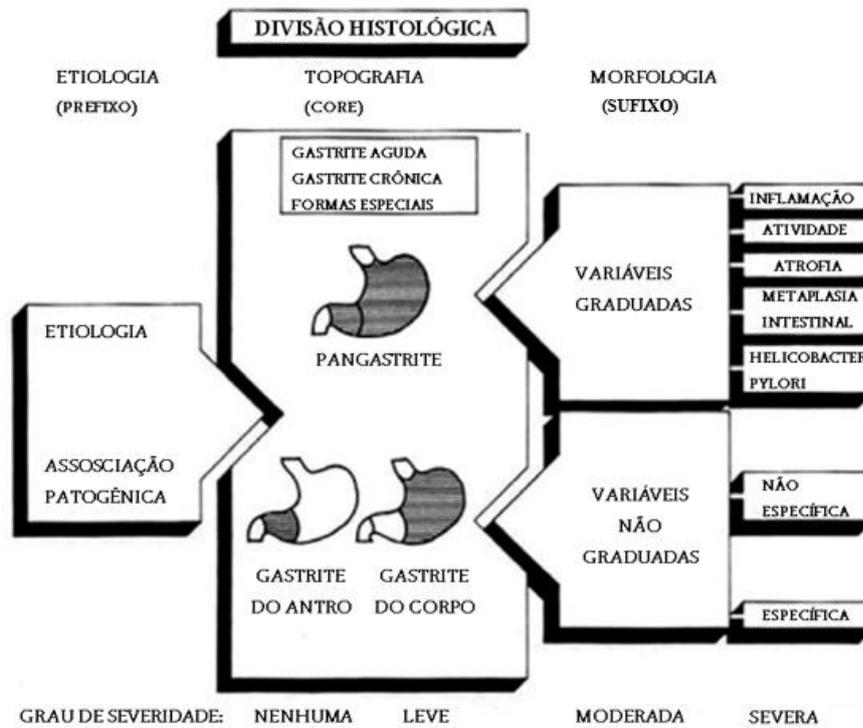
Figura 1 - Representação da topografia do estômago.



Fonte: Carvalheiro *et al.*, 2017. Carvalheiro *et al.*, 2017. Do ponto de vista funcional e histológico é dividido em três partes de acordo com o tipo de glândula: antral, fúndica e cárdica. A cárdica ocupa uma área que se localiza poucos centímetros abaixo junção gastroesofágica e possui elementos de glândula fúndica intercalada, principalmente células parietais. O fundo é formado por células parietais e células principais (produtoras de pepsinogênio e lipase gástrica). A região proximal do antro contém células fúndicas misturadas a células antrais.

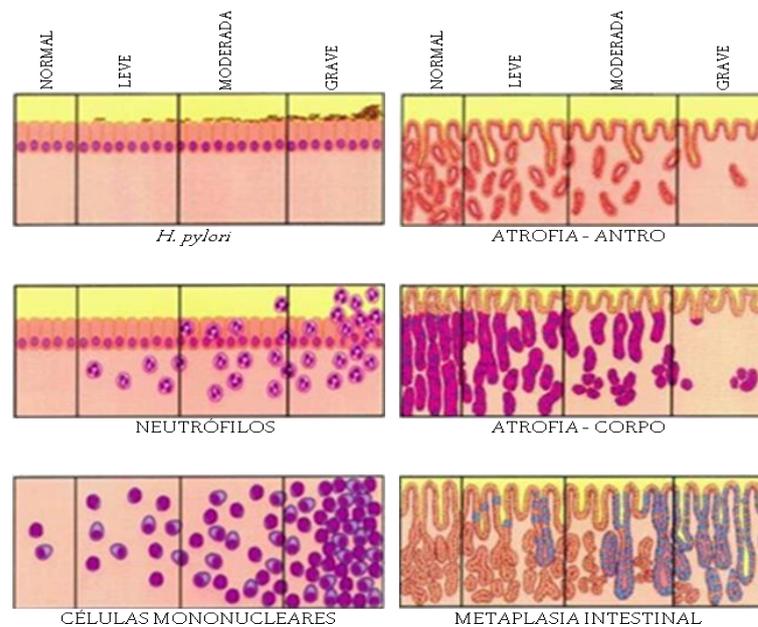
Neste sistema, as gastrites são divididas em atróficas, não atróficas e especiais. As gastrites não atróficas, ou apenas gastrite, são subdivididas em aguda e crônica. A gastrite crônica pode ser categorizada como inativa ou ativa. O termo “atividade” foi proposto inicialmente em 1972 por Whitehead, Truelove e Gear e foi incorporado no Sistema de Sydney (SIPPONEN; PRICE, 2011; KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014).

Figura 2 - Representação das recomendações para a classificação das gastrites de acordo com o Sistema de Sydney de 1990.



Fonte: Modificada de Price, 1991.

Figura 3 - Representação visual da classificação histológica de biópsias gástricas



Fonte: Modificada de Dixon, Gente e Correa, 1997. A classificação das biópsias gástricas é feita de acordo com a presença de *H. pylori*, infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares e graus de atrofia e metaplasia.

Ao longo dos anos, o Sistema de Sydney passou por revisões e, em 1997, os gastroenterologistas americanos, Dixon, Genta, Yardley e Correa, forneceram uma escala visual para a classificação histológica proposta em Sydney (figura 3). No entanto, diversas dúvidas ainda pairavam sobre a diferenciação de quadros atróficos culminando de nova publicação, em 2002, da mesma equipe que idealizou a primeira classificação de Sydney (quadro 1) (KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014).

Quadro 1 - Revisão da Classificação de Sydney de 2002.

Característica	Definição	Instruções para graduação
Inflamação crônica	Aumento de linfócitos e células plasmáticas na lâmina própria	Leve, moderada ou severa de acordo com a densidade
Atividade	Infiltrado neutrofilico na lâmina própria, poços ou superfície epitelial	Menos que um terço dos poços e superfícies – leve, de um terço a dois terços – moderada, mais que dois terços – severa
Atrofia	Perca de glândulas especializadas do antro ou corpo	Leve, moderada ou severa
Metaplasia intestinal	Metaplasia intestinal do epitélio	Menos que um terço da mucosa envolvida – leve, de um terço a dois terços – moderada, mais que dois terços – severa
<i>H. pylori</i>	Densidade de <i>H. pylori</i>	Poucos organismos cobrindo um terço da superfície – colonização leve, grandes agrupamentos ou cobertura contínua de dois terços da superfície – severa, número intermediário – colonização moderada

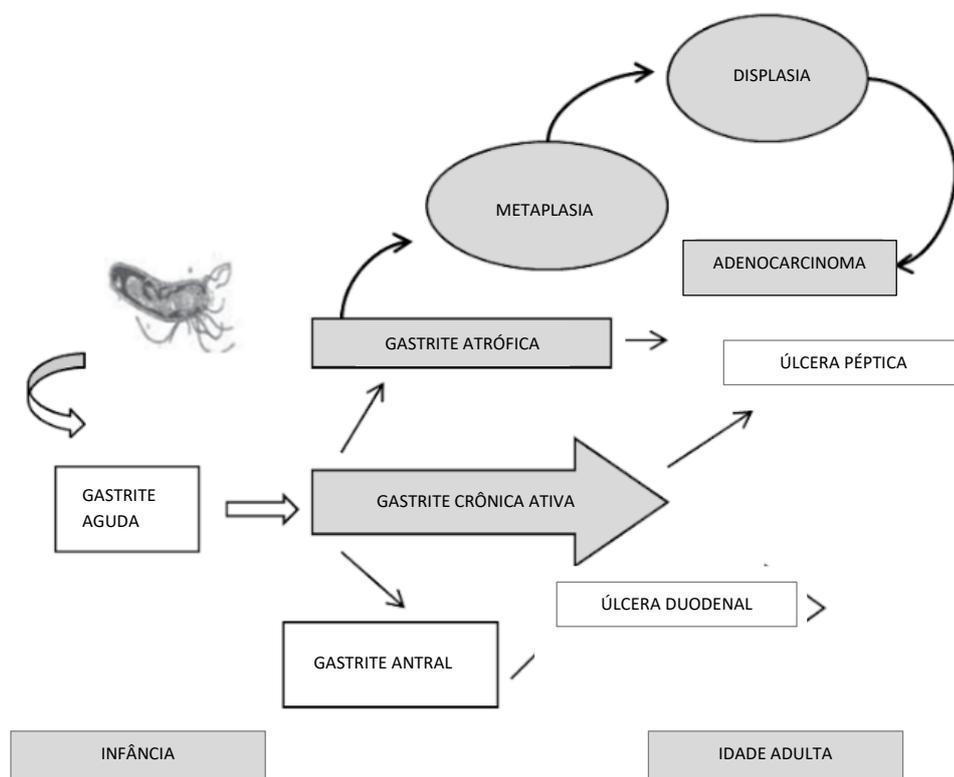
Fonte: Modificado de Kayaçetin; Güreşçi, 2014.

2.1.1.1 Gastrite Aguda

É um tipo transiente de gastrite, de início agudo, de curta duração, podendo ou não estar associada a quadros hemorrágicos. Sua observação em biópsias de rotina é rara e possui etiologia diversa que varia desde perturbações fisiológicas a infecções. É caracterizada pela presença de células polimorfonucleares e deve ser feito diagnóstico diferencial de gastrite crônica ativa (KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014; EMARA; SALAMA; SALEM, 2017).

A primo-infecção por *H. pylori* é tipicamente uma gastrite aguda, ocorrendo depleção de mucina, esfoliação celular e alterações regenerativas. Após algumas semanas, ocorre um gradual aumento de células inflamatórias crônicas, dando lugar a gastrite crônica ativa (figura 4) (DANI; PASSOS, 2011).

Figura 4 - Representação esquemática da progressão da lesão gástrica após infecção por *H. pylori*.



Fonte: Modificado de Mihály *et al*, 2014. Em cinza está representada a cascata de Correa.

2.1.1.2 Gastrite Crônica Ativa e Inativa

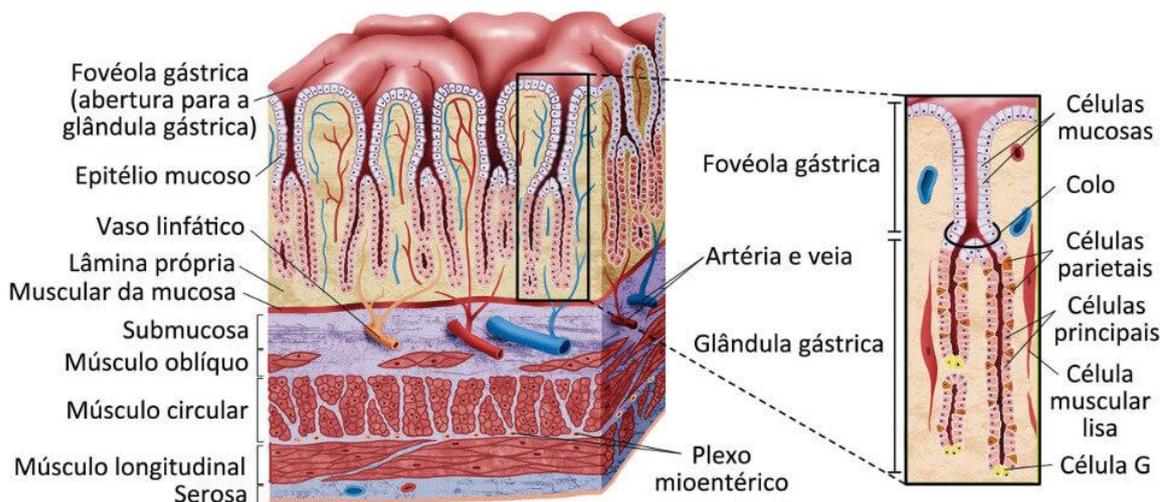
A gastrite crônica é comumente relacionada à infecção por *H. pylori*, cerca de 80% dos indivíduos são assintomáticos e 15-20% apresentaram morbidade. Na histopatologia são encontradas células mononucleares na lâmina própria, cuja contagem classifica a severidade da gastrite (CHIARINI *et al.*, 2009).

A gastrite crônica inativa pode representar tratamento prévio de *H. pylori* ou uso de fármacos lesivos (DIXON *et al*, 1996). Em um estudo com voluntários que ingeriram uma cepa de *H. pylori*, não foram observadas células inflamatórias agudas nestes pacientes após a cura (GRAHAN *et al*, 2004). Comumente, a gastrite crônica inativa não é relacionada a infecção por *H. pylori* apesar de alguns autores detectarem a presença da bactéria neste tipo de lesão (GENTA; TURNER; SONNERBEGGER, 2017).

Por outro lado, a gastrite crônica ativa é o padrão mais comum de inflamação em países com uma baixa incidência do câncer gástrico, estando localizada principalmente na região antral, com comprometimento maior da região foveolar, avançando para a região proximal (figura 5). Indivíduos em tratamento prolongado com inibidores de bomba de prótons

aumentam o risco de desenvolver o câncer gástrico devido à promoção da colonização em direção ao corpo gástrico (SLEISENGER; FORDTRAN, 1993; CHEUNG *et al*,2018).

Figura 5 - Representação esquemática de corte longitudinal de tecido gástrico.

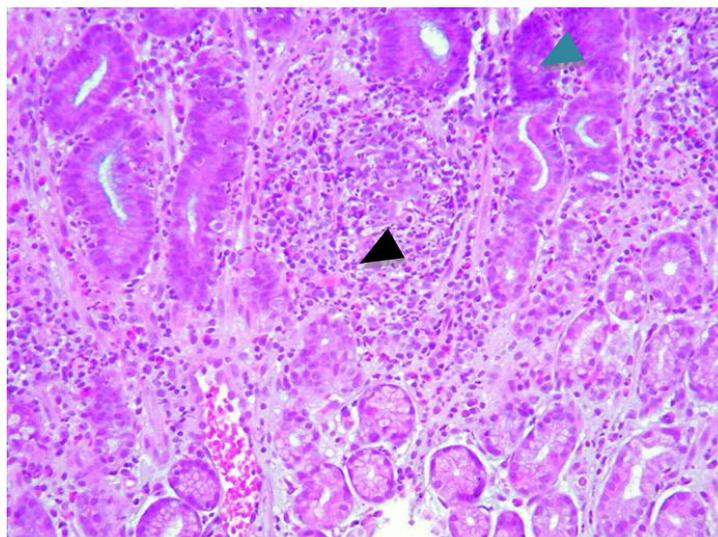


Fonte: Carvalheiro *et al.*, 2017. Na figura, é demonstrada a região foveolar, principal localização da gastrite crônica ativa.

A presença de um infiltrado polimorfonuclear na lâmina própria, foveola ou epitélio superficial indica “atividade” da gastrite (figura 6). Nestes casos, também é possível observar folículos linfóides (figura 7). Hoje, esse fenômeno é considerado um reflexo da reação do hospedeiro em resposta a infecção por *H. pylori* além de ser fortemente associado ao risco de progressão para a atrofia, lesão caracterizada pela perda glandular da mucosa. A evolução para atrofia, muitas vezes, está relacionada a cepas produtoras de toxinas (SIPPONEN; PRICE, 2011).

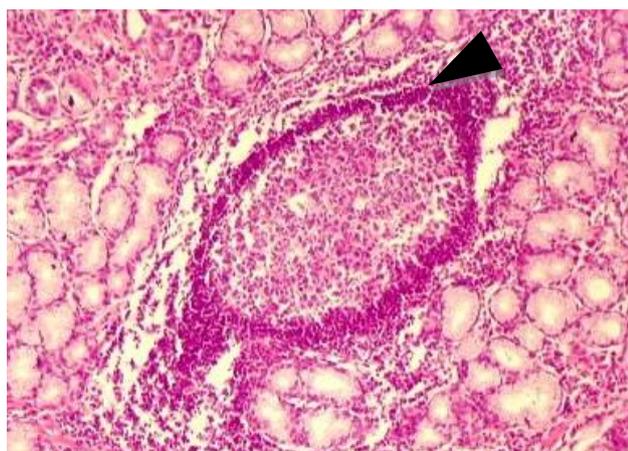
Além do infiltrado mononuclear e polimorfonuclear na lâmina própria, ainda podem ser observadas alterações epiteliais como depleção de células produtoras de mucina, aumento de nucléolo e aparecimento de figuras mitóticas. A aparência endoscópica pouco se correlaciona com a detecção da gastrite não atrofica. Em crianças, a presença de nódulos antrais pode indicar presença de *H. pylori* e hiperplasia linfóide (SLEISENGER; FORDTRAN, 1993; KAYAÇETIN; GÜREŞÇI, 2014).

Figura 6 - Gastrite crônica ativa com intenso infiltrado na lâmina própria.



Fonte: Adaptado de Grahan *et al*, 2004. Ponta de seta preta: polimorfonuclear. Ponta de seta verde: células mononucleares.

Figura 7 - Folículos linfóides na gastrite crônica.

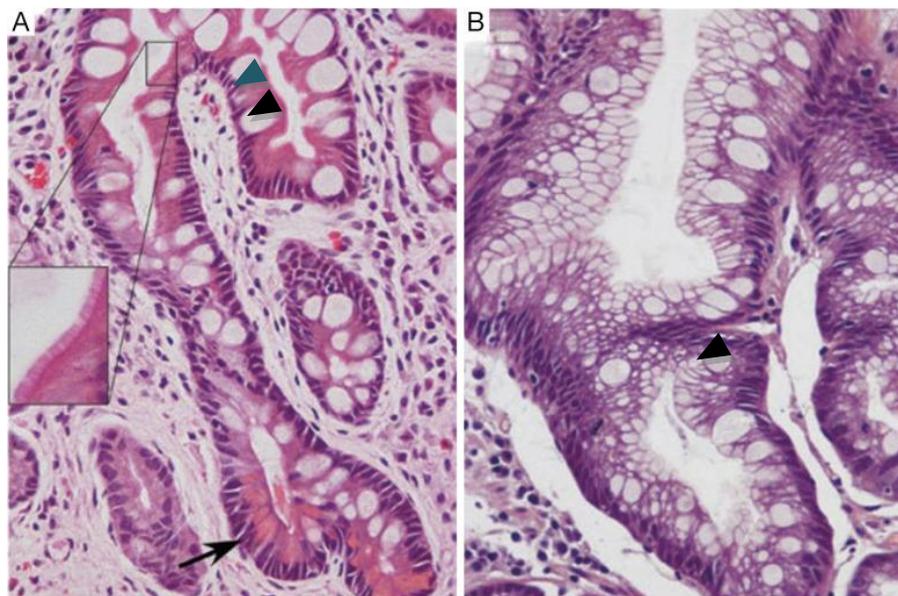


Fonte: Unicamp. Disponível em <http://anatpat.unicamp.br/lamgti1.html>. Os folículos estão relacionado à infecção por *H. pylori* e podem exibir centros germinativos ou apenas apresentar adensamento de linfócitos.

2.1.2 *Metaplasia intestinal*

As alterações histológicas no estômago são mais severas nas áreas onde a produção de ácido é menor. À medida que a inflamação crônica avança há uma perda de células parietais e diminuição da secreção ácida que caracterizam o surgimento de gastrite atrófica. A falha na substituição de células parietais somado à pressão seletiva do microambiente pode resultar em metaplasia intestinal (figura 8) (DORE *et al*, 2018; PELETEIRO *et al*, 2010).

Figura 8 - Metaplasia Intestinal.



Fonte: Weledij, Orock, Ngowe, 2014. A figura 8A apresenta metaplasia intestinal completa com células de Globet bem definidas (ponta de seta preta) alternando com enterócitos eosinofílicos (ponta de seta verde) exibindo borda de escova bem desenvolvida (aumento) e células de paneth (seta); A figura 8B apresenta a metaplasia intestinal incompleta que se assemelha a um epitélio colônico, com várias gotículas de mucina intracitoplasmática, semelhante a um vacúolo (ponta de seta) de tamanhos variados e ausência de borda de escova (Hematoxilina e eosina, ampliação original $\times 400$).

A metaplasia intestinal é uma alteração morfológica observada em alguns casos de gastrite crônica. É caracterizada pela substituição do epitélio superficial, foveolar e glandular na mucosa oxíntica ou antral por epitélio intestinal que representa uma transdiferenciação do epitélio gástrico para o epitélio intestinal em resposta a irritação persistente da mucosa, provocada principalmente pela infecção por *H. pylori*. É considerada uma lesão pré-neoplásica representando um aumento do risco de carcinoma gástrico do tipo intestinal (TABORDA; PROLLA, 2012; MORGAN, 2018).

É reconhecido que a metaplasia intestinal é heterogênea e vários sistemas de classificação têm sido utilizados (MORGAN, 2018). A fim de identificar uma melhor correlação com o risco de progressão neoplásica, recentemente foi proposta uma classificação de avaliação de gastrites que utiliza um sistema de estadiamento de acordo com a topografia e grau da metaplasia intestinal, denominada OLGIM (Operative Link on Gastritic Intestinal Metaplasia Assessment). Os autores afirmam que o novo sistema de classificação é mais reprodutível e assertivo por aumentar a concordância interobservador quando comparado ao sistema OLGA (Operative Link on Gastritis Assessment) que utiliza como principal parâmetro a gravidade e a extensão da atrofia (CAPELLE *et al*, 2010) (quadro 2).

Quadro 2 - Sistema OLGIM.

		Corpo			
	Escore de metaplasia intestinal	Ausência (escore 0)	Leve (escore 1)	Moderada (escore 2)	Severa (escore 3)
Antro (incluindo incisura angularis)	Ausência (escore 0)	Estágio 0	Estágio I	Estágio II	Estágio II
	Leve (escore 1)	Estágio I	Estágio I	Estágio II	Estágio III
	Moderada (escore 2)	Estágio II	Estágio II	Estágio III	Estágio IV
	Severa (escore 3)	Estágio III	Estágio III	Estágio IV	Estágio IV

Fonte: Modificado de Vries e Kuipers, 2010.

De acordo com o tipo celular predominante, a classificação de Filipe divide a metaplasia intestinal em completa e incompleta. A metaplasia do tipo I ou completa apresenta células de Globet, de Paneth, tecido absortivo, borda de escova e produz sialomucinas, assemelhando-se fenotipicamente ao intestino delgado. Os tipos II e III são metaplasias intestinais incompletas que possuem poucas células absortivas, células colunares intermediárias em vários graus de maturação, semelhante ao epitélio colônico, com múltiplas gotículas irregulares de mucina de tamanho variável no citoplasma que secretam sialomucinas e sulfomucinas, respectivamente (figura 8). A metaplasia do tipo incompleta tem sido mais associada a progressão para o câncer gástrico, no entanto, sua incidência é menor o que faz com que ambas as metaplasias intestinais contribuam de forma semelhante para o desenvolvimento global de câncer de estômago (DINIS-RIBEIRO *et al.*, 2011; WELEDIJ; ZULLO *et al.*, 2012; OROCK; NGOWE, 2014; MALIK *et al.*, 2017).

Apesar do detalhamento histológico na classificação de Filipe, os sistemas de Sydney, OLGA e OLGIM parecem ser superiores e melhores preditores do risco de câncer gástrico. Por fim, os atuais sistemas de classificação ainda são difíceis de serem aplicados na prática clínica e, quando aplicados, têm a desvantagem de variação interobservador (DINIS-RIBEIRO *et al.*, 2011).

A persistência da metaplasia intestinal leva ao desenvolvimento da displasia gástrica, caracterizada pela presença de epitélio neoplásico benigno sem invasão tecidual e associada a inflamação subjacente. A displasia é uma lesão pre-maligna e precursora imediata do câncer gástrico intestinal (SUNG, 2016)

2.2 Câncer Gástrico

Apesar dos recentes relatos de declínio da incidência de câncer gástrico em algumas regiões do mundo, este ainda é a terceira principal causa de mortalidade por câncer. A doença em estágio avançado representa uma sobrevivência global de apenas um ano. No Brasil, ocupa a terceira posição em homens e a quinta em mulheres, com incidência maior entre os homens acima de 50 anos. Para o biênio 2018-2019 é esperado 21.290 novos casos de câncer de estômago no Brasil, 13.540 em homens e 7.750 em mulheres, por ano (GULLO *et al.*, 2017; INCA, 2018; GLOBOCAN, 2018).

A incidência varia entre as diferentes regiões geográficas brasileiras, com maior impacto nas regiões norte e nordeste. Nas cidades de Belém - Pará e Fortaleza - Ceará, localizadas nas regiões norte e nordeste, respectivamente, o câncer gástrico apresenta o mesmo índice de incidência, ocupando a segunda posição entre os homens e a quarta entre as mulheres (INCA, 2018). Este resultado pode ser reflexo da similaridade da composição genética destas populações quanto a herança europeia (61,0% e 6,0%, respectivamente), com uma sutil variação quanto a herança africana (3,0% e 2,7%, respectivamente) e ameríndia (3,6% e 5,2%, respectivamente). De acordo com o IBEG, as regiões norte e nordeste do Brasil são predominantemente compostas por indivíduos pardos que representam a população miscigenada do país (PENA *et al.*, 2011; MANTA *et al.*, 2013).

Geograficamente, o câncer de estômago é mais frequente onde o índice de desenvolvimento humano é baixo ou médio. Há ainda relatos de alta variabilidade na distribuição do câncer gástrico dentro de um país (MONTERO-OLEAS *et al.*, 2017).

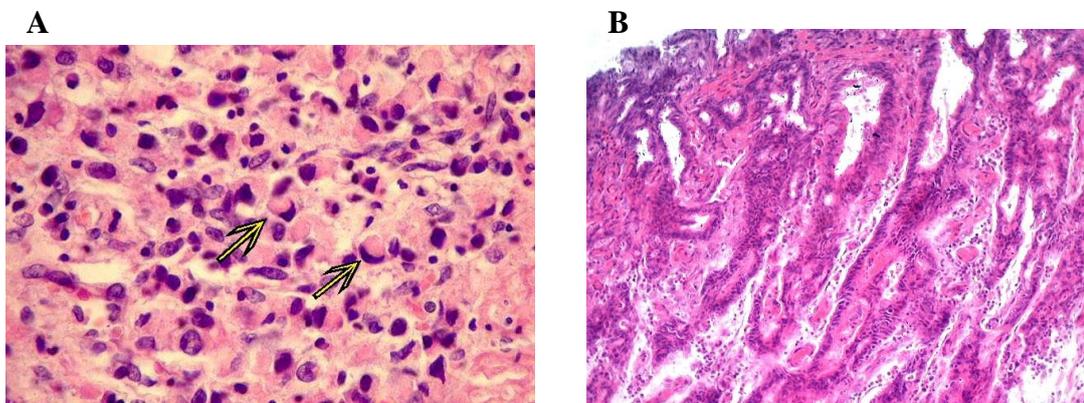
O câncer de estômago é categorizado em três tipos histológicos: adenocarcinoma, linfoma e leiomiossarcoma. O adenocarcinoma é mais incidente, representando mais de 90% dos tumores. De acordo com a classificação de Lauren (1965), os adenocarcinomas podem ser distinguidos histologicamente em dois tipos principais: intestinal e difuso. Estes ainda diferem quando a epidemiologia e mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese (MA *et al.*, 2016; INCA, 2017).

2.2.1 Câncer Gástrico Difuso e Intestinal

Os tumores difusos são menos diferenciados e apresentam células dispersivas que invadem o estroma, possuindo o núcleo em anel de sinete devido à compressão do muco intracelular (figura 9A). Normalmente acomete indivíduos mais jovens com predileção para

mulheres. O curso da doença é relativamente curto e possui um prognóstico ruim (MA *et al.*, 2016).

Figura 9 - Tipos de câncer gástrico.



Fonte: Unicamp. Disponível em <http://anatpat.unicamp.br/lamgti2.html>. Figura 9A. Câncer gástrico difuso, células com núcleo em anel de sinete (seta). Figura 9B. Câncer gástrico subtipo intestinal, formações tubulares.

Ao contrário do tumor difuso, o câncer gástrico subtipo intestinal é mais diferenciado e frequentemente é precedido de metaplasia intestinal com predileção pela região antral, no entanto, à medida que evolui torna-se corpo-dominante. Apresenta células tumorais bem aderidas e bem diferenciadas dispostas em formações tubulares ou glandulares (figura 9B). Este tipo de tumor afeta principalmente homens, negros e grupos mais velhos. O curso da doença é mais longo do que o tipo difuso e apresenta melhor prognóstico (CONTENDUCA *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2016).

Em ambos os mecanismos patogênicos envolvem metilação do DNA, modificações nas histonas e recombinação cromossômica e os fatores de risco envolvem os hábitos alimentares e os fatores ambientais. Contudo, o tipo intestinal está mais associado a fatores ambientais enquanto o difuso tem etiologia genética (MA *et al.*, 2016)

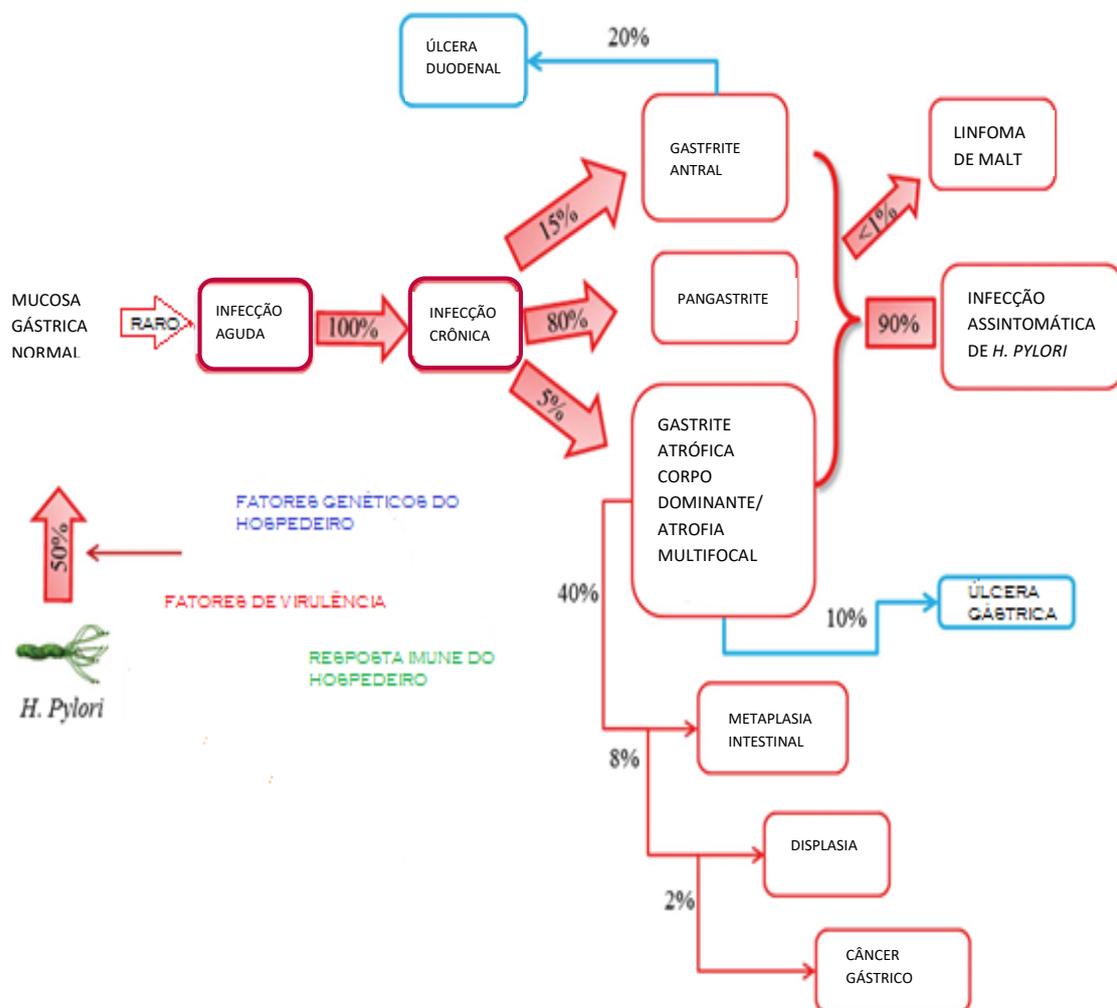
2.3 Carcinogênese Gástrica

O câncer gástrico é uma doença multifatorial que envolve fenômenos complexos por meio da combinação de fatores epigenéticos, genéticos, ambientais e infecciosos que interagem a favor da tumorigênese. A infecção por *H. pylori* é exaustivamente estudada no câncer de estômago, e representa um modelo de desenvolvimento de câncer como resultado de uma infecção microbiana e inflamação crônica estando intimamente relacionada ao subtipo intestinal (ZHANG; ZHANG; ABOUL-SOUD, 2017). Por este motivo, a bactéria foi classificada pela Organização Mundial da Saúde como um carcinógeno de classe I, o que

significa que há evidências suficientes de que o agente é carcinogênico para o homem (CONTENDUCA *et al.*, 2012; IARC, 2019).

O desenvolvimento do câncer gástrico subtipo intestinal se origina com a promoção da gastrite crônica ativa associada a infecção por *H. pylori*. O desenvolvimento da gastrite crônica a lesões pré-neoplásicas como atrofia e metaplasia intestinal dependem de diferentes fatores ambientais e do hospedeiro. Em alguns indivíduos, o epitélio metaplásico sofre novas alterações genômicas e fenotípicas resultando em displasia gástrica que, posteriormente, evolui para adenocarcinoma. Esta sequência de etapas histológicas bem definidas foi proposta por Correa, em 1992, e é amplamente aceita na comunidade científica e médica (figura 10) (CORREA, 1992; CONTENDUCA *et al.*, 2012; ZHANG; ZHANG; ABOUL-SOUD, 2017).

Figura 10 - Representação esquemática da combinação de fatores ambientais e do hospedeiro que interagem na evolução da doença gástrica.



Fonte: Modificado de Contenduca *et al.*, 2016.

O risco de evolução das lesões pré-neoplásicas a câncer gástrico é bastante variável. Para atrofia é encontrada uma variação de 0 a 2%, na metaplasia as taxas de progressão podem variar de 0 até 13%, e uma maior variação é vista na displasia, com associações que vão de 0 a 73% (CONTENDUCA *et al.*, 2012).

As alterações histológicas em indivíduos infectados por *H. pylori* podem ser maiores ou menores (RIBEIRO *et al.*, 2016). A colonização do estômago pela bactéria é tipicamente persistente e evoca uma resposta imunológica celular e humoral que muitas vezes não resulta na eliminação do patógeno. Na ausência de tratamento adequado a colonização pode durar por toda a vida (ALGOOD, 2006).

Estima-se que a bactéria colonize o estômago de aproximadamente metade da população mundial, com prevalência variável em diferentes países. Nas regiões orientais da Ásia e em algumas partes da América Latina a infecção ocorre em idade precoce, geralmente na infância, alcançando 80% da população até os 20 anos. Em contrapartida, em países desenvolvidos como a França, os EUA, o Reino Unido ou a Austrália, a prevalência da infecção é baixa em crianças menores de 10 anos, com um aumento de aproximadamente 40% em adultos com idade entre 30 a 40 anos (HOOI *et al.*, 2017).

Há algumas décadas a patogênese das dispepsias orgânicas, ou seja, aquelas nas quais os sintomas são justificados pelas alterações típicas na mucosa, eram atribuídas ao desbalanço entre a imunidade do hospedeiro e a secreção ácida. Contudo, com o isolamento da bactéria *H. pylori* por Marshall e Warren na década de 80 em pacientes com gastrite os princípios básicos da gastroenterologia sofreram profundas modificações (GUIMARÃES; CORVELA; BARILI, 2008).

2.4 *Helicobacter pylori*

2.4.1 *Descoberta*

A descoberta da bactéria *Helicobacter pylori* em 1982 por Robin Warren e Barry Marshall levou a profundas mudanças no conhecimento fisiopatológico, terapia e diagnóstico na gastroenterologia (VARON, 2014). Este microrganismo foi observado pela primeira vez em junho de 1979 em análise de biopsias de pacientes com inflamação da mucosa gástrica pelo patologista Warren, que empolgado com o achado e convencido da importância do mesmo continuou coletando amostras para demonstrar a presença da bactéria em tecido gástrico.

Porém, a aceitação de uma bactéria como agente causal de inflamações gástricas conflitava com o conhecimento da época sobre a possibilidade de uma bactéria crescer em ambiente ácido e hostil como o estômago. Sem desaminar, Warren testou diversas colorações para tentar identificar a bactéria que era vista como linhas azuis pelas colorações usuais em patologia. Foi então utilizado as colorações de Gram e Warthin-Starry, obtendo os melhores resultados na diferenciação das bactérias das células eucarióticas pela coloração de Warthin-Starry (PAJARES, 2006).

Em 1981, Marshall se interessou pelo trabalho de Warren e se dedicou a buscar uma técnica de cultivo para a nova bactéria que, provisoriamente, foi incluída no gênero *Campylobacter* devido a sua aparência curva e espiralada e, posteriormente, classificada como *Helicobacter pylori* devido a sua presença preferencialmente na região pilórica do estômago. A princípio, não foi fácil estabelecer a relação entre a bactéria e doenças gástricas devido a falha nos postulados de Koch (VARON, 2014). A fim de demonstrar que a nova bactéria provocava inflamação na mucosa gástrica Marshall ingeriu 30 ml de cultivo bacteriano isolado de um paciente com gastrite desenvolvendo a doença dentro de seis dias (MARSHALL *et al.*, 1985; PAJARES, 2006).

A bactéria foi posteriormente associada a úlcera gastroduodenal, linfoma de MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) e câncer gástrico, e atualmente é reconhecida como a principal causa da gastrite crônica (VALENZUELA, 1999, PASCUAL, IZAQUIRE, 2002; VARON 2014).

Pela notável descoberta e importante contribuição para medicina Warren e Marshall ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2005, a homenagem iniciou com o seguinte texto: “*Extraordinário e inesperado o descobrimento de que a inflamação do estômago (gastrite), assim como a úlcera de estômago ou duodenal (úlcera péptica), são resultado de uma infecção do estômago causada pela bactéria Helicobacter pylori*” (NOBELPRIZE, 2005).

Depois de Marsahl e Warren outros pesquisadores reproduziram os ensaios com voluntários que ingeriram cultivo em caldo e desenvolveram gastrite auto-limitada (MORRIS; NICHOLSON, 1987) e gastrite persistente que resultou em gastrite residual mínima mesmo após erradicação da bactéria (MORRIS *et al.*, 1991). Desde então, as publicações sobre o tema tem aumentado vertiginosamente.

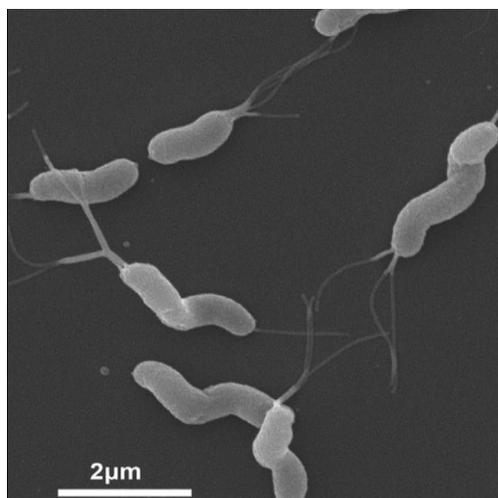
2.4.2 Taxonomia e Microbiologia

A inclusão deste microrganismo no gênero *Helicobacter* se deu após análise de ácidos graxos por cromatografia líquida e técnica molecular de hibridização por um grupo de pesquisadores liderado por Goodwin, em 1989 (PAJARES, 2006). O microrganismo possui um cromossomo circular único com cerca de 1.6 Kb (KERSULYTE *et al*, 2015) e de acordo com o Manual Bergey's a bactéria pertence ao filo Proteobacteria, classe Epsilonproteobacteria, ordem Campylobacterales, família Helicobacteraceae, gênero *Helicobacter* e espécie *Helicobacter pylori*.

Quanto às características morfológicas, caracteriza-se por ser Gram-negativa curva, espiralada ou fusiforme, com diâmetro de 0,2-1,2 x 1,5-10,0 μm (Figura 11). Pode apresentar forma cocóide quando exposta ao ar, em culturas antigas, quando o epitélio gástrico é modificado devido a diminuição do pH do meio e durante o uso de inibidor de bomba de prótons (ASSUMPCÃO *et al*, 2019). Apresenta motilidade devido a presença de flagelos, que podem ser polares ou bipolares, envoltos com uma bainha lipídica. É um microrganismo fastidioso que cresce em baixas condições de oxigênio (5-10% O_2 , 80-90% N_2), alta umidade (95%) e temperatura média (35-37°C), levando de 4 a 7 dias para o aparecimento de colônias típicas (BLANCHARD, NEDRUD, 2012; BERGEY'S, 2015).

São utilizados meios complexos para o cultivo, com adição de sangue de carneiro, ovelha ou coelho (por vezes os eritrócitos devem ser lisados), soro fetal bovino e antimicrobianos para inibir a microbiota contaminante sem prejudicar o isolamento de *H. pylori*, sendo mais comumente utilizado a vancomicina, o sulfametoxazol, o trimetoprim e a polimixina B. Como meio base podem ser usados ágar Columbia, Triptona de Soja, Brucella, Brain Heart Infusion e Müeller Hinton (ROJAS, 2013).

Figura 11 - Microscopia eletrônica de *H. pylori*.

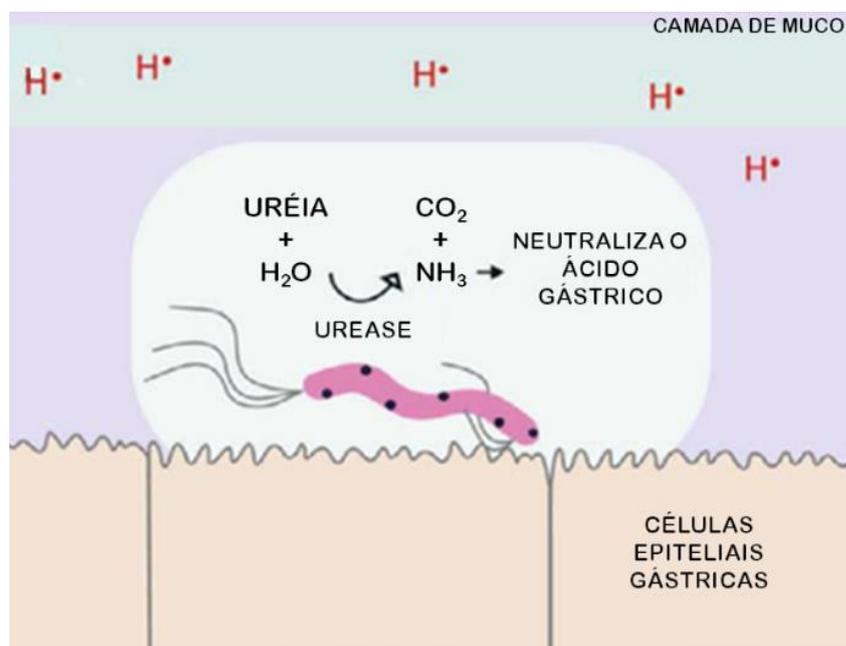


Fonte: Sycuro *et al*, 2013.

Devido à sensibilidade a condições ambientais as amostras devem ser processadas rapidamente e encaminhadas ao laboratório em até 6 horas em solução salina ou, se houver demora entre a coleta e o processamento, as amostras devem ser coletadas em meio de transporte Stuart em temperaturas baixas (4-8° C) por no máximo 24 horas. As amostras estomacais incluem biópsia e suco gástrico, podendo ainda ser utilizada a placa dental, amostras do esôfago e reto (ROJAS, 2013).

A identificação fenotípica inclui a pesquisa de catalase, citocromo-oxidase, lipase e urease (figura 12), esta última importante para a colonização do estômago por alcalinizar o meio pela conversão da uréia em amônia e CO₂, sendo ainda importante na estimulação de fagócitos, citocinas inflamatórias e plaquetas (ROJAS, 2013; WASSERMAN *et al.*, 2010).

Figura 12 - Ação da enzima urease de *H. pylori*.



Fonte: Modificado de Khan; Karin; Iqbal, 2009. Após a penetração da bactéria na mucosa gástrica, a liberação da urease alcaliniza o meio favorecendo sua multiplicação.

2.4.3 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *H. pylori* pode ser feito por métodos invasivos ou não. A escolha do método pode estar relacionada ao valor que se agrega à presença da bactéria (KHALIFEHGHOL *et al.*, 2013).

Dentre os métodos invasivos, a identificação da bactéria pode ser feita pela coloração de hematoxilina-eosina utilizada na histologia, principalmente na luz da superfície gástrica e nas células epiteliais da foveola gástrica, podendo ainda ser encontrada no espaço intercelular

de células parietais e na lâmina própria em pacientes com AIDS. O microrganismo tem preferência por áreas com células mucosas normais e não recobre áreas metaplásicas intestinais, cuja presença da bactéria deve ser investigada em áreas adjacentes. Quando surgem dúvidas sobre a presença da bactéria os corantes de Warthin-Starry e Giemsa podem facilitar a visualização em microscopia de luz clara (STEINER, 1993; LEE; KIN, 2015).

Apesar da cultura bacteriológica ser padrão-ouro, sua sensibilidade é menor que a sorologia ou histologia. Além disso, o crescimento microbiano não é capaz de indicar inflamação (STEINER, 1993). Na prática clínica, o teste de urease é um dos mais utilizados. Esse método explora a capacidade da bactéria em converter uréia em amônia e CO₂ aumentando assim o pH do meio, indicando positividade. Porém, para obter boa sensibilidade do método é necessária uma carga bacteriana de pelo menos 10⁵ UFC/mL, portanto, menos aconselhado para o seguimento após a erradicação quando a carga bacteriana diminui (KHALIFEHGHOL *et al.*, 2013). Por fim, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também depende de biópsia e não está amplamente disponível ou padronizada, portanto, não é prática para o diagnóstico de rotina (DIACUNO *et al.*, 2017).

Os testes sorológicos não dependem de biópsia e são muito úteis em estudos epidemiológicos para avaliação da infecção por *H. pylori* principalmente em indivíduos assintomáticos. A pesquisa de anticorpos pode ser feita no soro, em secreção gástrica, urina, saliva e outros fluidos. Contudo, os métodos sorológicos não devem ser empregados para avaliar a erradicação bacteriana, uma vez que a detecção de anticorpos demonstra a exposição à bactéria e não infecção atual. O teste de Elisa (ensaio imuno enzimático) é o método mais utilizado com sensibilidade e especificidade de cerca de 90% (STEINER, 1993; GUIMARÃES *et al.*, 2008). A precisão do ensaio sorológico depende do antígeno utilizado pelo kit diagnóstico e do estabelecimento de um ponto de corte de acordo com a epidemiologia local (WANG *et al.*, 2015). Já o teste de respiração de uréia, é fácil e preciso. Detecta dióxido de carbono marcado na respiração após ingestão de uréia. Um teste positivo significa que existe uma infecção ativa. Uma alternativa para não usar carbono radioativo é substituí-lo por carbono pesado (DIACUNO *et al.*, 2017).

O quadro 3 mostra a sensibilidade e especificidade dos testes discutidos.

Quadro 3 - Perfil de sensibilidade e especificidade de testes endoscópicos e não endoscópicos para identificação de *H. pylori*.

TESTE	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
Não endoscópicos		
Pesquisa de anticorpos (soro)	88-94%	74-88%
Pesquisa de anticorpos (sangue total)	67-85%	75-91%
Ensaio imuno-enzimático (soro)	86-94%	78-95%
Pesquisa de antígeno nas fezes	94%	92%
Teste de respiração de ureia	90-96%	88-98%
Endoscópicos		
Teste de urease (biópsia)	88-95%	95-100%
Histologia	93-96%	98-99%
Cultura	80-98%	100%
PCR	>95%	>95%

Fonte: Diaconu *et al.*, 2017.

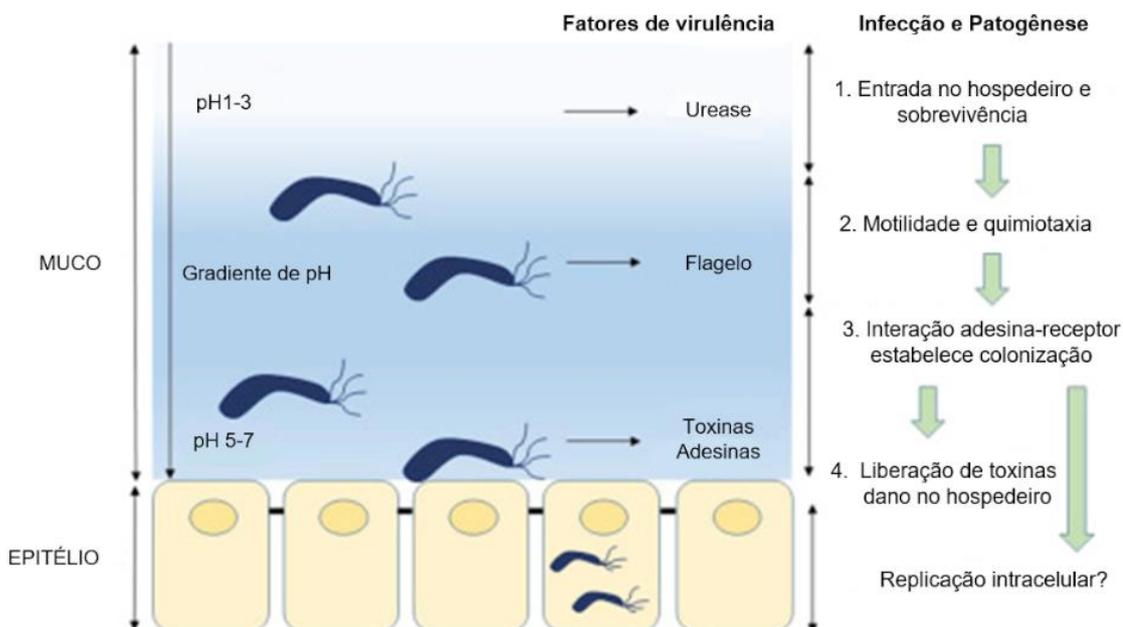
2.4.4 Infecção, Colonização e Fatores de Virulência de *H. pylori*

O primeiro contato com *H. pylori* se dá na infância através de contato direto com a saliva de indivíduos infectados, vômito ou matéria fecal. O risco de infecção é maior nos países em desenvolvimento devido às condições sanitárias deficientes. Residir com um indivíduo infectado ou viver em locais onde há aglomeração de pessoas são fatores que contribuem com a transmissão do microrganismo (DIACONU *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, *H. pylori* é considerado um patógeno não invasivo, contudo, os trabalhos de Dubois & Bóren (2007) e Fehlings *et al.*, (2012) demonstraram a capacidade de sobrevivência do microrganismo no interior de células imunes inatas através da inibição da maturação do fagossoma. Além do mais, Kao; Sheu e Wu (2016) sugerem a possibilidade de invasão das células epiteliais e multiplicação no interior de vesículas. Estes achados podem explicar a dificuldade em erradicar a bactéria.

As condições necessárias para estabelecer a infecção e colonização incluem a sobrevivência do microrganismo no ambiente ácido do estômago, deslocamento para as células epiteliais, fixação nas células do hospedeiro e liberação de toxinas com o consequente dano tecidual (figura 13) (KAO; SHEU; WU, 2016).

Figura 13 - Representação esquemática dos critérios para estabelecimento de colonização por *H. pylori*.



Fonte: Modificado de Kao; Sheu; Wu, 2016.

Dentro do hospedeiro, a bactéria utiliza a enzima urease para neutralizar a acidez do estômago e segue em direção às células do epitélio gástrico do hospedeiro impulsionada pelo flagelo, um dos principais mecanismos que garante o sucesso da colonização, determinando uma alta densidade bacteriana. No epitélio gástrico, um arsenal de adesinas pertencentes a uma família de proteínas de membrana externa (Hop), a exemplo das proteínas BabA, SabA, OipA, HopQ e AlpA/B, promovem interações específicas com receptores das células hospedeiras conduzindo a uma colonização bem sucedida e, posteriormente, a infecção persistente. Além da função adesiva, algumas adesinas, como a NAP (*neutrophil-activating protein*), podem estimular tanto a aderência de neutrófilos às células endoteliais como a produção de radicais de oxigênio e síntese de interleucina-8 (IL-8) por estas células (KAO; SHEU; WU, 2016).

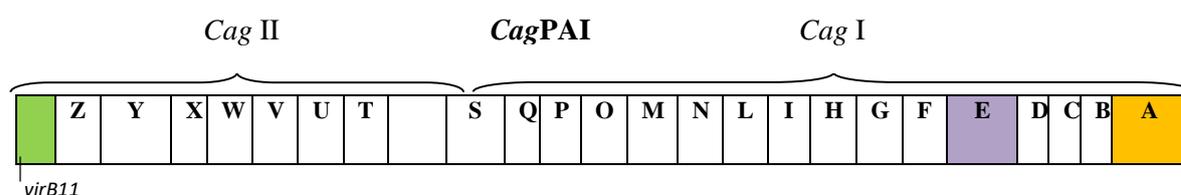
Após fixação na célula epitelial a bactéria injeta várias proteínas/toxinas efetoras, incluindo a citotoxina associada ao gene A (CagA) e a citotoxina vacuolizante A (VacA) causando danos ao tecido hospedeiro. O próprio epitélio gástrico, que constitui a principal interface entre *H. pylori* e o hospedeiro secreta quimiocinas para iniciar a imunidade inata e ativar neutrófilos contribuindo também para o desenvolvimento de doença clínica (COSTA; PEREIRA; RABENHORST, 2015; KAO; SHEU; WU, 2016).

A gravidade das lesões gástricas associadas à infecção por *H. pylori* dependem, dentre outros fatores, da presença de fatores de virulência cromossômicos da bactéria. Amplamente discutidos e estabelecidos na literatura, destacam-se as proteínas VacA (*vacuolating cytotoxin A*) e CagA (*cytotoxin-associated gene A*).

O gene *vacA* codifica uma proteína de mesmo nome que está presente em todas as cepas de *H. pylori*. A secreção da proteína está relacionada com sua estrutura gênica que apresenta um mosaico entre os alelos das regiões *s* (sinal - *s1a*, *s1b*, *s1c* e *s2*), *m* (média - *m1*, *m1T*) e *i* (intermediária - *i1*, *i2* e *i3*). Cepas com o genótipo *s1m1* produzem citotoxinas altamente ativas enquanto cepas portadoras do genótipo *s2m2*, virtualmente, não secretam a proteína. VacA está envolvida em uma série de atividades como: formação de canais de membrana nas células epiteliais, vacuolização, liberação do citocromo c mitocondrial, desregulação de genes que controlam o ciclo celular e estimulação da síntese de IL-8 (KAO; SHEU; WU, 2016). Um estudo realizado em Taiwan mostrou que os subtipos *vacA s1a* e *s1c* são menos comuns em pacientes com câncer gástrico e o subtipo *m1T* é mais detectado em pacientes com úlcera péptica e gastrite crônica.

Dentre os genes de virulência investigados, *cagA* é o mais discutido. Este gene está localizado na ilha de patogenicidade conhecida por *cagPAI*, com cerca de 40 Kb e 41 genes putativos (figura 14). A presença de um elemento de inserção IS605 em algumas cepas divide a ilha em duas regiões, *cagI* a jusante e *cagII* a montante. A ilha de patogenicidade é transferida horizontalmente a partir de uma fonte original desconhecida (CENSINI *et al*, 1996; GO, 2002; KAO; SHEU; WU, 2016).

Figura 14 - Representação de *cagPAI*.

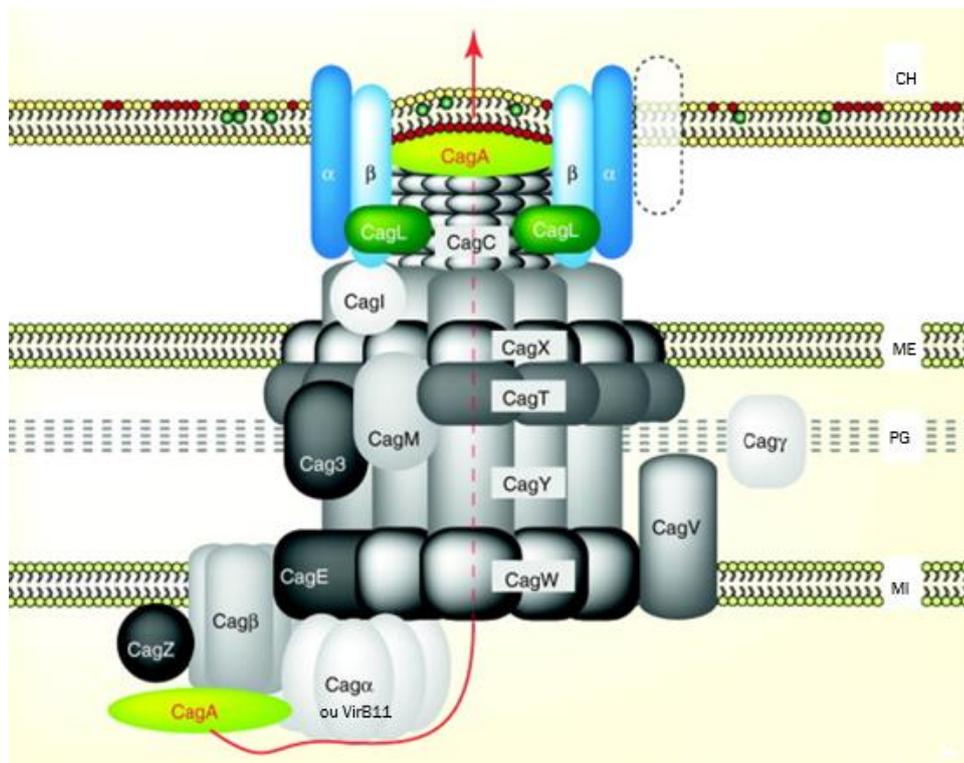


Fonte: Modificado de Da Costa; Pereira; Rabenhorst, 2015.

À direita de *cagPAI* estão localizados os genes *cagA* e *cagE* e à esquerda está localizado o gene *virB11*.

Vários genes de *cagPAI* possuem homologia com o sistema de secreção do tipo IV (SSTIV). Os sistemas de secreção bacterianos têm a função de transportar proteínas ou macromoléculas conjugadas a partir do citoplasma bacteriano podendo ser utilizado para manipulação do hospedeiro e estabelecimento de um nicho replicativo. Dentre as várias classes de sistema de secreção, o tipo IV, típico de bactérias Gram-negativas, apresenta relação ancestral com os sistemas de conjugação bacteriana e é encontrado em *H. pylori*. O SSTIV realiza a transferência direta de proteínas efetoras, nomeadamente CagA, para o citoplasma da célula hospedeira durante o processo infeccioso (figura 15) (GREEN, MECSAS, 2016).

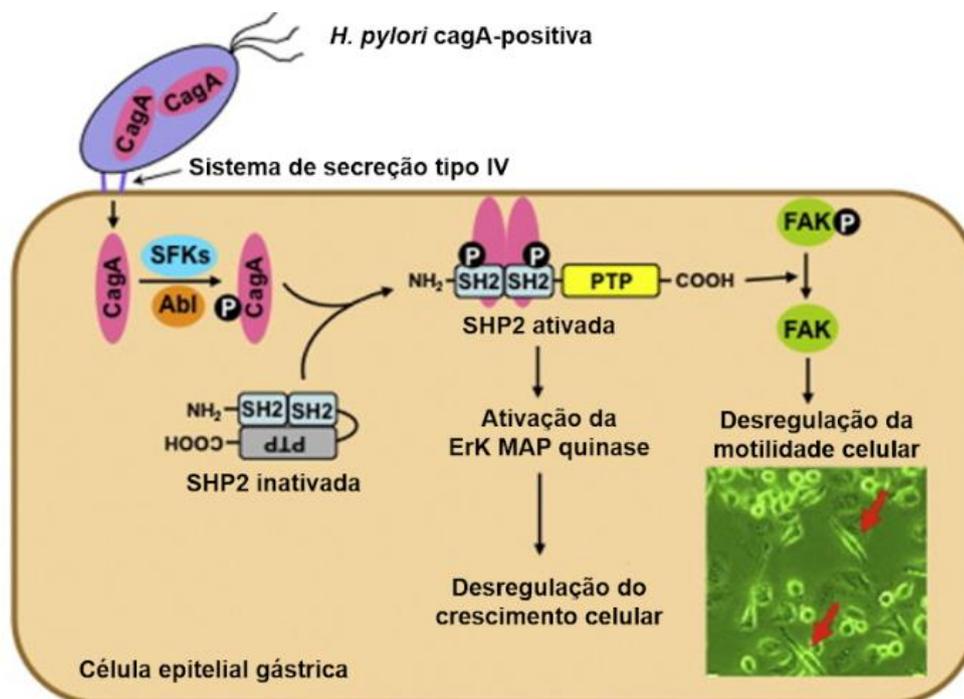
Figura 15 - Representação esquemática da organização do Sistema de Secreção tipo IV de *H. pylori* com a translocação de CagA para o interior da célula hospedeira.



Fonte: Shueleiringham; Everingham; Kwok, 2011. A figura mostra a posição das diferentes proteínas que compõem o SSTIV. MI: membrana interna. PG: peptidoglicano. ME: membrana externa. CH: citoplasma da célula hospedeira.

Após a injeção de CagA para o interior da célula hospedeira, a oncoproteína é fosforilada e ligada a proteína tirosinofosfatase SHP-2 (*Src homology region 2-domain phosphatase-2*), uma molécula sinalizadora intracelular que é expressa de forma ubíqua em células somáticas. A ativação de SHP-2 provoca a mobilização e reorganização de actina e induz a célula epitelial gástrica a um fenótipo semelhante aquele induzido por fatores de crescimento (figura 16) (AZUMA, 2009). Em 2008, Ohnishi e colaboradores demonstraram experimentalmente que CagA é uma verdadeira oncoproteína quando ratos transgênicos desenvolveram tumores após fosforilação de CagA, o mesmo não ocorrendo quando a fosforilação foi inibida. Além da translocação de CagA, o sistema de secreção tipo IV também injeta peptidoglicano da parede celular bacteriana (FOX, 2007).

Figura 16. Desregulação das células epiteliais por CagA.



Fonte: Modificado de Murata-Kamyia, 2011. Após entrada da proteína CagA através do sistema de secreção tipo IV, as quinases SFKs e Abl fosforilam CagA. CagA fosforilada se liga a SHP2 estimulando MAP/Erk quinase que desregula o ciclo celular. A SHP2 ativada por CagA também inibe a proteína quinase de adesão focal, FAK (*focal adhesion kinase*), um regulador dos pontos de adesão. Como resultado, induz a alteração morfológica da célula epitelial exibindo fenótipo semelhante a agulha (seta vermelha).

A prevalência do gene *cagA* é elevada nas cepas bacterianas isoladas nos países ocidentais (60%) e ainda mais expressiva nos países asiáticos (90%), sendo frequentemente relacionado à patogenicidade bacteriana e ao desenvolvimento de doenças gástricas que variam da gastrite ao câncer. No câncer gástrico, o risco relativo pode variar de 2 a 28 vezes em pacientes com cepas *cagA* positivas (AMIEVA, EL-OMAR, 2015; KAO; SHEU; WU, 2016).

Os demais genes de *cagPAI* vêm sendo estudados quanto à contribuição destes no desenvolvimento de doenças, tais como *cagE*, *cagM*, *cagG*, *cagT* e *virB11* (MENEZES, PEREIRA, RABENHORST, 2015). O estudo *in vivo* de Aviléz-Jiménez *et al* (2012) mostrou um aumento na expressão global dos genes de *cagPAI* e alelos de *vacA* no câncer gástrico quando comparado à gastrite ou a úlcera. De acordo com os autores, o aumento da expressão gênica se deve a uma resposta microbiana como resultado da alteração de pH do meio e outras condições do microambiente à medida que a mucosa gástrica sofre alterações histológicas. Os genes *cagE* e *virB11* pertencem ao complexo *virB/D* formando o aparato secretor do sistema de secreção de *H. pylori* envolvido na transferência de CagA. Ambos têm sido associados ao desenvolvimento de doenças gástricas. Cepas *cagE* positivas foram relacionadas a gastrite, úlcera péptica e duodenal, metaplasia e câncer. Por outro lado, as investigações de cepas

positivas para *virB11* e doenças gástricas ainda são escassas (ALI *et al.* 2005, TAN *et al.*, 2005, LIMA, 2010; SZKARADKIEWICZ *et al.*, 2016; GHOLIZADE *et al.*, 2017).

Apesar de todo arsenal virulento de *H. pylori*, a presença virtualmente universal da bactéria em países em desenvolvimento, envolvendo ou não doença, indica que outros fatores bacterianos, como a presença de determinados genes de virulência, fatores do ambiente e do hospedeiro devem ser importantes para o desfecho clínico (GO, 2002).

De fato, Hanahan e Weinberg (2011) descreveram quatro novas marcas da biologia do tumor, distintas e complementares, envolvidas em um processo de várias etapas, com destaque para 1) a inflamação promotora do tumor, que mantém relação com um estado de lesão precursora e é promovida pela ativação de células do sistema imunológico, e 2) a instabilidade genômica, definida como o acúmulo de mutações aleatórias e rearranjos cromossômicos que podem ser interpretados como um desequilíbrio entre a geração de produtos genotóxicos e a capacidade celular de se recuperar destes danos. Ambas as condições condizem com a natureza da lesão associada à infecção por *H. pylori* e a respectiva resposta do hospedeiro.

2.5 Resposta do Hospedeiro à Infecção por *H. pylori*

A primeira resposta imunológica frente à infecção por *H. pylori* é iniciada quando a bactéria interage com as células epiteliais gástricas. Os receptores Toll-Likes (*Toll-like receptors*) presentes na superfície apical e basolateral destas células reconhecem os componentes microbianos conservados denominados padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMP). O cultivo de células gástricas primárias identificou a expressão dos TLR-2 e TLR-5. É sabido que os TLR-2 reconhecem lipoproteínas e os TLR-5 reconhecem flagelinas, principal componente do flagelo. Entretanto, estudos experimentais realizados em células HEK293 demonstraram que os TLR-2 reconhecem o LPS de *H. pylori*, diferente de outras bactérias Gram-negativas que tem o LPS reconhecido pelos TLR-4. Por outro lado, proteínas do choque térmico de *H. pylori* são reconhecidos pelos TLR-4. A exposição de cepas intactas de *H. pylori* a células epiteliais que expressam os TLR-2, TLR-4 e TLR-5 estimulam a expressão de quimiocinas, principalmente da IL-8 (ALGOOD *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2015).

Há, ainda, evidências da injeção do peptidoglicano de *H. pylori* através do sistema de secreção tipo IV no interior das células gástricas. O peptidoglicano é outro PAMP que pode ser reconhecido no ambiente intracelular pelo domínio de oligomerização de nucleotídeos

(NOD1) que, assim como os TLR, ativa o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e altera a transcrição gênica na célula hospedeira iniciando uma resposta inflamatória (ALGOOD *et al*, 2006; FOX, 2007).

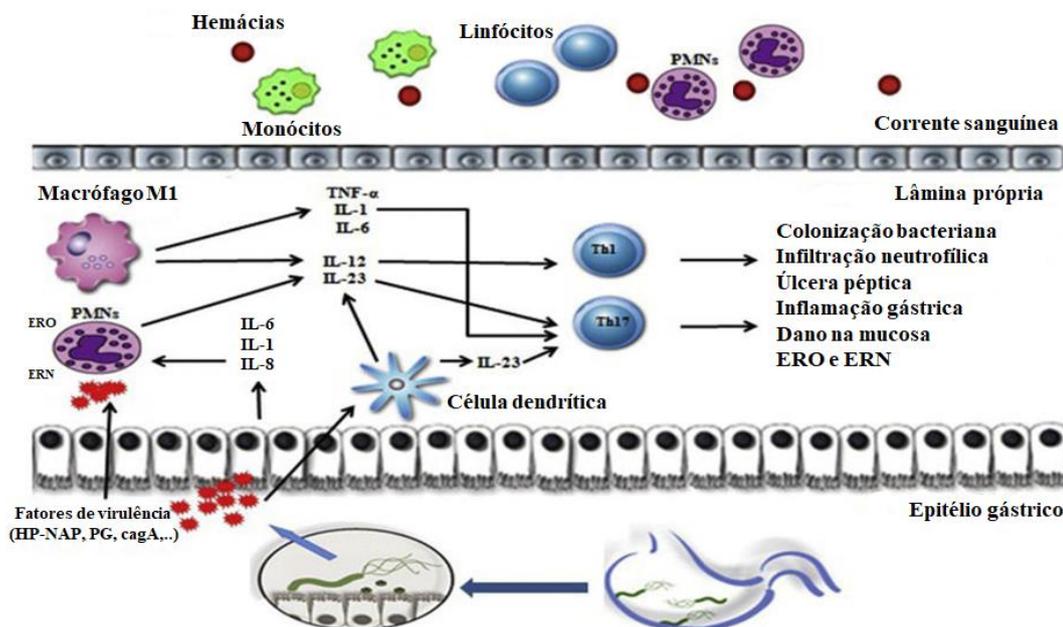
As alterações nas vias de sinalização intracelulares são caracterizadas pela liberação de citocinas por células epiteliais gástricas na mucosa e lâmina própria que recrutam e ativam neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Estas células respondem ao estímulo liberando ainda mais mediadores inflamatórios, além da secreção de óxido nítrico sintase (SANTOS *et al*, 2015; BOCKESTERTT *et al*, 2017; BAGHERI *et al*, 2018).

A liberação de citocinas inflamatórias modulam a diferenciação de células Th naive para um perfil Th1 e Th17 (figura 17). Foi demonstrado que a exposição de cepas intactas de *H. pylori* a células dendríticas promove a ativação celular e estimula a expressão acentuada de IL-12 o que favorece uma polarização preferencial para o perfil Th1. A citocina de assinatura das células Th1 é o IFN- γ , um importante mediador da resposta imunológica celular. Por sua vez, a diferenciação das células Th17 ocorre em microambiente com expressão preferencial das citocinas TGF- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23, esta última sendo a mais relacionada a diferenciação. A IL-17 é a citocina de assinatura do perfil Th17, cuja atuação sobre as células estromais e epiteliais para amplificação do recrutamento celular foi demonstrada, além de ser importante contra infecções bacterianas e fúngicas (MOYAT; VELIN, 2014; ROESLER; RABELO-GONÇALVES; ZEITUNE, 2014; ZHANG; ZHAN.; ABOUL-SOUD, 2017; BAGHERI *et al*, 2018).

A infiltração de linfócitos T CD4+ na lâmina própria de indivíduos infectados por *H. pylori* desempenha um papel importante na patogênese da infecção persistente. Tanto as células Th1 quanto as Th17 respondem pela inflamação na mucosa gástrica infectada, contudo, a relação entre estas células na infecção por *H. pylori* não está clara (BAGHERI *et al*, 2018).

As respostas imunológicas adaptativas sistêmica e de mucosa do hospedeiro frente à infecção ocorrem em um curto período de tempo. Em voluntários humanos infectados com 10^4 a 10^{10} UFC/ml de uma de cepa de *H. pylori* foi observado infiltração de linfócitos e monócitos na biópsia gástrica e um aumento significativo na expressão de IL-1 β , IL-6 e IL-8 no antro gástrico (GRAHAN *et al*, 2004). Os níveis de linfócitos T CD4+ e T CD8+ também foram significantes após quatro semanas da infecção, além do desenvolvimento de anticorpos IgM anti-*H. pylori* (NURGALIEVA *et al*, 2005; CADARUMO *et al*, 2014).

Figura 17 - Reconhecimento e resposta primária à infecção por *H. pylori* e danos na mucosa gástrica.



Fonte: Adaptado de Algood *et al.*, 2006 e Bagheri *et al.*, 2018. O reconhecimento imunológico inato dos PAMPs é mediado pelos TLR e NOD1 intracelular. A interação da bactéria com as células epiteliais gástricas ativa NF-κB e altera a transcrição gênica aumentando, principalmente, a síntese de IL-8, um importante quimiotático de neutrófilos. As interleucinas IL-1β e IL-6 também são secretadas, principalmente na presença de outros fatores de virulência, como CagA. Estas citocinas recrutam e ativam células da resposta imunológica inata, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos M1 na mucosa gástrica de pacientes infectados que podem causar efeitos antimicrobianos importantes, mas também podem causar inflamação e lesão tissular pela produção sustentada de citocinas inflamatórias, como TNF-α, IL-8, IL-6, IL-12 e IL-23. A liberação de mediadores inflamatórios induz o desenvolvimento preferencial de respostas Th1 e Th17. O estresse oxidativo alcançado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e óxido nítrico pode danificar o DNA, levando ao rompimento da função do gene. Assim, quanto maior o período de exposição de um tecido a células e mediadores inflamatórios ativados maior o dano celular acumulado.

Em outro estudo, envolvendo um endoscopista que relatou síndrome de dor epigástrica, a resposta imunológica humoral se desenvolveu em 14 dias pós-infecção, com a detecção de IgM e IgA anti-*H. pylori* em sobrenadante de cultura do antro gástrico e IgM anti-*H. pylori* no soro (SOBALA *et al.*, 1991).

Um fator importante que deve ser levado em consideração na infecção por *H. pylori* são as características das cepas que interagem com o epitélio gástrico e modulam a resposta imunológica. A produção de certas adesinas aumentam a afinidade de ligação às células epiteliais. E ainda, cepas que possuem *cagPAI* estimulam a produção de níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (ALGOOD *et al.*, 2006).

2.5.1 Interleucina-1β e Receptor antagonista da IL-1

A família de proteínas da interleucina-1 (IL-1) possui onze genes, dois membros são mais estudados: interleucina-1 β (IL-1 β) e o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra). Estas proteínas são codificadas por um cluster de genes em uma região de 430 Kb no braço longo do cromossomo 2 (HE *et al*, 2011) (figuras 18 A e 18B).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória glicosilada codificada pelo gene *IL1B* como um precursor peptídico que é ativado por processamento proteolítico (HE *et al*, 2011). O transcrito codifica uma proteína de 269 aminoácidos que posteriormente é clivada em dois segmentos: um pró-segmento de 116 aminoácidos e um segmento maduro de 153 aminoácidos com massa molecular de 17 kDa (MARCH *et al*, 1995). A função biológica é atribuída ao segmento maduro, crucial para as respostas de defesa do hospedeiro à infecção e lesão tissular (HE *et al*, 2011).

Figura 18A – Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene *IL1B*.

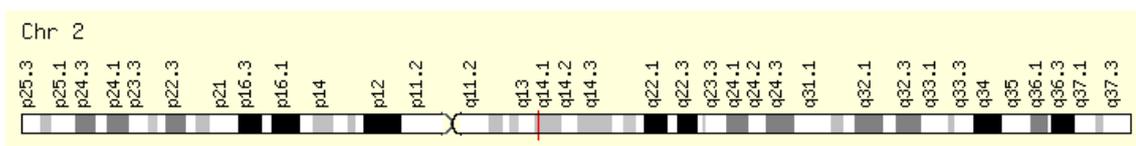
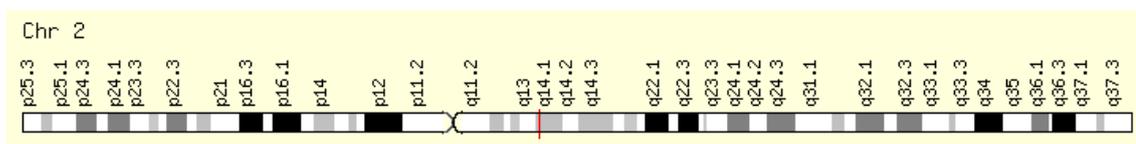


Figura 18B – Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene *IL1RN*.



Fonte: GeneCards. Disponível em www.genecards.org. Acesso em 2018. Chr: cromossomo.

A secreção de IL-1 β é fortemente estimulada na presença de LPS. Esta citocina responde por diversas atividades biológicas, incluindo a ativação de células T e B, aumento da atividade quimiotática e fagocitária de neutrófilos e macrófagos/monócitos, síntese e acúmulo de reservas citosólicas de pré-IL-1 β e outros mediadores da inflamação, tais como prostaglandina E₂, IL-6 e IL-8, bem como reduz a secreção gástrica (VARELLA, FORTE, 2001; LOPEZ-CARTEJON, BROUGHT, 2011).

A presença de *H. pylori* no estômago ativa mecanismos antagônicos: a secreção de gastrina, um hormônio peptídico envolvido na regulação positiva do ácido gástrico, e a secreção de IL-1 β , que diminui a acidez gástrica levando a hipocloridria que pode favorecer a sobrevivência e colonização de *H. pylori* (MA *et al*, 2017). Foi estimado que a ação hipoclorídrica de IL-1 β é 100 vezes mais potente que os inibidores de bomba de prótons e até 6.000 vezes mais potentes do que os antagonistas H₂ (EL-OMAR *et al*, 1995). Altos níveis de

IL-1 β têm sido descritos em indivíduos infectados por *H. pylori* (MA *et al*, 2017) e em lesões pré-neoplásicas com elevada carga bacteriana (PELETEIRO *et al*, 2010).

Por outro lado, IL-1ra é uma citocina antagonista de IL-1 β de massa molecular de 18 kDa na forma intracelular e 17 kDa na forma secretada codificada pelo gene *IL1RN* (MALYAK *et al*, 1998). No momento da inflamação, se liga competitivamente ao receptor tipo I de IL-1 β neutralizando os seus efeitos pró-inflamatórios (BESSLER *et al*, 2006; PELETEIRO *et al*, 2010). A atividade do sistema IL-1 depende do equilíbrio entre IL-1 β e IL-1ra.

2.5.2 Interleucina-6

A interleucina-6 (IL-6) é codificada pelo gene *IL6*, localizado no braço curto do cromossomo 7 (figura 19). A estrutura molecular compreende 212 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 28 aminoácidos com peso molecular total de 21–26 kDa (TANAKA *et al*, 2014).

A expressão imediata e transitória de IL-6 em resposta ao estresse ambiental é cessada tão logo a fonte do estresse seja removida. Esta citocina é um dos mais notáveis mediadores de fase aguda da inflamação, resposta imunológica e hematopoiese, estimulada principalmente por LPS, IL-1 e TNF (VARELLA, FORTE, 2001), através das sinalizações das vias ERK e Akt (TANAKA *et al*, 2014).

Figura 19 – Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene *IL6*.



Fonte: GeneCards. Disponível em www.genecards.org. Acesso em 2018.

Combinada ao fator de crescimento transformador (TGF)- β , a IL-6 é indispensável para a diferenciação de células T CD4⁺ virgens em células Th17 (KORN *et al*. 2009; BAGERI *et al*, 2018) e, portanto, representa um elo importante entre a resposta imunológica inata e adquirida (TANAKA *et al*, 2014).

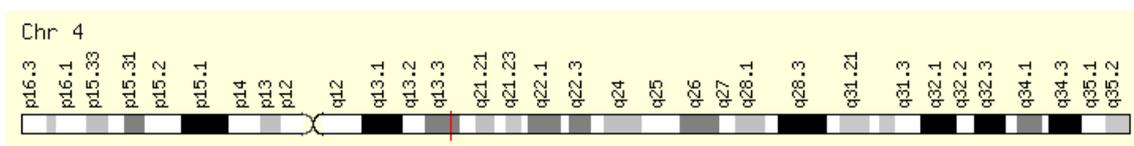
A literatura é controversa quanto ao papel de IL-6 na doença gástrica. Muitos trabalhos relatam que há aumento dos níveis de IL-6 na displasia e câncer gástrico, muitas vezes associados a infecção por *H. pylori*, podendo ser considerada como fator prognóstico na metástase linfonodal no câncer gástrico (LEE *et al*, 2010). Por outro lado, Kim *et al* (2017)

encontraram uma relação negativa entre a expressão de IL-6 e a progressão do câncer gástrico, angiogênese e sobrevivência. E por este motivo, foi sugerido que IL-6 pode afetar as etapas iniciais da carcinogênese gástrica, mas não na progressão do tumor.

2.5.3 Interleucina-8

A interleucina-8 (IL-8) é uma quimiocina pró-inflamatória, membro da família CXC, codificada pelo gene *IL8* localizado em braço longo do cromossomo 4 (figura 20). O transcrito possui 99 aminoácidos de 8-12 kDa (WAUGH, WILSON, 2008).

Figura 20. Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene *IL8*.



Fonte: GeneCards. Disponível em www.genecards.org. Acesso em 2018. Chr: cromossomo.

Uma variedade de células pode expressar IL-8, principalmente monócito/macrófago, células endoteliais e epiteliais (VARELLA, FORTE, 2001). A expressão de IL-8 é regulada pelo NF- κ B em resposta a diferentes estímulos, incluindo estresse químico, ambiental (bactéria intacta e LPS) e sinais inflamatórios (IL-1 β) (WAUGH e WILSON, 2008). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram uma elevação nos níveis de IL-8 em resposta à infecção por *H. pylori* acentuando-se na presença de cepas *cagA* positivas (FAZELI *et al*, 2016; LING *et al*, 2016)

Apesar de atuar sobre múltiplos alvos celulares, o papel quimiotático é o mais proeminente, especialmente sobre neutrófilos, afetando a adesão e a diapedese. Além disso, estimula a ativação destas células e aumenta o metabolismo oxidativo envolvendo-se em diversas doenças inflamatórias, incluindo o câncer (ZHANG, CHEN, 2002; RUSSO *et al*, 2017).

2.6 Polimorfismos Genéticos em Genes de Interleucinas Pró-inflamatórias associados a Doenças Gástricas

Diferenças na resposta inflamatória podem ser decorrentes de polimorfismos genéticos, alterações genéticas que ocorrem em regiões codificantes, intrônicas ou intergênicas em mais que 1% da população. Em regiões codificantes, estas alterações podem ser sinônimas,

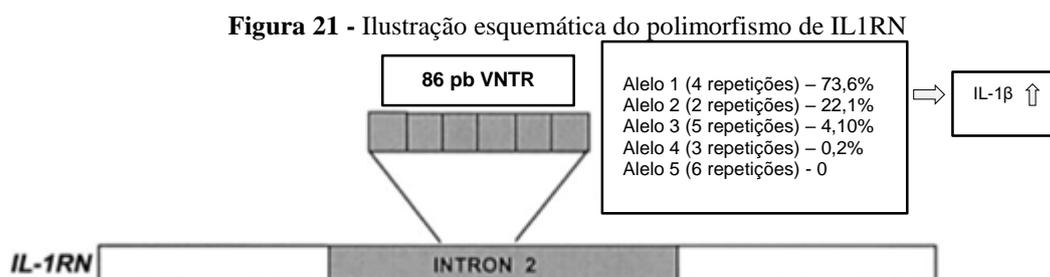
quando não é observada uma substituição de aminoácido na cadeia polipeptídica, ou não sinônimas, quando o novo códon codifica um aminoácido diferente. Polimorfismos são assinaturas genéticas em estudos populacionais que podem ser implicados na predisposição a doenças. Dentre os polimorfismos genéticos, aqueles que afetam um único nucleotídeo são chamados de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e possuem uma alta incidência na população, sugerindo que estes ocorrem de forma natural (KARKI *et al.*, 2015). Outro polimorfismo relevante é o VNTR (*variable number tandem repeats*), um minissatélite com sequências de 10 a 20 nucleotídeos que variam em número de cópias, sendo conveniente para análise de marcadores em estudos genéticos moleculares (BABUSHKINA e KUCHER, 2011).

As diferenças individuais na intensidade da resposta inflamatória podem ser atribuídas a polimorfismos genéticos, principalmente na região promotora do gene, que podem contribuir com a transformação da mucosa (PELETEIRO *et al*, 2010; PIGOSSI *et al*, 2018).

Diante disso, vários polimorfismos em genes que codificam interleucinas são investigados no câncer, incluindo o câncer gástrico. O polimorfismo na região -511 do gene *IL1B* C>T (rs16944) têm sido associado ao aumento dos níveis de IL-1 β , contudo sem significância, e a uma diversidade de doenças inflamatórias, incluindo o câncer de estômago (RAD *et al*, 2004; HE *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012). Na população alemã, o alelo polimórfico foi associado a alterações na mucosa gástrica, como atrofia e metaplasia (RAD *et al*, 2003), enquanto no Brasil o genótipo heterozigoto foi mais frequente em pacientes com menores alterações da mucosa, como a gastrite crônica (SANTOS *et al*, 2012). Controversamente, em estudo de meta-análise recente não foi encontrada qualquer associação entre o polimorfismo *IL1B-511* e o desenvolvimento de gastrite (SUN *et al*, 2017) ou lesões pré-neoplásicas (PELETEIRO *et al*, 2010).

Quanto a interação com *H. pylori*, já é bem estabelecido que os níveis de IL1- β se elevam em resposta à infecção (RAD *et al*, 2003). Figueiredo *et al* (2002) demonstraram que portadores do alelo polimórfico infectados com cepas de *H. pylori* toxigênica aumentaram a expressão do gene (FIGUEIREDO *et al*, 2002), enquanto um estudo brasileiro demonstrou uma associação entre o alelo polimórfico e cepas menos virulentas (*cagA* negativas) na gastrite crônica (SANTOS *et al*, 2012). O impacto do polimorfismo *IL1B-511* na expressão do gene nos faz hipotetizar sobre a influência do alelo polimórfico na iniciação e manutenção do processo inflamatório que contribuem para a promoção do câncer de estômago. Porém, como descrito anteriormente, os resultados para este polimorfismo e as doenças gástricas são altamente conflitantes, necessitando de maiores investigações.

O antagonista de IL1- β possui cinco variantes alélicas baseadas na repetição de um segmento de 86 pb em tandem na segunda região intrônica do gene *IL1RN*. Os alelos 1 e 2 são os mais comuns, os demais ocorrem numa frequência menor que 5% (BABUSHIKNA e KUCHER, 2011). Coletivamente, estes alelos são considerados curtos *IL1RN2** (alelos 2 e 6) e longos *IL1RN1L* (alelos 1, 3, 4 e 5) (figura 21). A variação no tamanho do gene resulta em alteração na quantidade de IL1ra (UPADHWYAY *et al*, 2008) cuja desregulação resulta em uma atividade inflamatória anormal com conseqüente dano tecidual. O alelo polimórfico *IL-1RN*2* provavelmente é o mais potente regulador de IL1- β . Em células endoteliais humanas com genótipo 2*/2* os níveis de IL1ra eram três vezes menor que aquelas com genótipo L/L (BABUSHIKNA e KUCHER, 2011). Em uma diversidade de doenças inflamatórias (CHENG *et al*, 2006; QUEIROZ *et al*, 2009) e até no câncer de estômago (CANAS *et al*, 2009) a frequência do alelo 2 é elevada.



Fonte: Modificado de RAD *et al*, 2003. Em destaque, frequência alélica aproximada das variantes alélicas de *IL1RN*. O alelo 2* é associado ao aumento dos níveis de IL-1 β

Estudos realizados na Alemanha e no norte do Brasil demonstraram uma associação entre o alelo polimórfico *ILRN 2** e a presença de anticorpos IgG anti-CagA, infiltração neutrofílica e linfocítica grave (RAD *et al*, 2003) e o aumento do risco para o câncer de estômago (BARBOSA *et al*, 2009), metaplasia intestinal e atrofia (RAD *et al*, 2003). Por outro lado, no sudeste brasileiro, Santos *et al* (2012) não evidenciaram nenhuma diferença na frequência do alelo polimórfico *ILRN 2** e os casos de gastrite crônica e câncer gástrico. O polimorfismo de *IL1RN* na doença gástrica também é controverso e bem representado pelos estudos de meta-análise de Kamangar *et al* (2006), Peleteiro *et al* (2010) e Xue *et al* (2010). No primeiro, o alelo polimórfico *ILRN 2** não é associado a um risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, no entanto, nos demais estudos foi observada uma associação entre o câncer de estômago, principalmente o subtipo intestinal, e o risco de lesão pré-neoplásica com o polimorfismo de *IL1RN*.

Com relação a IL-6 foi demonstrado que o polimorfismo -174 *IL6* G>C (rs1800795) localizado na região promotora afeta a expressão gênica. Desde então, diversos estudos têm abordado este polimorfismo em uma variedade de doenças inflamatórias (WOO, HUMGRIES, 2013). A relação entre o produto gênico e o polimorfismo não é tão simples. Níveis mais elevados de IL-6 foram previamente associados a presença do alelo polimórfico mas apenas quando se considera o tipo de tecido, pois o polimorfismo possui uma regulação tipo-específica (TERRY *et al*, 2000). Em estudo *in vivo* de FISCHMAN *et al* (1998), o alelo selvagem (G) apresentou um aumento em até 2x nos níveis de IL-6 em comparação com o alelo polimórfico (C). Na doença gástrica, os resultados são discrepantes. Ramis *et al* (2017), não encontraram associação entre o polimorfismo e o risco de câncer gástrico no sudeste brasileiro, corroborando com a meta-análise de Junli *et al* (2012). Por outro lado, Sampaio *et al* (2015) relataram uma associação entre o genótipo heterozigoto e o aumento do risco para o câncer gástrico subtipo intestinal na população portuguesa, assim como a meta-análise de Sugimoto *et al* (2010).

Alguns trabalhos demonstraram que na infecção por *H. pylori* há um aumento de IL-6 independente da presença de *cagA* (NAKAGAWA *et al*, 2013; ROSSI, 2016). Diferentemente, em outros estudos, o polimorfismo *IL6-174* não foi diferente em pacientes dispépticos infectados com *H. pylori* e indivíduos não infectados (GATTI *et al*, 2005; POHJANE *et al*, 2016). De modo que relação entre o polimorfismo de *IL6 -174*, a infecção por *H. pylori* e o desenvolvimento de doença gástrica não é clara.

O polimorfismo de *IL8 -251* A>T (rs 4073) tem sido relacionado a regulação da atividade transcricional (SUN *et al*, 2011) e a níveis elevados de IL-8 em células epiteliais gástricas com genótipo homozigoto polimórfico (MA, 2017). Xuan *et al* (2005) demonstraram que na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* são detectados altos níveis de IL-8. E em indivíduos heterozigotos foi descrito um risco de infecção por *H. pylori* (CALEMAN NETO *et al*, 2014). Por outro lado, o estudo de meta-análise de Ma *et al* (2017) não confirma a relação entre o polimorfismo e o risco de infecção. Sobre a influência do polimorfismo e as alterações na mucosa gástrica, Szoke *et al* (2008) relataram um aumento do risco de gastrite e metaplasia na presença de alelo polimórfico na Hungria, enquanto na Coreia o alelo selvagem foi associado ao risco de câncer gástrico (LIU *et al*, 2010). Estudos recentes não são concordantes quanto ao papel do polimorfismo *IL8-251* no desenvolvimento de gastrite, úlcera ou câncer de estômago (OLIVEIRA *et al*, 2015; OHYAUCHI *et al*, 2016; MA *et al*, 2017).

Uma vez que o câncer gástrico subtipo intestinal é produto de uma sequência de alterações histológicas pela manutenção de uma inflamação crônica é esperado que os

polimorfismos possam influenciar na magnitude e no curso das etapas iniciais das lesões. Diante da heterogeneidade dos estudos torna-se necessário maiores investigações, sobretudo nas lesões sequenciais que antecedem o câncer gástrico, a fim de identificar os pacientes com maior risco de evolução.

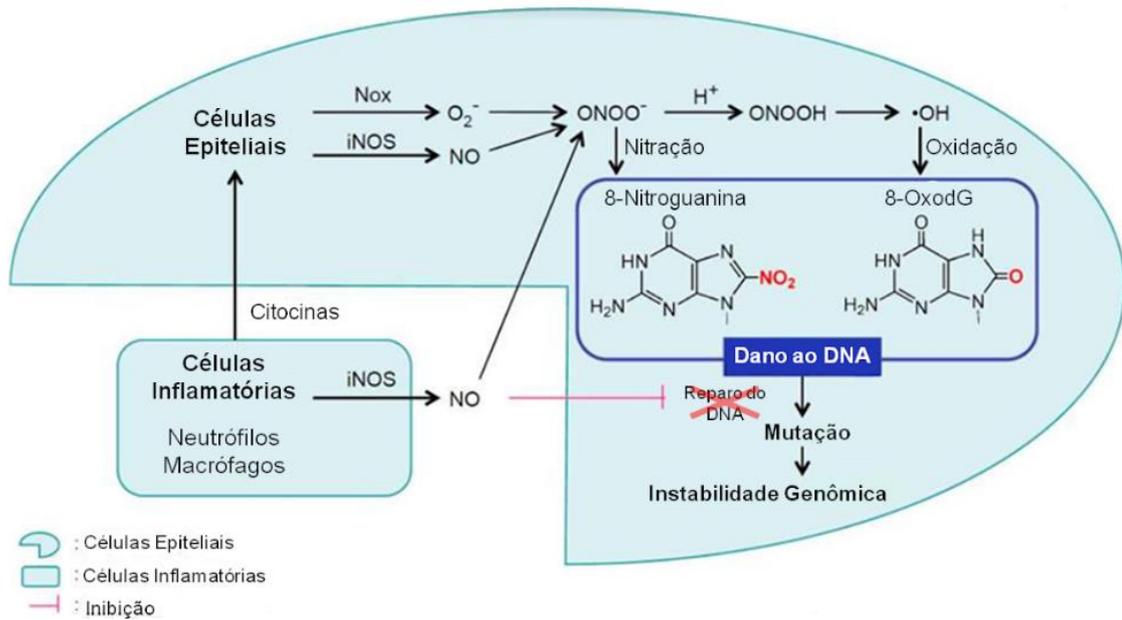
2.7 Estresse Oxidativo e Dano ao DNA

Em pacientes infectados por *H. pylori* são detectados altos níveis da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), um catalizador de óxido nítrico (ON) presente tanto nas células epiteliais como nas células inflamatórias (SANTOS, 2015). Com a indução sustentada de iNOS na inflamação crônica, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS) podem se acumular provocando dano ao DNA devido a produção de substâncias genotóxicas, tais como 8-nitroguanina (figura 22). Os hábitos alimentares também contribuem para o aumento na produção de NOS, em especial a ingestão de embutidos ricos em sais de nitrito e nitrato (BARREIROS *et al*, 2006). O ON e O_2^- são liberados por neutrófilos e macrófagos, o primeiro tem meia-vida longa e pode se difundir da matriz extracelular ao núcleo das células epiteliais, enquanto esta última possui meia-vida curta, não sendo suficiente para o alcance do núcleo das células. No entanto, quando as células inflamatórias liberam TNF- α este reage com seu receptor 1 em células epiteliais vizinhas induzindo a formação de NADPH oxidase (Nox), um complexo enzimático ligado a membrana plasmática que gera O_2^- pela transferência de elétrons de NADPH. Assim, o ON sintetizado pelas células inflamatórias reage com o O_2^- das células epiteliais formando o peróxido nítrico ($ONOO^-$) que, por sua vez, produz 8-nitroguanina, uma molécula altamente instável que se liga ao DNA gerando sítios apurínicos quando é liberada espontaneamente (figura 23). A síntese do DNA é comprometida levando a substituição de base única por transversão (KAWANISHI *et al.*, 2017).

Similarmente, *H. pylori* aumenta os níveis de poliaminas do tipo espermina cuja metabolização pela espermina oxidase gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um potente agente oxidante que contribui para a formação de radicais livres como a hidroxila (OH), e seu acúmulo leva ao estresse oxidativo e dano epitelial (ZHANG; ZHANG; ABOUL-SOUD, 2017).

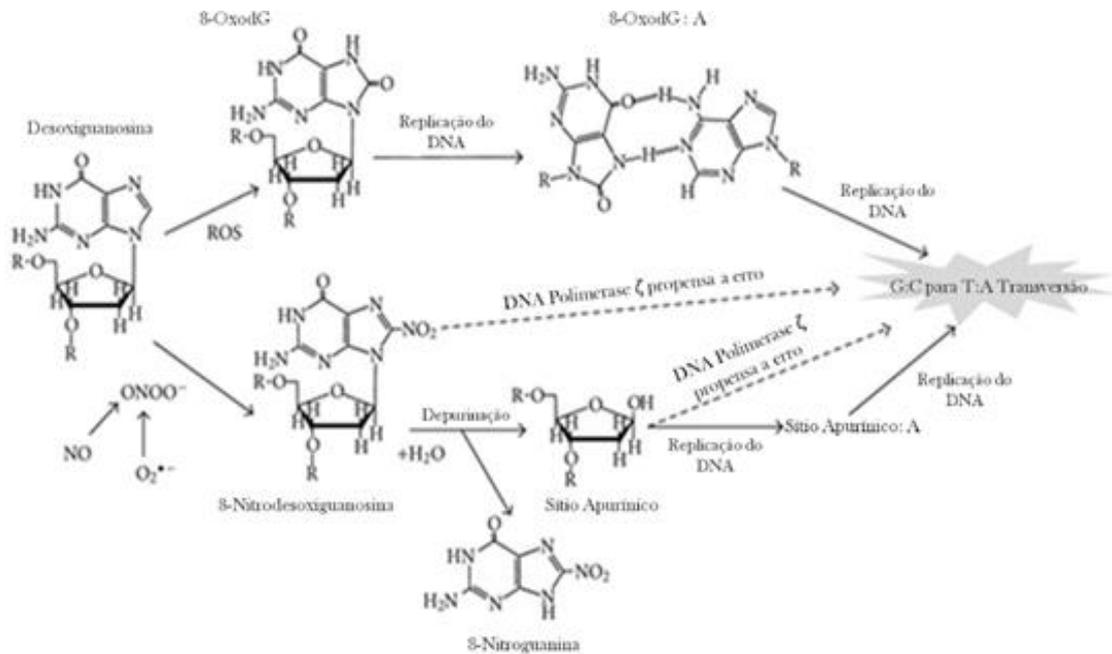
A inflamação também afeta negativamente a maquinaria do reparo do DNA, podendo inibir uma série de enzimas por modificações químicas. Assim, a instabilidade genética é alcançada pela elevada taxa de mutação decorrente de níveis elevados de ROS e RNS e deficiência das vias de reparo do DNA (KAWANISHI *et al.*, 2017).

Figura 22 - Mecanismo de dano oxidativo ao DNA na inflamação.



Fonte: Modificado de Kawanishi *et al.*, 2017. A interação entre óxido nítrico e ânion superóxido no interior das células epiteliais gástricas formam compostos intermediários, ONOO[•] e ONOOH, que após nitração e oxidação, respectivamente, geram produtos genotóxicos. NO: óxido nítrico.

Figura 23 - Mutação pontual induzida por 8-nitroguanina e 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxidG) através da indução da transverso G: C → T: A.



Fonte: Modificado de Murata *et al.*, 2012.

O dano oxidativo, assim como vários agentes endógenos e exógenos podem resultar em lesões no DNA, tais como lesões apurínicas ou apirimídicas, oxidação ou alquilação de bases, malpareamento e quebra de fitas do DNA. De modo particular, a inflamação promove um ciclo vicioso entre lesão e reparação com proliferação celular aberrante. Além disso, a presença de *H. pylori* no hospedeiro não produz um padrão específico de lesão ao DNA em células infectadas. Os diferentes danos ao DNA induzem a ativação de vias de reparo do DNA e interceptação da replicação, num evento chamado de estresse da replicação (KALISPERATI *et al.*, 2017).

2.8 Vias de Reparo do DNA

As vias de reparo do DNA incluem aquelas relacionadas a lesões em uma única fita do DNA, como o Reparo por Excisão de Bases (BER - *Bases Excision Repair*), o Reparo por Remoção Direta do Dano (DDR - *Direct Reversal Repair*), o Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER - *Nucleotide Excision Repair*) e o Reparo do Emparelhamento Errôneo do DNA (MMR- *Mismatch Repair*). Duas outras vias estão relacionadas a lesões mais graves quando há quebra de fita dupla do DNA, nomeadamente Reparo por Recombinação Homóloga (HR- *Homologous Recombination*) e o Reparo por Recombinação Não-homóloga (NHEJ - *Non Homologous End Joining*) (BERRA; MENCK; MASCIO, 2006).

Sendo assim, destacamos enzimas que são relevantes nestas vias de reparo do DNA, como APE-1 (*Apurinic/aprimidinic endonuclease 1*) e XRCC-1 (*X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 1*) que pertencem a via BER, MGMT (O6-metilguanina-DNA-metiltransferase), importante no reparo por remoção direta do dano, MLH-1 (*MutL Homolog 1*), relacionada ao reparo por emparelhamento errôneo e XRCC-3 (*X-Ray Repair Cross Complementing 3*), importante no reparo por recombinação homóloga.

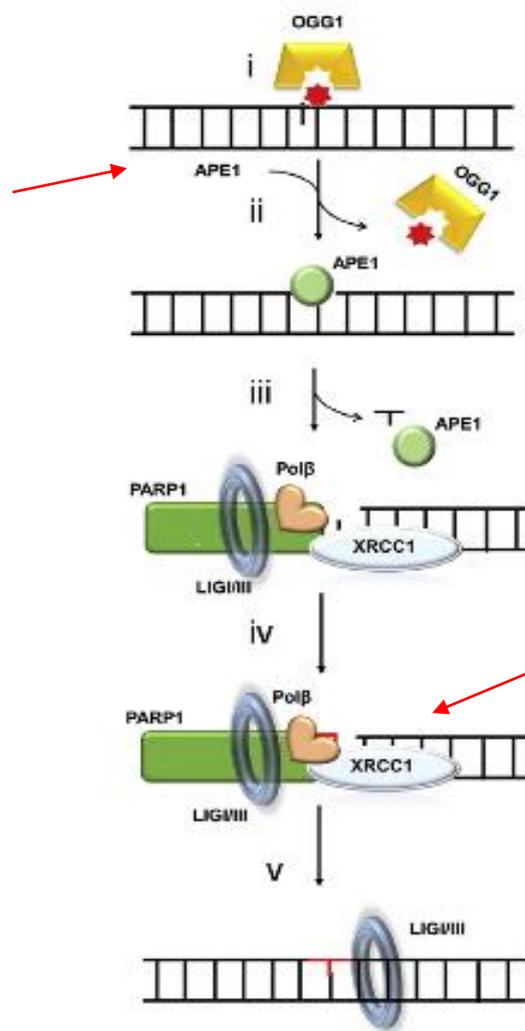
2.8.1 BER: APE-1 (*Apurinic/aprimidinic endonuclease 1*) e XRCC-1 (*X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 1*)

A via BER é uma das mais relacionadas ao dano oxidativo reconhecendo principalmente lesões do tipo 8-oxoguanina pela enzima OGG-1. Esta enzima reconhece o dano e remove a base danificada clivando a porção 3' do açúcar, no entanto, exibe alta afinidade por sítios abásico e só é liberado pela ação da endonuclease APE-1 que cliva a porção 5' do açúcar gerando o *gap*. O sítio apurínico/apirimídico ativa a enzima PARP-1 que produz uma cadeia de

ADP e recruta outras enzimas, como XRCC-1, que servirá de suporte e integração das outras enzimas: DNA polimerase β e DNA ligase III. A polimerase sintetiza a base nitrogenada que estava danificada e a enzima ligase finaliza o reparo (figura 24) (VAN HOUTER; SANTA-GONZALES; CAMARGO, 2018).

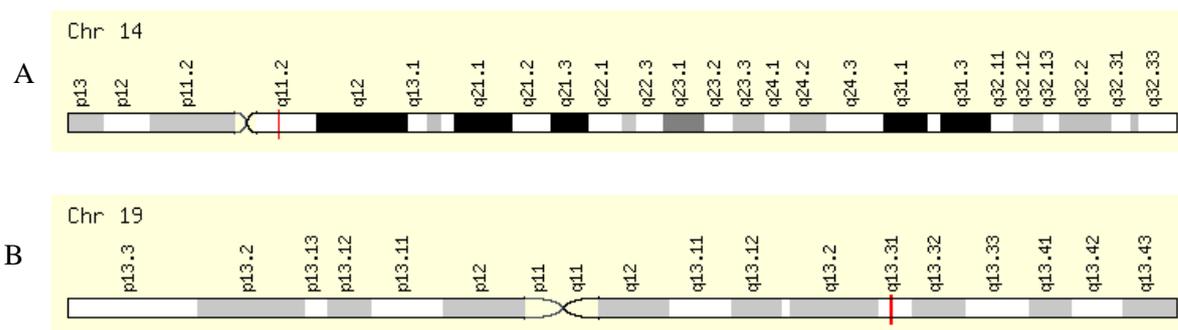
A proteína APE-1 possui 35.555 Da e 318 aminoácidos. É codificada pelo gene *APE1* localizado no braço longo do cromossomo 14 na região 11.2. Enquanto a proteína XRCC-1 possui 69.477 Da e 633 aminoácidos. O gene que codifica XRCC-1 tem o mesmo nome (*XRCC1*) e localiza-se no braço longo do cromossomo 19 na região 13.31. Foram identificados 5 exons para o gene *APE1* e 17 para o gene *XRCC1* (figura 25 A e B) (NCBI, 2018).

Figura 24 – Mecanismo de ação da via BER, destacando o papel das proteínas APE-1 e XRCC-1.



Fonte: Van Houter; Santa-Gonzales; Camargo, 2018

Figura 25 - Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica dos genes *APE1* (A) e *XRCC1* (B).



Fonte: GeneCards. Disponível em www.genecards.org. Acesso em 2018. Chr: cromossomo.

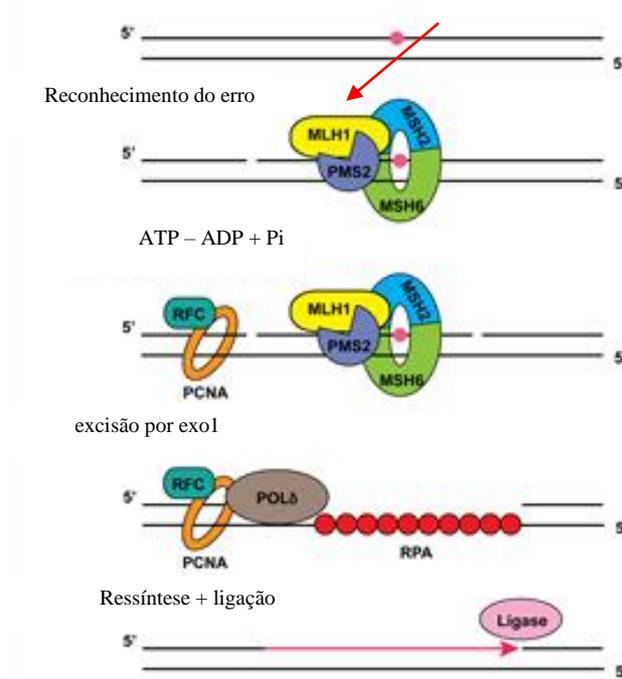
2.8.2 MMR: *MLH-1* (*MutL Homolog 1*)

O reparo de bases mal pareadas corrige bases incorporadas erroneamente (base-base), loops de inserções e deleções e ainda danos oxidativos. As proteínas chaves desta via de reparo são proteínas da família MutS e MutL altamente conservadas nos eucarióticos além da exonuclease 1 (EXO1), fator de replicação C (RFC – *replication factor C*), antígeno nuclear de proliferação (PCNA - *proliferating cellular nuclear antigen*), DNA polimerase δ e DNA ligase I (HSIEH, YAMARA, 2008).

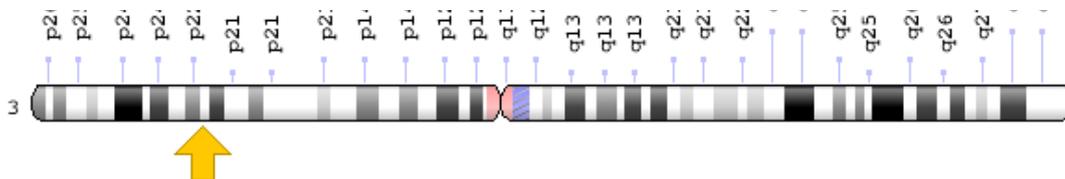
O reparo é iniciado com a identificação de distorções na fita do DNA decorrentes do erro de incorporação de base pelas proteínas MutS que logo recrutam MutL (heterodímero formado por MLH-1 e PMS2 - endonuclease) e este complexo proteico se movimenta ao longo da fita na dependência de ATP. Posteriormente, interagem com as proteínas PCNA e RFC que estimulam a ação de endonuclease de PMS2, clivando o DNA próximo ao erro de incorporação e gerando um sítio de entrada para a EXO1 que degrada a fita comprometida preservando a fita correta, provavelmente identificada por metilação. Após remoção, são recrutadas as enzimas DNA polimerase e ligase para ressintetizar a fita (figura 26) (HSIEH, YAMARA, 2008).

MLH-1 possui 756 aminoácidos e 84.601 Da, é codificada pelo gene *MLH1*, que possui 21 exons e está localizado no cromossomo 3 na posição p 22.3, conforme demonstrado na figura 27.

Figura 26 - MMR: identificando o papel da proteína MLH1.



Fonte: Modificado de NIH. Disponível em <https://www.niddk.nih.gov/about-niddk/staff-directory/intramural/peggy-sieh/pages/researchimages.aspx>. livo



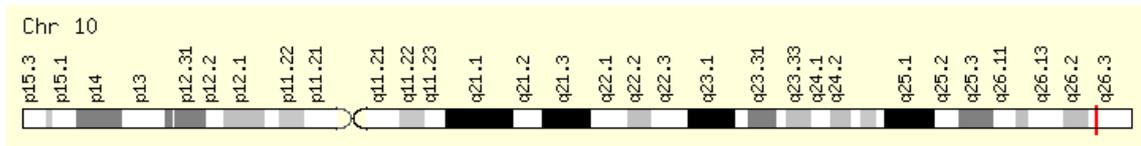
Fonte: GeneCards. Disponível em www.genecards.org. Acesso em 2018. Chr: cromossomo.

2.8.3 DDR: MGMT (O6-metilguanina-DNA-metiltransferase)

O reparo direto ao dano no DNA envolve lesões do tipo alquilantes. A lesão mais mutagênica é a alquilação na posição O6 da guanina no DNA. Este reparo apresenta uma única etapa realizada pela enzima MGMT que numa ação suicida transfere o grupo alquil para o resíduo de cisteína na posição 145 de seu centro ativo tornando-se inativa num processo irreversível. Esta enzima é ubiquitinada e degradada via proteassoma (CHRISTIMANN *et al.*, 2011).

A proteína MGMT é composta de 207 aminoácidos e tem 21.646 Da. Foram identificados 6 exons no gene *MGMT* localizado no braço longo do cromossomo 10 na região 26.3 (figura 28).

Figura 28 - Esquema ilustrativo representando a posição cromossômica do gene *MGMT*.

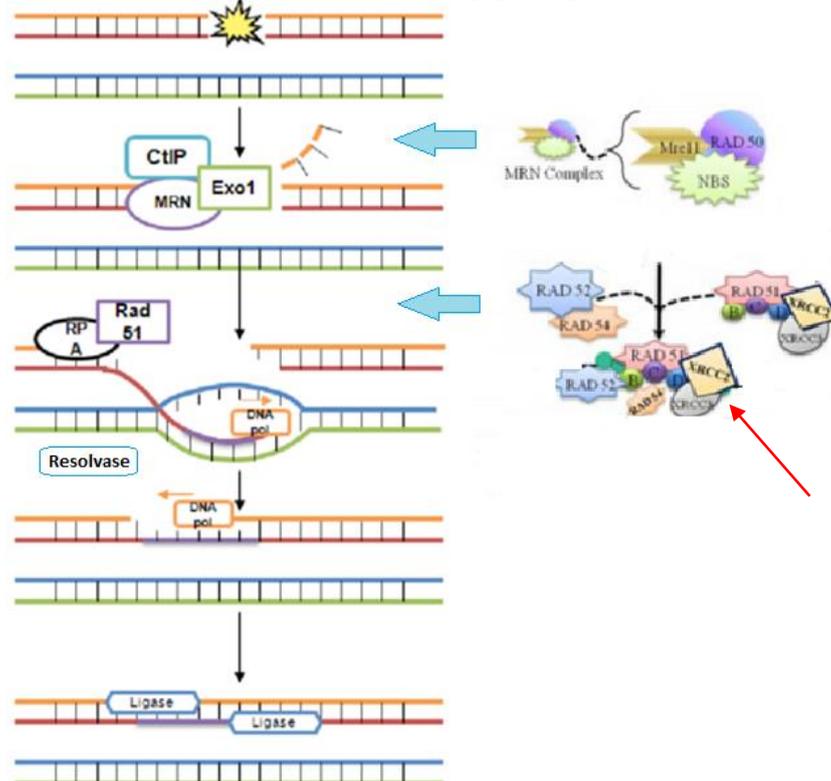


Fonte: GeneCards. Disponível em www.genecards.org. Acesso em 2018. Chr: cromossomo.

2.8.4 HR: *XRCC3* (*X-Ray Repair Cross Complementing 3*)

O reparo por recombinação homóloga é necessário quando danos mais graves no DNA ocorrem afetando a dupla hélice. Neste reparo, um conjunto enzimático, MRN, forma um complexo MRN-CtIP que reconhece o dano e se liga ao DNA lesionado. Com a ativação da exonuclease, Exo-1, é realizada a ressecção das pontas soltas gerando fitas simples. Na sequência, uma proteína estabilizadora, RPA, mantém a fita aberta enquanto RAD51 associada a XRCC-3 e outras enzimas formam o filamento nucleoprotéico para identificar a fita homóloga e iniciar o alinhamento. Em seguida, a DNA polimerase sintetiza a região lesada que servirá de molde para a sua fita complementar. Por fim, o complexo é disperso e a DNA ligase une as extremidades (figura 29) (GAUBER; MOURA; CHAMMAS, 2015).

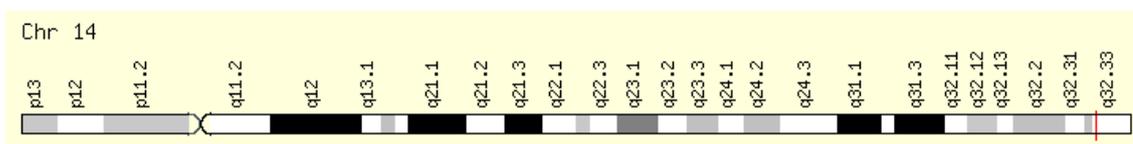
Figura 29 – Mecanismo de ação da via HR e papel da proteína XRCC3.



Fonte: Modificado de Mazumder & Nath, 2014, e Gauber; Moura; Chammas, 2015.

A enzima XRCC-3 possui 364 aminoácidos e tem 37.850 Da. É codificada pelo gene *XRCC3* que está localizado no braço longo do cromossomo 14 na região 14 q 32.33 apresentando 10 éxons conforme demonstrado na figura 30.

Figura 30 - Representação da posição cromossômica do gene *XRCC3*.



Fonte: GeneCards. Disponível em www.genecards.org. Acesso em 2018. Chr: cromossomo.

Apesar das diferentes vias de reparo do DNA estarem relacionadas a determinados tipos de danos, a literatura tem demonstrado uma maior diversidade de atuação das enzimas do reparo. Além disso, é proposto que exista uma interação entre os diferentes mecanismos de proteção da integridade do DNA (BERRA; MENCK; MASCIO, 2006; BRIDGE; RASHID; MARTIN, 2014; WANG *et al.*, 2015).

2.9 Polimorfismos Genéticos em Genes do Reparo do DNA associados a Doenças Gástricas

Alterações genéticas e epigenéticas são vistas na tumorigênese gástrica como resultado de danos críticos ao DNA em um cenário onde há falha do sistema de reparo. Essas aberrações já podem, inclusive, ser notadas na metaplasia intestinal. Desta forma, é necessário um equilíbrio entre a produção de substâncias genotóxicas e a eficiência das múltiplas vias de reparo para a manutenção da integridade do DNA (CÁPELLA *et al.*, 2008; PALLI *et al.*, 2010).

A variação alélica decorrente de polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA pode levar ao comprometimento da ação enzimática e interferir diretamente na susceptibilidade individual ao acúmulo de danos no DNA (TAHARA *et al.*, 2011).

Desse modo, considerando a importância de SNPs na via BER, o polimorfismo T2197G de *APE1* (éxon 5, rs1130409, Asn148Glu) foi associado por Dai *et al.*, (2015), em um estudo de meta-análise com o aumento do risco para o câncer de estômago, principalmente na população asiática. Adicionalmente, em Taiwan, o alelo polimórfico de *APE1* T2197G estava associado a um aumento de até 2 vezes de sítios apurínicos/apirimídicos em mulheres com câncer de mama (HSIEH *et al.*, 2017). Identificamos apenas um estudo que avaliou este polimorfismo em lesões gástricas não-malignas, contudo, os autores não encontraram uma associação entre o polimorfismo *APE1* T2197G e a gastrite atrófica em alemães (FRANK *et al.*, 2011). Para o polimorfismo G28152A de *XRCC1* (éxon 10, rs25487, Arg399Gli) o alelo

variante tem sido associado ao risco de câncer gástrico em Taiwan (PUTTHANACHOTE *et al.*, 2017), por outro lado, na população italiana este polimorfismo apresentou ação nula (PALLI *et al.*, 2010). Avaliando lesões não-malignas como: gastrite, úlcera e metaplasia na população japonesa, Tahara *et al.* (2011) também não observaram associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento de lesões. Assim como para o polimorfismo de *APE1 T/G* não é clara a associação do polimorfismo de *XRCC1 G/A* com as etapas iniciais do câncer gástrico subtipo intestinal.

Na via MMR, o polimorfismo -93 G/A de *MLH1* (rs1800734) é bastante controverso na literatura. Na meta-análise de Li *et al.* (2017) o polimorfismo foi associado a um risco global para o desenvolvimento do câncer, incluindo o câncer de estômago. Contraditoriamente, em uma meta-análise anterior, considerando apenas a população asiática, os autores mostraram que o polimorfismo rs1800734 não é útil para estudos de risco para vários tipos de câncer, considerando também o câncer gástrico (HE *et al.*, 2013). Analisando outras populações, Cápella *et al.* (2008) mostraram que na Europa este polimorfismo não se relaciona com o câncer gástrico nem com a gastrite atrófica. Logo, diante das divergências encontradas existe uma necessidade de novas investigações sobre a influência desse polimorfismo no câncer gástrico e nas lesões que o precedem.

No DDR, o polimorfismo A533G de *MGMT* (éxon 5, rs2308327, Lis178Arg) parece reparar o dano no DNA com a mesma eficiência que a proteína selvagem (BUGNI *et al.*, 2017). Em um estudo de meta-análise, Du *et al.* (2013) não identificaram uma associação entre este polimorfismo e vários tipos de câncer analisados. Adicionalmente, Hazra *et al.* (2008) mostraram uma relação inversa entre este polimorfismo e o câncer colorretal em mulheres norte americanas. Por outro lado, um estudo realizado na Austrália mostrou uma tendência do alelo polimórfico entre os pacientes com linfoma não Hodgkin (SHEN *et al.*, 2007) e uma associação entre o alelo variante e o câncer cervical em mulheres chineses foi descrito por Huang *et al.* (2007). Os resultados variam quando populações ocidentais e asiáticas são investigadas, sendo assim, é recomendável a avaliação do impacto em populações individuais.

No HR, o polimorfismo C18067T de *XRCC3* (exon 7, rs861539, Tre241Met) tem sido associado ao risco de câncer gástrico em asiáticos (CHEN *et al.*, 2015), com maior acometimento da região antral nos chineses (ZHAO *et al.*, 2011). No Brasil, este polimorfismo não foi associado a gastrite ou ao câncer de estômago, mas quando analisado em conjunto com os polimorfismos Arg194Trp e Arg399Gli de *XCRRI* passam a ser importantes para o desenvolvimento da gastrite crônica. Neste mesmo estudo, as condições ambientais estão

intrinsecamente ligadas a influência destes polimorfismos no desenvolvimento do câncer gástrico (DUARTE *et al*, 2005). Em outras populações, o polimorfismo Tre241Met não foi associado ao câncer de estômago (BASHIR *et al.*,2015) e ainda apresentou efeito protetor para o câncer de bexiga (SHEN *et al*, 2003).

Além das divergências encontradas na literatura sobre os polimorfismos das enzimas do reparo do DNA há uma carência de estudos que avaliam a influência destes polimorfismos com a via carcinogênica do câncer gástrico subtipo intestinal. E, diferente do que acontece no Japão e alguns países da América Latina como a Costa Rica e o Peru, no Brasil não existe programa de rastreio do câncer de estômago. O principal método diagnóstico utilizado em pacientes com distúrbios pepticos é a endoscopia esogastroduodenal seguida da confirmação por histopatologia, um método subjetivo que depende da *expertise* do patologista para um diagnóstico mais preciso. Desta forma, entendendo que o câncer de estômago intestinal é precedido de lesões na mucosa que evoluem ao longos dos anos, surge a necessidade de estudos sobre potenciais marcadores de risco para a progressão das lesões gástricas antes da transformação maligna quando uma terapia preventiva adequada poderia ser instituída.

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

- Polimorfismos em genes da resposta inflamatória, nomeadamente IL-1, IL1- β , IL-6 e IL-8, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão de lesões não malignas?
- A associação de cepas mais virulentas de *H. pylori* (*cagA*, *cagE*, *virB11*, *vacA s1m1*) com os polimorfismos genéticos de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL1- β , IL-6 e IL-8) estão envolvidos na progressão de lesões não malignas?
- Polimorfismo em genes do sistema de reparo do DNA (*APE1*, *MLH1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *MGMT*) contribuem para o desenvolvimento de lesões não-malignas e o câncer gástrico subtipo intestinal?
- Cepas mais virulentas de *H. pylori* (*cagA*, *cagE*, *virB11*, *vacA s1m1*) contribuem para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e o câncer gástrico por superar a atividade de reparação do sistema de reparo do DNA ou apenas quando a atividade enzimática está comprometida?
- Os polimorfismos das enzimas de reparo do DNA desempenham funções distintas entre populações semelhantes do Brasil (Ceará e Pará)?
- Os polimorfismos estudados podem servir como biomarcadores de prognóstico na doença gástrica?

4 HIPÓTESE

Existe uma relação entre os polimorfismos de interleucinas inflamatórias e a patogenicidade de *H. pylori* na progressão de lesões gástricas não-malignas devido à exacerbação da resposta inflamatória.

A deficiência da atividade de enzimas do reparo do DNA, devido a polimorfismos genéticos, em pacientes infectados com cepas mais virulentas de *H. pylori* contribui para a progressão das lesões gástricas resultando em câncer gástrico subtipo intestinal em populações semelhantes no Brasil.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Verificar a relação entre os polimorfismos de interleucinas pró-inflamatórias e o perfil genotípico de *H. pylori* em lesões gástricas não malignas e a associação entre os polimorfismos de enzimas de reparo do DNA com a virulência de *H. pylori* nas lesões gástricas não-malignas e câncer.

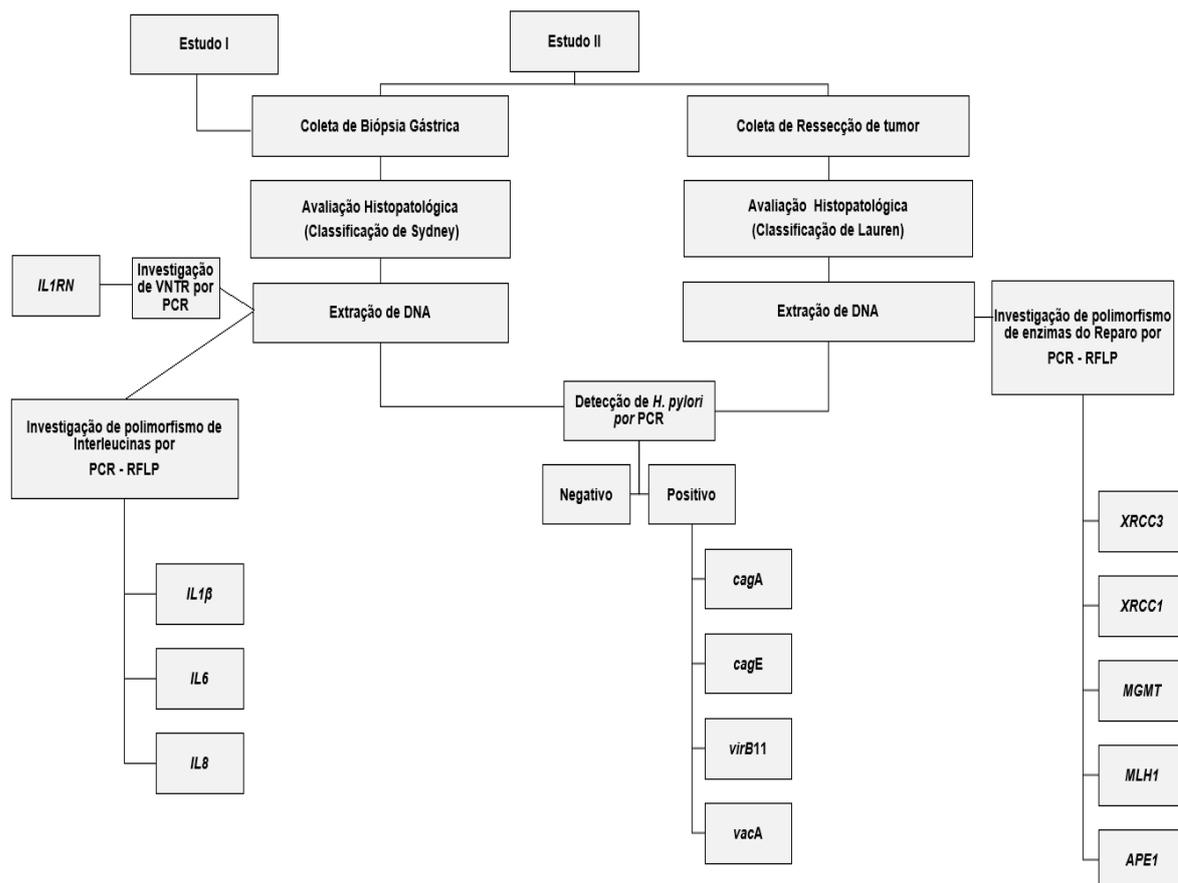
5.2 Objetivos Específicos

- Verificar se as frequências genotípicas dos polimorfismos rs4073 *IL8*, rs1800795 *IL6*, rs16944 *IL1B* e rs2234663 *IL1RN* são diferentes entre os pacientes com lesões gástricas diversas;
- Verificar se as frequências genotípicas dos polimorfismos rs1130409 *APE1*, rs25487 *XRCC1*, rs1800734 *MLH1*, rs2308327 *MGMT* e rs861539 *XRCC3* são diferentes entre os pacientes com lesões pré-neoplásicas e câncer gástrico subtipo intestinal nos estados do Ceará e do Pará;
- Investigar o genótipo de cepas de *H. pylori* quanto aos genes *vacA*, *cagA*, *cagE* e *virB11*, em diferentes lesões gástricas;
- Verificar a influência da idade e do gênero na distribuição genotípica dos polimorfismos de interleucinas (rs4073 *IL8*, rs1800795 *IL6*, rs16944 *IL1B* e rs2234663 *IL1RN*) e enzimas do reparo do DNA (rs1130409 *APE1*, rs25487 *XRCC1*, rs1800734 *MLH1*, rs2308327 *MGMT* e rs861539 *XRCC3*) nas lesões gástricas estudadas;
- Correlacionar a virulência (*vacA*, *cagA*, *cagE* e *virB11*) das cepas de *H. pylori* com os polimorfismos (rs4073 *IL8*, rs1800795 *IL6*, rs16944 *IL1B*, rs2234663 *IL1RN*, rs1130409 *APE1*, rs25487 *XRCC1*, rs1800734 *MLH1*, rs2308327 *MGMT* e rs861539 *XRCC3*) na população estudada.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas a fim de atender os objetivos propostos, conforme demonstrado na figura 31.

Figura 31 – Fluxograma do Material e Métodos



Os experimentos moleculares foram realizados no Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O LABGEM foi instituído no final da década de 90 pela Dra. Silvia Helena Rabenhorst, coordenadora das atividades desenvolvidas, produção científica e responsável pela implementação de tecnologias de biologia molecular. O laboratório dispõe de estrutura e conhecimento técnico para a realização de ensaios moleculares, tais como: PCR, PCR-RFLP, PCR em tempo real e imunohistoquímica. A principal linha de pesquisa envolve investigações sobre o câncer de estômago e genótipos de *H. pylori*. Recentemente, foi iniciada uma série de investigações em lesões gástricas precursoras do câncer de estômago, o que estimulou o desenvolvimento deste trabalho.

6.1 Casuística

Dentre as amostras não-malignas, um total de 417 biópsias gástricas foram obtidas de pacientes encaminhados a endoscopia por especialistas. Foram incluídos no trabalho indivíduos com queixas dispépticas, tais como: dor epigástrica, náusea, sensação de queimação, saciedade precoce e plenitude pós-prandial, ou ainda para pacientes com suspeita de doença gástrica. Foram recrutados pacientes atendidos nos seguintes hospitais de Fortaleza: Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), Hospital Geral de Fortaleza (HGF), Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF) e Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ) – Instituto do Câncer do Ceará (ICC).

Excluímos do estudo os casos de bulbite, pólipos, úlceras, esofagite, pangastrite, gastrite erosiva, mucosa gástrica normal e, devido ao tamanho amostral, foram excluídos dois casos de displasia e oito casos de atrofia gástrica. Após aplicação dos critérios de exclusão, restaram 354 biópsias gástricas. As amostras coletadas no ICC foram utilizadas apenas no estudo de associação com os polimorfismos de enzimas do reparo do DNA, desta forma, totalizando 217 pacientes para o estudo I (polimorfismos de interleucinas).

Quanto as amostras de câncer gástrico, foi obtido um total de 262 amostras de pacientes submetidos a gastrectomia parcial ou total nos seguintes hospitais de Fortaleza: Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), Hospital Geral de Fortaleza (HGF) e Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF) e no Hospital Ophir Loyola e João de Barros Barreto, em Belém, no Pará. Apenas os casos de câncer gástrico subtipo intestinal foram selecionados, permanecendo neste estudo 150 amostras.

6.2 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do UFC326/11, HGF nº 071002/10 e ICC nº 1.397.331 em observância das Resoluções que regulamentam a pesquisa com seres humanos: 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05 e 466/12 (anexos I, II e III). Foram incluídos no estudo apenas pacientes submetidos à ressecção cirúrgica ou biópsia que, após serem informados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa, concordaram em participar, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexos IV e V).

6.3 Coleta de Material Biológico e Dados Clínico-Epidemiológico

Para os pacientes submetidos à endoscopia, foram coletados dois fragmentos de biópsias gástricas das regiões do corpo e do antro em frascos estéreis sem aditivo. Em seguida foram transportados, sob refrigeração, ao LABGEM. Para os pacientes que se submeteram a gastrectomia, os espécimens foram coletados após ressecção cirúrgica e acondicionados em ambiente refrigerado. As amostras coletadas em Fortaleza/Ceará foram transportadas ao LABGEM enquanto as amostras coletadas em Belém/Pará seguiram para o Laboratório de Citogenética Humana.

Em ambos os casos, a coleta de material biológico não comprometeu as amostras de rotina do hospital para avaliação histopatológica. Os fragmentos de biópsia e tumor foram mantidos em freezer a -80°C e -20°C (amostras do ICC) até o momento da extração do DNA e as amostras de sangue foram mantidas a -4°C seguindo-se à extração do DNA em até 48 horas após a coleta.

Os dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes foram obtidos durante a entrevista e por meio de consulta aos prontuários, sendo compilados em ficha estruturada (anexos VI e VII).

6.4 Avaliação Histopatológica

Os dados histopatológicos das biópsias e dos tumores foram obtidos por meio de consulta aos prontuários. Para as biópsias, amostras de antro e corpo foram avaliadas e classificadas de acordo com a classificação de Sydney em Gastrite Crônica Inativa (GCI), Gastrite Crônica Ativa (GCA) e Metaplasia Intestinal (MI). Em casos onde mais de uma lesão foi identificada consideramos aquela que apresenta maior gravidade. Os tumores gástricos foram avaliados de acordo com a classificação de Lauren (1965).

6.5 Extração do DNA

As amostras de biópsias gástricas e amostras tumorais com pelo menos 80% de células tumorais foram submetidas à extração de DNA de alto peso molecular pelo método proposto por Foster e Twell (1996), utilizando CTAB.

Fragmentos de 0,5g de cada amostra foram macerados com o auxílio de bastão de vidro esterilizado ou bisturi, em seguida, foi adicionado 6 mL do tampão de extração (2% CTAB; 1,4M de NaCl; 20mM de EDTA; 100mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2% de β -mercaptoetanol), misturados em vortex e, incubado em Banho-Maria a 60°C por 16 horas. Posteriormente, foi adicionado 1 μ l de proteinase K e incubados por mais 1 hora a 37°C para completa digestão dos fragmentos. Após incubação, foi adicionado volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), para purificação, e centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase superior aquosa foi transferida para um tubo estéril devidamente identificado e o DNA foi precipitado com 2/3 do volume de isopropanol gelado a 100%, misturado por inversão, e acondicionado em freezer à -20°C por 16 horas no freezer. Após precipitação a mostra foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 1M de NaCl, para liberação do complexo DNA-CTAB, e adicionado 2,5 volumes de etanol 100% gelado, misturando-se por inversão e seguido nova centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet foi lavado com etanol a 70% e colocado para secar em temperatura ambiente. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado em 400 μ l de água estéril para as amostras de tumores e 50 μ l para as amostras de biópsias e armazenado em freezer a -15°C.

A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e observado em transluminador com luz ultravioleta. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop TM 3300 (Wilmington, DE, USA).

6.6 Detecção e Genotipagem de *H. pylori*

A detecção de *H. pylori* e dos genes de virulência propostos neste estudo foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A tabela 1 discrimina os oligonucleotídeos e o tempo de anelamento utilizados em cada reação. A presença de *H. pylori* nas amostras do estudo foi realizada pela detecção da região interna do gene *ureC*, que codifica a proteína urease específica para *H. pylori* (BICKLEY et al., 1993). Para a PCR nas biópsias gástricas, foi utilizada uma mistura de 6,5 μ l de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 0,3 μ l de cada oligonucleotídeo a 20 μ M, 1 μ l de DNA a 50 ng e água estéril suficiente para 12,5 μ l. Para as amostras de tumores gástricos, foi utilizada uma mistura composta de tampão 1X (Tris-HCl 20 mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,4 mM de deoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo, 100 ng de DNA e água estéril suficiente para 25 μ L.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata. Como controle positivo foram utilizadas amostras sabidamente positivas.

6.6.1 Presença e subtipos do gene *vacA*

6.6.1.1 *vacA s1 e s2*

A detecção dos alelos *s1* e *s2* foi realizada em uma mesma reação. A mistura para PCR foi composta de tampão Taq Invitrogen® 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 2 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,2 mM de MgCl₂, 0,52 µM de cada oligonucleotídeo, 50 ng de DNA e água estéril suficiente para 12,5µL da solução. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% e corados com nitrato de prata.

6.6.1.2 *vacA m1 e m2*

A detecção dos alelos *m1* e *m2* foi realizada individualmente. Para amplificação do alelo *m1* a mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 0,1% de Tween 20, 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,2 mM deoxinucleotídeos (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 50 ng de DNA e água estéril suficiente para 25 µL. Para o alelo *m2*, a mistura de PCR foi feita de tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% de Tween 20; 1,25 U de Go Taq®Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,25 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,32 µM de cada oligonucleotídeo, 50 ng de DNA e água estéril suficiente para 12,5µL. Os produtos gerados nessas duas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% e corados com nitrato de prata.

6.6.2 Detecção do gene *cagA*

A detecção do gene *cagA* foi realizada em uma mistura de PCR composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 0,1% Tween 20; 1,25 U de Go Taq®Flexi DNA Polimerase (PROMEGA); 0,24 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl₂; 0,48 µM de cada oligonucleotídeo, 50 ng de DNA e água estéril suficiente para 12,5

μL. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% e corado com nitrato de prata.

6.6.3 Detecção do gene *cagE*

A detecção do gene *cagE* foi realizada em uma mistura para PCR composta por GoTaq Master Mix® (Promega), 0,1% Tween 20, 0,48 μM de cada oligonucleotídeo, 50 ng de DNA e água estéril suficiente para 20 μL. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo em transluminador.

6.6.4 Detecção do gene *virB11*

A detecção do gene *virB11* foi realizada em uma mistura para PCR composta 10 μl de GoTaq Master Mix® (Promega), 0,5 mM de MgCl₂; 0,3 μM de cada oligonucleotídeo, 50 ng de DNA e água estéril suficiente para 20 μL. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo em transluminador.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção e genotipagem de *H. pylori*

Gene	Oligonucleotídeos	Temp. anel. (°C)	Tamanho Fragmento (pb)	Referência
<i>ureC</i>	F- 5' AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T 3' R- 5' AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC 3'	55	294	Lage <i>et al</i> , 1995
<i>vacA s1/s2</i>	F- 5' ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC 3' R- 5' CTG CTT GAA TGC GCC AAA C 3'	55	s1: 259 s2: 289	
<i>vacA m1</i>	F- 5' GGT CAA AAT GCG GTC ATG G 3' R- 5' CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC 3'	55	290	Atherton <i>et al</i> , 1995
<i>vacA m2</i>	F- 5' GGA GCC CCA GGA AAC ATT G 3' R- 5' CAT AAC TAG CGC CTT GCA C 3'	55	192	
<i>cagA</i>	F- 5' ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A 3' R- 5' TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATA ACG CCA T 3'	56	297	Domingo <i>et al</i> , 1999
<i>cagE</i>	F- 5' TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC 3' R- 5' GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C 3'	53	509	Sozzi <i>et al</i> , 2005
<i>virB11</i>	F- 5' TTA AAT CCT CTA AGG CAT GCT AC 3' R- 5' GAT ATA AGT CGT TTT ACC GCT TC 3'	49	491	

6.7 Detecção dos Polimorfismos Genéticos em Genes do Reparo do DNA e Interleucinas

Foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), que é a restrição enzimática pós-amplificação, para a detecção dos SNPs nos genes que codificam as interleucinas IL1- β , IL6 e IL8, e as enzimas do reparo do DNA APE-1, XRCC-1, MGMT, MLH-1 e XRCC-3. Para o VNTR do gene *ILIRN* foi realizada a técnica de PCR. Os oligonucleotídeos utilizados, temperatura de anelamento, enzima de restrição, tamanhos dos fragmentos dos genótipos e referências utilizadas estão apresentados na tabela 2.

Para as reações de PCR utilizamos 10 μ l de GoTaq Master Mix® (Promega), 0,5 μ l de cada oligonucleotídeo a 20 μ M, 1 μ l de DNA a 25 ng e água suficiente para 20 μ l. Para a análise de VNTR de *ILIRN* o produto da amplificação foi visualizado em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata após corrida eletroforética, enquanto para os polimorfismos em que utilizamos PCR-RFLP o produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, e visualizado em transluminador. Dando seguimento ao RFLP, os produtos obtidos foram submetidos à digestão enzimática da endonuclease de restrição específica discriminada na tabela 2, à 37°C em termobloco, adicionada de tampão fornecido pelo fabricante, com um volume final de 20 μ L. Os fragmentos resultantes da restrição enzimática foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% e corados com nitrato de prata. Amostras que sabidamente continham os sítios de clivagem para cada enzima de restrição específica foram usadas como controle das reações e os resultados da genotipagem foram confirmados por regenotipagem de aproximadamente 15% das amostras.

Tabela 2 - Características da PCR e PCR-RFLP para os polimorfismos estudados.

Gene	Ref.	Modificação da base	Modificação do a.a.	Exon	Oligonucleotídeo	Temp Anel (°C)	Enz.Restr	Tam. fragmento Digeridos (pb)	Ref
<i>IL1B</i>	SNP <i>rs16944</i>	-511 C>T	-	-	F 5'TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC3' R 5'GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT3'	55	<i>AvaI</i>	CC (190+114) CT (190+114+304) TT (304)	Upadhyay <i>et al.</i> , 2008
<i>IL1RN</i>	VTNR <i>rs2234663</i>	-	-	2	F 5'CTC AGC AAC ACT CCT AT3' R 5'TCC TGG TCT GCA GGT AA3'	58	-	Alelo 1 (410) Alelo 2 (240) Alelo 3 (325) Alelo 4 (500) Alelo 5 (595)	Upadhyay <i>et al.</i> , 2008
<i>IL6</i>	SNP <i>rs1800795</i>	-174 G>C	-	-	F 5'TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG3' R 5'CTG ATT GGA AAC CTT ATTA AG3'	55	<i>SfaNI</i>	GG (140+58) GC (140+58+198) CC(198)	Fernandez <i>et al.</i> , 2000
<i>IL8</i>	SNP <i>rs4073</i>	-251 A>T	-	-	F 5'CCA TCA TGA TAG CAT CTG TA3' R 5'CCA CAA TTT GGT GAA TTA TTA A3'	57	<i>AseI</i>	AA (152+21) AT (152+21+173) TT (173) TT (164)	Wei <i>et al.</i> , 2007.
<i>APE1</i>	SNP <i>rs1130409</i>	T2197G	Asn148Glu	5	F 5'CTG TTT CAT TTC TAT AGG CTA3' R 5' AGG AAC TTG CGA AAG GCT TC3'	49,5	<i>BfaI</i>	TG (164+144+20) GG (144+20) GG (377+238)	Hu <i>et al.</i> , 2001
<i>XRCC1</i>	SNP <i>rs25487</i>	G28152A	Arg399Gln	10	F 5'-TTGTGC TTT CTC TGT GTC CA-3' R 5'-TCC TCC AGC CTTTTC TGA TA-3'	54	<i>MspI</i>	GA (615+377+238) AA (615)	Yin, <i>et al.</i> , 2009
<i>MGMT</i>	SNP <i>rs2308327</i>	A533G	Lys178Arg	4	F5'-TCCATGCTGAGACATAGCTGAC-3' R5'-TGAGCTCCCTCCCAAGCCAGG-3'	66	<i>StuI</i>	AA (307) GG (229+78) AG (307+229+78) GG (134+125)	Crosbie <i>et al.</i> , 2008
<i>MLH1</i>	SNP <i>rs1800734</i>	-93 (G->A)	-	-	F- 5'AGTAGCCGCTTCAGGGA-3' R- 5'CTCGTCCAGCCGCCGAATAA-3	55	<i>PvuII</i>	AA (259) GA (259+134+125) C (136)	Chen <i>et al.</i> , 2005
<i>XRCC3</i>	SNP <i>rs861539</i>	C18067T	Thr241met	7	F5'GCCTGGTGGTCATCGACTC-3' R5'ACAGGGCTCTGGAAGGCACTGCTCAG CTCACGCACC3'	60	<i>NcoI</i>	TT (97+39) CT (136+97+39)	Krupa <i>et al.</i> , 2009

6.8 Análise Estatística

As distribuições genótípicas foram obtidas por contagem direta para verificar se os grupos analisados encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerou-se em equilíbrio quando a diferença entre os números observados e esperados não eram significativos, utilizando como limite de significância $p < 0,05$.

Para as análises estatísticas, utilizamos os programas EPI EPINFO® versão 7,0 e SPSS® versão 20,0 para Windows adotando uma confiança de 95%. Após avaliação da distribuição da população de estudo os dados foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados pelo teste qui-quadrado de Pearson e Man-Whitney. Após isso, modelo de regressão logística multinomial foi traçado para avaliar o risco ajustado e seu respectivo intervalo de confiança 95% no aumento da prevalência independente de câncer gástrico em relação a metaplasia intestinal e gastrites crônicas ativa e inativa, metaplasia intestinal em relação às gastrites crônicas ativa e inativa e da gastrite crônica ativa em relação a ativa.

As análises comparativas entre os grupos histológicos, polimorfismos genéticos e genes de *H. pylori* foram realizadas pelo teste exato de Fisher e teste de Correlação de Spearman. No estudo II, a combinação de SNP's do sistema de reparo do DNA e o genótipos de *H. pylori* com o grupo histológico foi analisado pela árvore de classificação e regressão (CART) que utiliza um modelo em etapas de acordo com a combinação de fatores mais fortemente associados ao desfecho da doença. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

7 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados no formato de artigo científico. Resultados omitidos nos artigos estão apresentados na seção 7.3.

7.1. Artigo I

Polymorphisms of interleukins in gastric lesions: gender and *Helicobacter pylori* genes matter

Morgana Maria de Oliveira Barboza¹, Francivandi Coelho Barbosa¹, Ana Paula Santos do Carmo¹, Fernanda Capelo Barroso¹, Silvia Helena Barem Rabenhorst^{1*}

¹Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

*Correspondence to: Department of Pathology and Forensic Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, Rua Coronel Nunes de Melo, 1315. Rodolfo Teófilo. Fortaleza, Ceará, Brazil. Phone: +55 85 33668639. E-mail: srabenhorst@hotmail.com.

Abstract

Stomach pathologies represent an important public health problem with *Helicobacter pylori* as main inflammation promoter mechanism. The host's genetic background and *H. pylori* virulent genes can contribute to chronic inflammation, and are relevant to gastric lesion outcomes. Our study aimed to compare active chronic gastritis (ACG) and intestinal metaplasia (IM) with inactive chronic gastritis (ICG) according to interleukin polymorphisms of *IL6-174 G/C*, *IL8-251 A/T*, *IL1 β -511 C/T*, and *IL1RN VNTR* taking into account: both patient gender and *H. pylori* genotypes. Interleukin polymorphisms were determined by RFLP-PCR and *H. pylori* genotype by PCR. *IL6-174* heterozygous genotype presented protective effect in women against ACG development. Also, the *IL8-251 T* allele was associated to protection against ACG in women, and conversely a risk for men, thus demonstrating profile according to gender. *H. pylori* was positive in 96% of the cases. Besides the *vacA m1* allele, *cagE* is noted, being a common denominator in both the *cagA* and *virB11* genes, and more frequently associated with IM than with ICG. ACG was associated to more virulent *H. pylori* strains, *IL8-251 T* allele, *IL1RN 2** allele and *IL1 β -511 T* allele. This study highlights the importance the gender related to the cytokines polymorphisms *IL6-174 GC* and *IL8-251 AT* in gastric diseases and the relationships between the host and the bacteria in ACG and IM development.

Key words: polymorphisms; interleukins; gender; gastritis; intestinal metaplasia; *Helicobacter pylori*.

Interest Conflict: The authors declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

1. Introduction

Gastric lesions can evolve to a wide variety of results, from chronic benign lesions to cancer. Progressions follow a cascade model in several steps where *Helicobacter pylori* is a major risk factor. In the gastric epithelium, *H. pylori* infection incites the host's immune response, which is considered the main cause of pathological events. However, only 10-15% of the infected individuals will progress to more severe outcomes. This indicates the existence of complex interactions between host genetics, bacterial virulence, and environmental factors that can drive the progression from chronic mucosal inflammation to gastric cancer [1, 2].

Considering the host, genetic cytokine polymorphisms, especially in the gene promoter regions, are often associated with susceptibility to development of gastric diseases such IL-6, IL-8 and IL-1 [3, 4, 5]. These cytokines have chemotactic action, amplifying the immune response which can cause damage to the gastric mucosa and contribute to hypochlorhydria, leading to severe gastric lesions [6, 7, 8, 9]. In a review by Sugimoto et al. [10], the G allele of *IL6-174 G/C* polymorphism was associated with gastric adenocarcinoma. However, in meta-analysis from Junli et al. [11], the opposite was found. It is interesting to note that the frequency of the polymorphic allele C differs widely among populations [10]. This provokes studies to elucidate the role of the polymorphism in gastric lesions. Several studies have demonstrated an association between *IL8-251 A/T* polymorphisms and risk for gastric disease such peptic ulcer, *chronic atrophic gastritis*, and gastric cancer [2, 5]. Further, the variant allelic of the *IL1 β -511 C/T* polymorphism and the variable number of tandem repeats (VNTR, 86-bp repeats) in the *IL1RN* gene, which encode the IL-1 and IL-1Ra receptor antagonist, respectively, has been associated with precancerous gastric lesions and gastric cancer [12, 13]. In addition to differences in expression of polymorphic alleles, host gender also appears to affect immune response to *H. pylori* infection, yet this aspect has been little explored.

H. pylori is highly diverse genetically and certain genotypes have been associated with virulence, mainly *H. pylori* carrying gene *vacA* (specifically the *s1m1* alleles), and the cytotoxin-associated gene A, *cagA*, considered a right side marker of the cytotoxin-associated gene pathogenicity island *cagPAI* [8]. Apart from the *cagA*, *H. pylori* strains carrying *cagE* and *virb11* genes have been described in the early stages of gastric cancer, and considered markers of the right and left side genes of *cagPAI*, respectively, indicating the involvement of these genes in the development of gastric lesions [14].

Taking into consideration that polymorphisms in the promoter regions of cytokine genes may be relevant for the progression from a more benign to more server gastric lesion, our study

aimed to compare *IL1B-511 C/T*, *IL1RN*, *IL6-174 G/C* and *IL8-251 A/T* in different gastric lesions, and also to consider host gender, and polymorphism interactions with *H. pylori* genotype. To our best knowledge, this is the first report on the role of genetic polymorphisms of these interleukins involved in the progression of *H. pylori*-associated gastric lesions in northeastern of Brazil.

2. Materials and Methods

2.1 Patients and samples

Patients (217) with dyspeptic symptoms who underwent endoscopy at the *Hospital Universitário Walter Cantúdeo*, and *Hospital Geral de Fortaleza, Ceará*, Brazil were enrolled in the study. Cases presenting duodenal, gastric or esophageal masses, or Barrett esophagus lesions, where previous gastric or duodenal surgery had been performed, or if there had been recent use of non-steroidal anti-inflammatory drugs were excluded. After applying the exclusion criteria, 192 patients remained in the study. A clinical and socio epidemiologic questionnaire was applied.

For histopathological examinations and detection of *H. pylori*, four biopsies were collected in which two fragments from antrum and body were for histological examination and other two were frozen at -20°C for later analyses. Diagnoses were made by an expert pathologist, according to the Sydney System classification (1996), using criteria based on morphological findings in inactive chronic gastritis (ICG), active chronic gastritis (ACG) and intestinal metaplasia (IM). ICG was defined by diffuse lymphocytic inflammatory infiltrate or organized in follicular/nodular structures and ACG gastritis had neutrophilic infiltrate permeating the glands and/or lamina propria [15, 16]. Due to the small sample of atrophic gastritis, these cases were not included.

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Ceará (047.06.09), and by the Committee for Ethics and Research of the *Hospital Geral de Fortaleza-HGF* (07014/10). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

2.2 DNA extraction from biopsies

Genomic DNA was extracted from single frozen stomach fragments in which the lesion was representative, using cetyltrimethyl ammonium bromide, as adapted from Foster and Twell [17]. DNA extraction quality was analyzed using 1% agarose gel electrophoresis, and the

amount of DNA was determined using the NanoDrop™ 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

2.3 Detection and genotyping of *Helicobacter pylori* by PCR

H. pylori infection was detected by the presence of the conserved *ureC* gene [14]. *H. pylori*-positive samples were evaluated for the presence of the *vacA* alleles, *cagA*, *cagE* and *virB11* genes as described in the literature [14]. Amplified products were submitted to electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel and silver staining for *ureC*, *cagA* and *vacA* genes, and a 1% agarose gel with ethidium bromide staining for *virB11* and *cagE* genes.

2.4 Genotype detection

Polymorphisms of the *IL1RN* VNTR (rs2234663) were determined by PCR [18]. For analysis, *IL1RN**2 and *IL1RN**6 repetitions were considered short alleles; *IL1RN**1, *IL1RN**3, *IL1RN**4 and *IL1RN**5 were considered long alleles (*IL1RN*L). Polymorphisms in the *IL1β-511* C/T (rs16944), *IL6-174G/C* (rs1800795) and *IL8-251A/T* (rs4073) genes were characterized using PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method according to the literature [19, 20, 21]. The fragments from PCR-RFLP and VRTN were separated using 8% polyacrylamide gel and silver staining. For all polymorphisms, randomly selected samples were re-genotyped (15% of samples).

2.5 Statistical analysis

The statistical analyses were conducted using EPINFO® 6.0 and SPSS® 15.0 statistical software programs (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were evaluated by the Chi-square test (χ^2), Fisher's exact test, and Spearman's Correlation, with p-values of lower than 0.05 regarded as statistically significant.

3. Results

Of the patients in this study, 40 (20%) cases presented inactive chronic gastritis (ICG), 112 (56%) active chronic gastritis (ACG), and 40 (20%) intestinal metaplasia (IM). The median age was 52 years old, ranging from 8 to 88 years old. Comparative analysis considering the median age as the cut-off point showed that patients older than 52 years old presented IM (80%) more frequently than ICG (52.5%) ($p=0.009$). Differences involving gastric lesion frequency and gender were not observed.

All of the polymorphisms studied obeyed the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotypes frequencies and statistical analysis are shown in Table 1. In comparative analysis between the lesions, ICG was used as a reference since the neutrophilic infiltrate, involved with DNA damage, is absent [22]. In these analyses, only the *IL6-174* heterozygous (GC) genotype was significantly more frequent in ICG than ACG ($p=0.01$).

Table 1. Genotype frequencies of *IL6-174*, *IL8-251*, *IL1 β -511* and *IL1RN* in the gastric lesions.

Genotype	ICG	ACG	<i>p</i>	O.R. (95%C.I.)	IM	<i>p</i>	O.R. (95%C.I.)
<i>IL6-174 G>C</i>							
<i>GG</i> (57.8%)	18 (45%)	71 (63.3%)	1		22 (55%)	1	
<i>GC</i> (33.8%)	19 (47.5%)	30 (26.97%)	0.01*	0.40 (0.17-0.93)	16 (40%)	0.4	0.6 (0.2-1.8)
<i>CC</i> (8.3%)	3 (7.5%)	11 (9.8%)	0.91	0.93 (0.2-4.7)	2 (5%)	0.5	0.5 (0.06-4.7)
<i>GC+GG</i> [□]	37 (92.5%)	101 (90.1%)	0.25	0.69 (0.35-1.37)	38 (95%)	0.65	0.8 (0.3-1.9)
<i>GC+CC</i> [□]	22 (55%)	41 (36.6%)	0.04	0.47 (0.21-1.04)	18 (45%)	0.37	0.67 (0.25-1.77)
<i>IL8-251 A>T</i>							
<i>AA</i> (29.6%)	8 (20%)	36 (32.1%)	1		13 (32.5%)	1	
<i>AT</i> (50.5%)	23 (57.5%)	56 (50%)	0.18	0.54 (0.20-1.45)	18 (45%)	0.17	0.48 (0.14-1.60)
<i>TT</i> (19.7%)	9 (22.5%)	20 (17.8%)	0.20	0.49 (0.14-1.68)	9 (22.5%)	0.45	0.62 (0.14-2.65)
<i>AT+AA</i> [□]	31 (77.5%)	92 (82.1%)	0.34	0.66 (0.25-1.68)	31 (77.5%)	0.34	0.62 (0.20-1.88)
<i>AT+TT</i> [□]	32 (80%)	76 (67.8%)	0.14	0.53 (0.20-1.35)	27 (67.5%)	0.20	0.52 (0.17-1.60)
<i>IL1β-511 C>T</i>							
<i>CC</i> (23.9%)	8 (20%)	27 (24.1%)	1		11 (27.5%)	1	
<i>C</i> (57.2%)	25 (62.5%)	62 (55.3%)	0.50	0.73 (0.77-1.99)	23 (57.5%)	0.46	0.67 (0.20-2.21)
<i>TT</i> (18.7%)	7 (17.5%)	23 (20.5%)	0.96	0.97 (0.27-3.59)	6 (15%)	0.51	0.62 (0.12-3.22)
<i>CT+CC</i> [□]	33 (82.5%)	89 (79.4%)	0.61	0.80 (0.30-2.08)	34 (85%)	0.58	0.75 (0.24-2.34)
<i>CT+TT</i> [□]	32 (80%)	85 (75.8%)	0.59	0.79 (0.29-2.06)	29 (72.5%)	0.43	0.66 (0.21-2.09)
<i>IL1RN VNTR</i>							
<i>L/L</i> (46.8%)	17 (42.5%)	54 (48.2%)	1		19 (47.5%)	1	
<i>L/2</i> (39.5%)	18 (45%)	43 (38.3%)	0.47	0.75 (0.32-1.75)	15 (37.5%)	0.54	0.75 (0.26-2.14)
<i>2/2</i> (13.5%)	5 (12.5%)	15 (13.3%)	0.92	0.94 (0.27-3.50)	6 (15%)	0.91	1.0 (0.23-5.08)
<i>L/2+L/L</i> [□]	35 (87.5%)	97 (86.6%)	0.68	0.87 (0.42-1.79)	34 (85%)	0.73	0.87 (0.36-2.10)
<i>L/2+2/2</i> [□]	23 (57.5%)	58 (51.7%)	0.53	0.79 (0.36-1.75)	21 (52.5%)	0.65	0.82 (0.31-2.17)

* The *p* values less 0.05 was considering significant; O.R. *Odds Ratio*; C.I. confidence interval; ICG-Inactive chronic gastritis; ACG-Active chronic gastritis; IM-intestinal metaplasia; *IL-1 β -IRN/-6/-8*, interleukin *-1 β -IRN/-6/-8*.

□ *IL-6* GC+GG – recessive model; GC+CC – dominant model; *IL-8* AT+AA – recessive model; AT+TT dominant model; *IL-1 β* CT+CC – recessive model, CT+TT dominant model

Taking into account the patient gender in the comparative analyses between lesions, protection was observed to ACG for both the *IL6-174* and *IL8-251* polymorphisms only among women (Table 2). For *IL8-251* it was observed for the heterozygous genotype ($p=0.01$, OR: 0.23, IC: 0.06-0.08), and for the dominant model for polymorphic allele ($p = 0.01$, OR: 0.26, IC: 0.07-0.94); while *IL6-174* showed significance only for the dominant model ($p=0.001$, OR: 0.24, IC: 0.09-0.67). Comparing the genders for the same lesion diagnosis, in ACG, the *IL8-251* heterozygous genotype and the dominant model were more frequently found in men than

women ($p=0.004$, OR: 3.72, IC: 1.36-10.4; $p=0.004$, OR: 3.51, IC: 1.35-9.34). For all of the aspects analyzed, synergistic association was not found among the polymorphisms studied, and no significant results were observed with respect to the cut-off age.

Table 2. Genotype frequencies according gender.

Genotype frequencies <i>IL8-251</i> in ACG according gender					
<i>IL8-251</i>	Man N=50	Woman N=62	<i>p</i>	χ^2	O.R.
AA	9 (18%)	27 (43.5%)	1		
AT	31 (62%)	25 (40.3%)	0.004*	8.2	3.72 (1.36-10.41)
TT	10 (20%)	10 (16.1%)	0.05	3.5	3.0 (0.82-11.28)
AA+AT	40 (80%)	52 (83.8%)	0.05	3.7	2.31 (0.91-5.98)
TT+AT	41 (82%)	35 (56.4%)	0.004*	8.2	3.51 (1.35-9.34)
Genotype frequencies <i>IL6-174</i> and <i>IL8-251</i> in woman in ACG and ICG					
<i>IL6-174 G>C</i>	ACG N=62	ICG N=24	<i>p</i>	χ^2	O.R.
GG	41 (66.1%)	10 (41.6%)	1		
GC	16 (25.8%)	11 (45.8%)	0.04	4.01	0.35 (0.11-1.12)
CC	5 (8%)	3 (12.5%)	0.25	1.29	0.41 (0.07-2.61)
GG+GC	57 (91.9%)	14 (58.3%)	0.98	0	0.99 (0.37-2.68)
CC+GC	21 (33.8%)	21 (87.5%)	0.001*	9.57	0.24 (0.09-0.67)
<i>IL8-251 A>T</i>					
AA	27 (43.5%)	4 (16.6%)	1		
AT	25 (40.3%)	16 (66.6%)	0.01*	6.0	0.23 (0.06-0.88)
TT	10 (16.1%)	4 (16.6%)	0.20	1.62	0.37 (0.06-2.24)
AA+AT	52 (83.8%)	20 (83.3%)	0.10	2.68	0.39 (0.10-1.36)
TT+AT	35 (56.4%)	20 (83.3%)	0.01*	5.42	0.26 (0.07-0.94)

* Statistical significant difference ($p < 0.05$)

The presence of *H. pylori* was observed in 96% of the patients (184/192): ICG 92.5%, ACG 98.2% and IM 92.5%. The distribution of *vacA* alleles (*s1*, *m1* and *s1m1*) were respectively: ICG – 40.5%, 8.1%, 2.7%; ACG – 46.3%, 19%, 10.9%, and IM – 37.8%, 40.5%, 16.2%. A positive correlation was observed between *m1* and IM ($r = 0.237$, $p = 0.001$). Although strains *s1m1 vacA* were more frequent in ACG (10.5%) and IM (16.2%) than in ICG (2.7%), no significant differences were found between them.

The frequency of *H. pylori* *cagPAI* genes were statically higher in ACG than ICG: *cagA* (64.5%; $p=0.01$), *virB11* (58.2%; $p=0.002$) and *cagE* (56.4%; $p=0.00007$). These results were also significant in the correlation analyses (*cagA* $r = 0.174$, $p = 0.020$; *cagE* $r=208$, $p=0.005$; *virB11* $r=186$, $p=0.011$). Additionally, *cagE* was significantly more frequent in IM (51.4%; $p=0.03$) than ICG.

H. pylori strains *cagA+ cagE+ virB11+*, and *cagA+ cagE+ virB11-* were more frequent in ACG ($p=0.00007$; $p=0.03$) and IM ($p=0.018$, $p=0.04$) than in ICG, having as a reference, strains without *cagPAI* genes. It is interesting to note that only *cagE* or the combinations

cagE+cagA+ and *cagE+virB11+* were more frequent in ACG and IM; while strains *cagA+virB11+* were more frequent in ACG alone ($p = 0.01$).

For global analysis of bacterial and host genetic factors, *H. pylori* strains were grouped according to virulence genotype. Virulent groups were defined according to the *vacA* alleles and *cagPAI* integrity. Among the ACG cases, more virulent strains were associated with the *IL8-251* T allele (AT; $p = 0.01$ and AT+TT; $p = 0.01$), the *IL1RN* *2 allele (L/*2+*2/*2; $p=0.03$), and the *IL1 β -511* T allele (CT; $p=0.01$ and CT+TT; $p = 0.001$). It is interesting to point out that considering only *cagPAI* genes, the T allele of *IL1 β -511* remained associated with the more virulent strains (CT; $p = 0.01$; CT+TT; $p = 0.01$) (Table 3). Analysis between bacterial virulence, the host gender and interleukin polymorphism was not significant.

Table 3. Genotype frequencies of polymorphisms studies according virulent groups.

Group I				Group II			
<i>IL8-251</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>	<i>IL8-251</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>
AA	17 (31.4%)	9 (69.2%)	1	AA	8 (26%)	18 (50%)	1
AT	27 (50%)	2 (15.3%)	0.01*	AT	16 (52%)	13 (36%)	0.06
TT	10 (18.5%)	2 (15.3%)	0.25	TT	7 (23%)	5 (14%)	0.1
AT+AA	44 (81.4%)	11 (84.6%)	0.15	AT+AA	24 (77%)	31 (86%)	0.26
AT+TT	37 (68.5%)	4 (30.7%)	0.01*	AT+TT	23 (74%)	18 (50%)	0.04
<i>IL1β-511</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>	<i>IL1β-511</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>
CC	14 (25.9%)	5 (38.4%)	1	CC	3 (10%)	16 (44%)	1
CT	30 (55.5%)	5 (38.4%)	0.27	CT	21 (68%)	14 (39%)	0.01*
TT	10 (18.5%)	3 (23%)	0.83	TT	7 (23%)	6 (17%)	0.02
CT+CC	44 (81.4%)	10 (76.9%)	0.46	CT+CC	24 (77%)	30 (83%)	0.02
CT+TT	40 (74%)	8 (61.5%)	0.36	CT+TT	28 (90%)	20 (56%)	0.001*
Group III				Group IV			
<i>IL1β-511</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>	<i>IL1β-511</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>
CC	12 (23.5%)	7 (43.7%)	1	CC	10 (9%)	15 (13.6%)	
CT	29 (56.8%)	6 (37.5%)	0.10	CT	41 (37.2%)	19 (17.2%)	0.015*
TT	10 (19.6%)	3 (18.7%)	0.40	TT	14 (12.7%)	7 (6.3%)	0.07
CT+CC	41 (80.3%)	13 (81.2%)	0.28	CT+CC	51 (46.3%)	34 (30.9%)	0.57
CT+TT	39 (76.4%)	9 (56.2%)	0.11	CT+TT	55 (50%)	26 (23.6%)	0.01*
<i>IL1RN</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>	<i>IL1RN</i>	More Virulent	Less Virulent	<i>p</i>
L/L	23 (45%)	12 (75%)	1	L/L	36 (32.7%)	20 (18.1%)	
L/2	21 (41.1%)	4 (25%)	0.11	L/2	18 (16.3%)	19 (17.2%)	0.13
2/2	7 (13.7%)	0 (0%)	0.06	2/2	11 (10%)	2 (1.8%)	0.15
L/2+L/L	44 (86.2%)	16 (100%)	0.43	L/2+L/L	54 (49%)	39 (35.4%)	0.06
L/2+2/2	28 (54.9%)	4 (25%)	0.03*	L/2+2/2	29 (26.3%)	21 (19%)	0.50

* Statistical significant difference ($p < 0.05$)

Group I: More virulent: *s1+cagA+cagE+virB11+* or *s1+cagA+virB11+* or *s1+cagE+virB11+* or *s1+cagA+* or *s1+cagE+* or *s1+virB11+* or *s1+cagA+cagE+* or *s1+cagPAI* negative or *s2+cagA+cagE+virB11+* or *s2+cagA+virB11+* or *s2+cagE+virB11+* and Less virulent: *s2+cagA+* or *s2+cagE+* or *s2+virB11+* or *s2+cagA+cagE+* or *s2+cagPAI* negative.

Group II: More virulent: *s1+cagA+cagE+virB11+* or *s1+cagA+virB11+* or *s1+cagE+virB11+* or *s2+cagA+cagE+virB11+* and Less virulent: *s1+cagA+* or *s1+cagE+* or *s1+virB11+* or *s1+cagA+cagE+* or *s1+cagPAI* negative or *s2+cagA+* or *s2+cagE+* or *s2+virB11+* or *s2+cagA+cagE+* or *s2+cagPAI* negative.

Group III: *s1+cagA+cagE+virB11+* or *s1+cagA+virB11+* or *s1+cagE+virB11+* or *s1+cagA+* or *s1+cagE+* or *s1+virB11+* or *s1+cagA+cagE+* or *s1+cagPAI* negative and Less virulent: *s2+cagA+cagE+virB11+* or *s2+cagA+virB11+* or *s2+cagE+virB11+* or *s2+cagA+* or *s2+cagE+* or *s2+virB11+* or *s2+cagA+cagE+* or *s2+cagPAI* negative.

Group IV: More virulent: *cagA+cagE+virB11+* or *cagA+cagE+virB11-* or *cagA-cagE+virB11+* or *cagA-cagE-virB11+* and Less virulent: *cagA-cagE-virB11-* or *cagA+cagE-virB11+* or *cagA+cagE-virB11-*.

4. Discussion

Due to the inflammatory conditions of gastric diseases, the association between interleukin polymorphism and these diseases has become a subject of studies. However, most of them neither consider host gender and *H. pylori* genotype nor are they restricted to the *cagA* gene. In this study we were interested in factors that might determine the gastric lesion outcome, interesting for patient management. For that, we discriminated the gastritis as active and inactive given the likely role of reactive oxygen species derived from neutrophils and proteases, making the neutrophil "activity" linked to tissue damage [22].

In this study, the *IL6-174* polymorphism was highlighted. The *IL6-174* heterozygous genotype (GC) significantly more frequent in ICG than ACG showed a protective effect for neutrophils influx in the gastric mucosa, which may be a protection for DNA damage beyond the effect of *IL6* polymorphic allele. IL-6 is a pleiotropic cytokine, involved in a wide range of biological activities. Its expression is subject to basal regulation, but in the face of an infection it is rapidly induced [23]. Consistently, IL-6 deficiency leads to weakening of both innate and adaptive immunity to viral, parasitic, and bacterial infection. Also IL-6 activates JAK-mediated STAT3 signaling, which in turn drives transcription of genes involved in proliferation, protection from cell death and other processes that are critically important in oncogenesis [24]. In vivo study has demonstrated that the *IL6-174 C* allele is associated with a decrease in plasma IL-6 levels [25]. Thus, it is possible that the heterozygous genotype allows infection control without exacerbating inflammation, characterizing an inactive gastritis. Only two studies evaluate this polymorphism in gastric lesion however, active versus inactive gastritis was not considered. Pohajanen et al. [26] and Gatti et al. [27] found no associations for *IL6-174* polymorphism in intestinal gastric cancer, ulcer, chronic gastritis, gastric atrophy or IM.

Taking into account the host's gender, the *IL6-174* protection observed was restricted to women. The relevance of gender in risk/protection analyses was also demonstrated for the protection found in *IL8-251*, which the polymorphic allele was only significant for women, and conversely, were associated to risk in men. Taking into account these results, it seems that the *IL8-251* polymorphism plays a dual role in ACG according to gender, which might be due to hormonal and/or lifestyle differences [28].

No associations were observed for *IL1 β -511* or *IL1RN* polymorphisms in the present study. This result is in agreement with systematic review for *IL1 β -511* in precancerous gastric lesions by Peleteiro et al. [29]. In addition, Con et al. [30] found no association between atrophic

gastritis and intestinal metaplasia for *IL1 β -511* but *IL*2/2* was associated with intestinal metaplasia.

The *H. pylori* risk for gastric lesions is, in fact, associated to its virulence genes, which contribute to continued inflammation in different ways. In this study, we found a similar distribution of *s1* and *s2* alleles independent of the lesions. Chiarini et al. [31] reported high *s1* allele frequency in ACG rather than ICG. On the other hand we found *m1* more frequent in IM than ICG, corroborating meta-analysis by Abdi et al. [32]. According to Yamaoka [8] the incidence of *m1* is related to an increased risk for gastric cancer. Thus, *m1* could be a potential risk marker for preneoplastic lesion. The importance of the *s1* and *vacA s1m1* alleles [32] for malignant lesions could be observable in their higher frequency in ACG and IM than in ICG, though without significant differences.

Other important virulence *H. pylori* factors for establishment of disease are the *cagPAI* genes. In our study, *H. pylori* strains carrying all of the *cagPAI* genes studied were more frequent in ACG than in ICG. Higher frequencies of *cagA*, *cagM*, *cagT* and *cagE* genes in ulcers and in cancers, beyond non-ulcerated dyspepsia have been observed in other studies [33, 34, 35]. In this study, *cagE* was highlighted once this gene was noted as a common denominator in combinations with *cagA* and *virB11* genes, both were more frequent in IM than in ICG. Ramis et al. [36] found an association between *cagE* and erosive gastritis, as compared to enanthematous gastritis suggesting that *cagE* induces high secretion of IL-8, and leading to extensive gastric mucosa damage.

For the analyses with interleukin polymorphisms, *H. pylori* strains were grouped as more and less virulent. In ACG, the heterozygous genotype and dominant model of *IL8-251* for the T allele were more frequent for more virulent *H. pylori* strains. The relationship between intact or partially deleted *cagPAI* genes (*cagA*, *cagE*, *cagM*, *cagT*) and higher IL-8 secretion has been described [35]. As the *IL8-251* T allele is associated to lower *IL8* expression than the A allele [37], the *H. pylori* virulence factors probably mediated the stimulation of IL-8 overcoming the allele effect, justifying the association.

In this work, patients with ACG, carrying the polymorphic allele *IL1RN*2*, were infected with the more virulent *H. pylori* strains. Other studies have demonstrated a relationship between *cagA* positive strains and the *IL1RN*2* allele, in ulcerative lesions, IM and adenocarcinoma [12]. Considering only *cagPAI* genes, the heterozygous genotype and dominant model for *IL1 β -511* were associated to ACG and more virulent strains, suggesting that *cagPAI* is most important for IL-1 β stimulation than *vacA* alleles, results similar to Martínez-Carrillo et al. [38].

Both alleles, *IL1RN*2* and *IL1 β -511 T*, were associated to a more severe and prolonged immune response, and the association of these alleles with a more virulent strain combines two factors that maintain inflammation process observed in the active chronic gastritis.

In conclusion, our study point out the importance of gender related cytokines studies, since *IL6-174 GC* and *IL8-251 AT* demonstrated protective effect in women for active chronic gastritis development, while *IL8-25 AT* was associated to male population risk. Also the importance of *H. pylori* genes (*vacA ml*, *cagA*, *cagE*, and *virb11*), specially *cagE*, for ACG and IM development was suggested. From the host and bacterial genetic background, we have shown that patients carrying *IL8-251 T*, *IL1 β -511 T* or *IL1RN *2* alleles, was associated to ACG when infected by the more virulent *H. pylori* strains (those carrying intact or partial *cagPAI*), highlighting the importance of host cytokines polymorphism and bacterial genetic interactions in the development of these diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) grant number: 13192399-4. We are grateful to Hospital Universitário Walter Cantídeo and Hospital Geral de Fortaleza.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

REFERENCES

- [1] Contenduca V, Sansonno D, Lauletta G, Dammacco FS, Ingravallo G. *H. pylori* infection and gastric cancer: state of the art. *Int J Oncol.* 2013; 42:5-18.
- [2] Caleman Neto A, Rasmussen LT, Labio RW, et al. Gene polymorphism of interleukin 1 and 8 in chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori*. *JVATiTD.* 2014; <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-17>
- [3] Ma J, Wu D, Hu X, Li J, Cao M, Dong W. Associations between cytokine gene polymorphisms and susceptibility to *Helicobacter pylori* infection and *Helicobacter pylori*

related gastric cancer, peptic ulcer disease: A meta-analysis. PLoS ONE. 2017; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176463>

[4] Gatti LL, Burbano RR, Zambaldi-Tunes M, et al. Interleukin-6 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection in adult brazilian patients with chronic gastritis and gastric adenocarcinoma. Arch Med Res. 2007; 38:551-5.

[5] Ramis IB, Vianna JS, Gonçalves CV, Groll AV, Dellagostin AO, Silva PEA. Polymorphisms of the IL-6, IL-8 and IL-10 genes and the risk of gastric pathology in patients infected with *Helicobacter pylori*. J Microbiol Immunol Infect. 2015; 50(2):153-9.

[6] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010; doi:10.1016/j.cell.2010.01.025

[7] Łukaszewicz M, Mroczko B, Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. Pol Arch Med Wewn. 2007; 117(5-6):247-51.

[8] Yakamoa Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010; 7(11): 629–41.

[9] Zhang X-Y, Zhang P-Y, Aboul-Soud MAM. From inflammation to gastric cancer: role of *Helicobacter pylori*. Oncol Lett. 2017; 13(2): 543-8.

[10] Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. World J Gastroenterol. 2010; 16(10): 1188–200.

[11] Junli W, Wenjun H, Jinxin L, Legen N, Yesheng W, Fenglian Y. Association of IL-6 polymorphisms with gastric cancer risk: evidences from a meta-analysis. Cytokine. 2012; 59:176–83.

[12] Barbosa HPM, Martins LC, Santos SEB, et al. Interleukin-1 and TNF- α polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a brazilian amazon population. World J Gastroenterol. 2009; 15(12): 1465-71.

[13] Drici AE-M, Moulessehoul S, Trifit A, et al. Effect of IL-1 β and IL-1RN polymorphisms in carcinogenesis of the gastric mucosa in patients infected with *Helicobacter pylori* in Algeria. Libyan J Med. 2016; <https://doi.org/10.3402/ljm.v11.31576>

[14] Lima VP, Silva-Fernandes IJ, Alves MK, Rabenhorst SH. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in brazilian's patients: an

association with histopathological parameters. *Cancer Epidemiol.* 2011; <https://doi.org/10.1016/j.canep.2011.02.017>

[15] Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System. *Am J Sur Path.* 1996; 20:1161-81.

[16] Kayaçetin S, Güreş S. What is gastritis? What is gastropathy? How is it classified? *Turk J Gastroenterol.* 2014; 25: 233-47.

[17] Foster GD, Twell D. *Plant gene isolation: principles and practice.* 1rd ed. New York: Wiley; 1996.

[18] Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet.* 1993; 91:403-4.

[19] Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 2000; 49(3):517-20.

[20] Farkas G Jr, Hofner P, Balog A, et al. Relevance of transforming growth factor-beta1, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in patients with chronic pancreatitis. *Eur Cytokine Netw.* 2007; 18(1):31-7.

[21] Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Potential influence of interleukin-1 haplotype IL-1 beta-511*T- IL-1RN*1 in conferring low risk to middle third location of esophageal cancer: a case-control study. *Hum Immunol.* 2008; 69(3):179-86.

[22] Butcher LD, den Hartog G, Ernst PB, Crowe SE. Oxidative stress resulting from *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017; 20(3):316-22.

[23] Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC, Schaper F. Hepatic acute phase proteins-regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol.* 2012; 91(6-7):496-505.

[24] Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171:59-76.

- [25] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998; 1,102(7): 1369-76.
- [26] Pohjanen V-M, Koivurova O-P, Mäkinen JM, et al. Interleukin 6 gene polymorphism -174 is associated with the diffuse type gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52(10):976-82.
- [27] Gatti LL, Tunes MZ, Lábio RW, Silva LC, Smith MAC, Payão SLM. Interleukin-6 polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in Brazilian adult patients with chronic gastritis. *Clin Exp Med*. 2005; 5:112–116.
- [28] Abbasi A, Vieira RP, Bischof F, et al. Sex-specific variation in signaling pathways and gene expression patterns in human leukocytes in response to endotoxin and exercise. *J Neuroinflammation*. 2016; <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0758-5>
- [29] Peleteiro B, Lunet N, Carrilho C, et al. Association between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions: systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19:762-76.
- [30] Con SA, Con-Wong R, Con-Chin GR, et al T. Serum pepsinogen levels, *Helicobacter pylori* CagA status, and cytokine gene polymorphisms associated with gastric premalignant lesions in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16(12): 2631-6.
- [31] Chiarini A, Calà C, Bonura C, et al. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28:437–46.
- [32] Abdi E, Latifi-Navid S, Latifi-Navid H, Safarnejad B. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin genotypes and preneoplastic lesions or gastric cancer risk: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016; 31(4):734-44.
- [33] Kawamura O, Murakami M, Araki O, et al. Relationship between gastric disease and deletion of cag pathogenicity island genes of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Dig Dis Sci*. 2003; 48:47–53.
- [34] Kauser F, Khan AA, Hussain MA, et al. The cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(11):5302–8.
- [35] Salih BA, Guner A, Karademir A, et al. Evaluation of the effect of cagPAI genes of *Helicobacter pylori* on AGS epithelial cell morphology and IL-8 secretion. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014; 105:179–89.

- [36] Ramis IB, Vianna JS, Silva Junior LV, Von Groll A, Silva PE. *cagE* as a biomarker of the pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(2):185-9.
- [37] Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14(11):2487-93.
- [38] Martínez-Carrillo DN, Garza-González E, Betancourt-Linares R, et al. Association of IL1B-511C/-31T haplotype and *Helicobacter pylori vacA* genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. *BMC Gastroenterol*. 2010; <https://doi.org/10.1186/1471-230X-10-126>

7.2. Artigo II

Association of polymorphisms of DNA repair genes with gastric cancer development

Morgana Maria de Oliveira Barboza^a, Reginaldo Ferreira da Costa^b, João Paulo Pordeus Gomes^c, Rommel Mario Rodríguez Burbano^d, and Silvia Helena Barem Rabenhorst^{a*}

^a Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^b Hospital Haroldo Juaçaba, Instituto do Câncer do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^c Departamento de Ciências da Computação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^d Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Ophir Loyola, Belém, Pará, Brazil.

*Corresponding author: Silvia Helena Barem Rabenhorst. Tel: +55 85 33668639; Fax: +55 85 33668639; Email: srabenhorst@hotmail.com.

Abstract

The main mechanism proposed for the progression of gastric disease is the DNA damage caused by chronic inflammation as result of *H. pylori* infection. The imbalance of host DNA damage and repair due of DNA repair enzymes polymorphism can be relevant for gastric cancer (GC) development. Considering that, the purpose of the present study was to evaluate the association of polymorphisms in DNA repair system genes: *MLH1*-93 G>A, *APE1* 2197 T>G, *XRCC1* 28152 G>A, *MGMT* 533 A>G and *XRCC3* 18067 C>T associated to *H. pylori* genotype in clinical gastric diseases (active and inactive, gastritis, metaplasia and GC) from 504 patients. DNA repair genes were genotyped by RFLP-PCR and *H. pylori* by PCR. The *XRCC1* (A) polymorphic allele and *XRCC3* (CT) heterozygous genotype showed a decrease in the risk of gastric lesion progression in women, while a higher risk to gastric cancer was observed in *MLH1* (A) polymorphic allele. Haplotipic analysis demonstrated that the *XRCC1*, heterozygous genotype associated with some genotypes of *MGMT*, *MLH1* and *APE1* also showed protection from progression and gastric cancer development. We found that the presence of the *H. pylori* *cagE* gene is important in association to *XRCC1* polymorphism and the *MLH1* response varied according *vacA* alleles. Our results show the importance of host genus and *H. pylori* virulence factors in association to *XRCC1* and *MLH1* genotypes in the gastric carcinogenesis in north and northeast population of Brazil.

Keywords: Polymorphism, DNA repair enzymes, *Helicobacter pylori*, Gastric disease.

1. Introduction

Gastric cancer is the fifth most common type of cancer and the third in mortality in the world [1]. In Brazil, is one of the most common types of cancer reaching the third position among men and fifth in women [2]. This cancer is widely associated with the *Helicobacter pylori* infection whose inflammation and oxidative stress resulting from its infection can lead to DNA damage and oncogenic mutations. *H. pylori* genotype, as the presence *vacA s1m1* and *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) genes, stimulates the inflammatory process and explains part of the cancer development, mainly the intestinal gastric subtype. In this subtype, the carcinogenic process goes through a series of steps. Initial changes are characterized by a chronic inflammation in the mucosa, known as chronic gastritis, which can subsequently progress to pre-malignant lesions, as chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, and finally to dysplasia and cancer [1-4]. Since just a small proportion (1-3%) of these lesions will progress to cancer, others factors should be considered. Malaty *et al* (1994) was first to show the relevance of host genetic background in a study in which swedish homozygotic twins showed higher concordance for the sequential pathological changes preceding gastric cancer than dizygotic twins [5-7]. Thus, post-infection outcome may be influenced by polymorphisms in genes related to the maintenance of cell viability and DNA integrity as much as genes from the repair system beyond bacterial genotype.

The genome stability and integrity in face of endogenous and exogenous insults are maintained by different pathways of the DNA repair system [8]. Nevertheless, polymorphisms in enzymes of DNA repair system may lead to subtle changes in repair capacity [9]. In fact, the literature had demonstrated that different single-nucleotide polymorphisms (SNP) of DNA repair genes are associated with susceptibility to cancer, including gastric cancer [10-12], but studies on precancerous gastric lesions are still scarce. In addition, the results are inconsistent and they do not consider *H. pylori* genotype or, when they do, they are restricted to *cagA* gene [13; 14]. Thus, the complexity of the relation between bacteria and host in the pathogenesis of gastric disease seems little addressed.

From the background above, this study was conducted in order to evaluate the association of genetic polymorphisms in DNA repair system genes (*rs 1800734 MLH1-93 G>A*, *rs 1130409 APE1 2197 T>G*, *rs25487 XRCC1 28152 G>A*, *rs2308327 MGMT 533 A>G* and *rs861539 XRCC3 18067 C>T*) in precancerous lesions and gastric cancer, as well as the interaction with *H. pylori* strains virulent genes.

1. Materials and methods

2.1 Patients and specimens

This study involved 504 patients, including 354 non-cancer lesions (NCL) and 150 intestinal gastric cancers (GC). All patients were from public hospitals. The NCL were from patients who underwent upper gastrointestinal endoscopy in Hospital Haroldo Juaçaba/Cancer Institute of Ceará (ICC), Walter Cantídeo University Hospital (HUWC) and General Hospital of Fortaleza (HGF); due to several complaints such epigastric pain, nausea, epigastric burning sensation, early satiety and post prandial fullness. Patients were excluded from the study if they had previously undergone upper gastrointestinal surgery or had ulcer, duodenitis, esophagitis or gastric polyps. Few patients were included regardless of the use of proton pump inhibitors for *H. pylori*, since the use of these drugs does not interfere in the molecular diagnosis of *H. pylori* [15]. According to Sydney's System [16], 102 cases included in this study were classified as inactive chronic gastritis (ICG), 178 active chronic gastritis (ACG) and 74 intestinal metaplasia (IM). The Glasgow scale for assess the severity of dyspepsia could not be evaluated in this population.

The 150 gastric cancer cases (GC) were obtained from patients who underwent gastrectomy and were classified as intestinal subtype according to the Lauren's criteria [17]. The specimens were obtained from three public hospitals: General Hospital, Santa Casa de Misericórdia and Walter Cantídeo Hospital at the Federal University. GC specimens were also collected from two public hospitals located in Belém, Pará state, Brazil (72/150 cases): Hospital Ofir Loyola and João de Barros Barreto. Fragments of antrum and body were collected during endoscopy and fragments of tumor were collected during gastrectomy. The specimens were frozen at -80°C. This work was approved by the Ethics Committees of the overall hospitals involved and the written consent was obtained from all patients.

2.2 DNA extraction and SNPs analysis

For the endoscopy samples, the DNA was extracted from single frozen stomach fragments which contained more representative lesions and for the gastrectomies samples, it was extracted from frozen tumoral fragment which containing more than >80% of tumor cells. DNA extraction was performed by using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method adapted from Foster and Twell [18]. SNPs for DNA repair genes: rs25487 *XRCC1*, rs1130409 *APE1*, rs1800734 *MLH1*, rs2308327 *MGMT* and rs861539 *XRCC3* were determined by the PCR-RFLP according to described literature [19-23]. Cases with genotypes previously

known for each enzyme studied were used for quality control. Randomly samples were re-genotyped (15% of samples).

2.3 *H. pylori* detection and virulence genes

Helicobacter pylori infection was detected by amplification of the *urease C* gene [24]. The virulent genes, *vacA* alleles, *cagA*, *cagE* and *virB11*, were determined by PCR using specific primers set under conditions described by Domingo *et al* (1999), Atherton *et al* (1995) and Sozzi *et al* (2005) [25-27]. PCR mixtures, for amplification of *cagE* and *virB11* genes, were prepared in a volume of 20 μ L using 1x Green MasterMix® (Promega, Madison, USA), 0.3 μ M of each primer and 50 to 100 ng of the DNA sample. Amplicons from *ureaseC*, *vacA* alleles and *cagA* genes were visualized on 6% polyacrylamide electrophoretic gels and silver stained and *cagE* and *virB11* genes on 1% agarose gel containing ethidium bromide. *H. pylori* positive cases by histopathological examination were tested for *urease C* test and used as control. One positive case for each studied gene from previous studies was used as control in each PCR reaction. Random samples with weak bands and others randomly selected (more than 10% of cases) were reanalyzed to confirm the findings.

2.4 Statistical Analysis

The statistical analyses were conducted using the EPINFO 7.0. Genotype and allele frequencies between the histopathological groups were evaluated by the chi-square test (χ^2), Fisher's exact test, *odds ratios* and SNPSTAT (available in <https://www.snpstats.net/start.htm>). Correlations between SNPs, *H. pylori* genes and histopathological groups were analyzed using Spearman's correlation coefficient. Hardy-Weinberg equilibrium was also applied.

Classification and Regression Trees (CART; Salford Systems, San Diego, CA) [28] software was used for combination of DNA repair SNP and *H. pylori* genes analysis. CART decision tree is a non-parametric statistical method for multivariable data that can statistically demonstrate which factors are particularly important in a relationship in terms of explanatory power and variance. The tree is building a stepwise model producing results according with a combination of factors most strongly associated with gastric diseases outcome studied (gastric lesions). A p-value less or equal to 0.05 was used as criterion of significance for all analysis.

2. Results

Among the NCL, female patients were more frequent (62.4%) with median age of 54 years old (range 08-94 years), whereas in GC most cases involved male patients (70%) with median age of 65 years old (range 23-90 years). The genotypes frequencies distribution of the DNA repair enzymes in both groups (LNC and GC) were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium for all the polymorphisms studied.

3.1 Comparison of the DNA repair enzymes polymorphisms between gastric lesions

For the comparative analysis, ICG was considered the more benign lesion since it is characterized by having little neutrophilic infiltrate which produces reactive oxygen species and nitric oxide (NO) which are associated to DNA damage [29; 30]. Among polymorphisms studied only rs25487 *XRCC1* (G>A) polymorphism showed significant results (Table 1) in the general samples. The rs25487 *XRCC1* A allele was associated to benign lesion since the heterozygous genotype and the dominant model for the polymorphic allele were more frequent in ICG and AGC than IM and GC. Also for the SNPSTAT analysis in which rs25487 *XRCC1* AA genotype was statically more frequent in IM than GC ($p=0.031$, O.R. = -29.4, C.I. = -55.9 - -2.83).

Table 1. Genotype Frequencies, chi-square and *Odds ratio* analysis of *XRCC1* polymorphism in patients with inactive chronic gastritis (ICG), active chronic gastritis (ACG), intestinal metaplasia (IM) and gastric cancer (GC).

		<i>ICG reference</i>					
Genotype	ICG (n=101) n (%)	IM (n=74) n (%)	ICG vs IM <i>p</i>	<i>O.R.</i>	GC (n=132) n (%)	ICG vs GC <i>P</i>	<i>O.R.</i>
GG	37 (36.6)	37 (50)	(ref)		66 (50)	(ref)	
GA	53 (52.4)	23 (31)	0.01*	0.43 (0.21-0.89)	53 (40.1)	0.05	0.56 (0.32-0.97)
AA	11 (10.8)	14 (18,9)	0.6	1.27 (0.4-3.4)	13 (9.8)	0.3	0.66 (0.26-1.62)
GG+GA	90 (89.1)	60 (81)	0.1	0.52 (0.2-1.3)	119 (90.1)	0.96	1.11 (0.47-2.61)
AA+GA	64 (63.3)	37 (50)	0.07	0.57 (0.3-1.1)	66 (50)	0.05	0.57 (0.34-0.98)
		<i>ACG reference</i>					
Genotype	ACG (n=176) n (%)	IM (n=74) n (%)	ACG vs IM <i>p</i>	<i>O.R.</i>	GC (n=132) n (%)	ACG vs GC <i>p</i>	<i>O.R.</i>
GG	64 (36.3)	37 (50)	(ref)		66 (50)	(ref)	
GA	94 (53.4)	23 (31)	0.005*	0.42 (0.22-0.81)	53 (40.1)	0.01*	0.55 (0.33-0.91)
AA	18 (10.2)	14 (18,9)	0.4	1.34 (0.5-3.2)	13 (9.8)	0.3	0.70 (0.2-1.6)
GG+GA	158 (89.7)	60 (81)	0.06	0.48 (0.2-1.1)	119 (90.1)	0.9	1.0 (0.4-2.3)
AA+GA	112 (63.6)	37 (50)	0.06	0.57 (0.46-0.99)	66 (50)	0.01*	0.57 (0.35-0.93)

* $p \leq 0.05$. *O.R.* *Odds Ratio*

Considering the gender, in females a decreased in risk for IM was associated to rs25487 *XRCC1* (GA) genotype when compared to both gastritis, IGC ($p= 0.05$; O.R. = 0.40; C.I. = 0.17-0.94) and AGC (Table 2). The same protection was observed on rs861539 *XRCC3* (CT) heterozygous genotype but only when compared to AGC. Conversely, the rs1800734 *MLH1* (GA) heterozygous genotype was associated with increased risk to GC in 2.3 times. On the

other hand, in males only rs25487 *XRCC1* (A) polymorphic allele was statically more frequent in ACG than GC.

Considering the cut-off at 57 years old (the median age of the population studied), the patients carrying the rs25487 *XRCC1* (A) with age <57 years old showed a significant decreased risk to GC when compared to ICG ($p= 0.02$) and ACG ($p= 0.009$) and patients ≥ 57 older years had more frequently both, ICG ($p= 0.03$) and ACG ($p= 0.01$) than IM.

Due to the complex relationship between repair enzymes to maintain DNA integrity, analyses considering associations between them were proposed. From that, *XRCC1* (GA) + *MGMT* (AA) genotype was more frequent in ICG than IM ($p= 0.01$, $O.R.= 0.42$, $C.I.=0.19-0.93$) and GC ($p=0.009$, $O.R.=0.43$, $C.I.=0.22-0.86$). Also, having ACG as reference, the *XRCC1* heterozygous genotype showed decrease of risk associated with: *APE1* heterozygous genotypes (GA+TG) for IM ($p=0.007$, $O.R.=0.27$, $C.I.=0.09-0.80$) and GC ($p=0.004$, $O.R.=0.31$, $C.I.=0.13-0.75$), *APE1* homozygous wild-type genotype (GA+TT) for GC ($p=0.02$, $O.R.=0.38$, $C.I.=0.15-0.95$), and *MLH1* (GA+GG) homozygous wild-type genotype for IM ($p=0.01$, $O.R.=0.28$, $C.I.=0.09-0.84$).

Table 2. Genotype Frequencies of Repair Enzymes according gender in patients with active chronic gastritis (ACG), intestinal metaplasia (IM) and gastric cancer (GC).

		Female - ACG reference						
		ACG n=108 n (%)	IM n=44 n (%)	ACG vs IM p	$O.R.$	GC n=40 N (%)	GC vs ACG P	$O.R.$
<i>MLH1</i> -93 G/A	GG	57 (52.7)	17 (38.6)	(ref)		14 (35)	(ref)	
	GA	38 (35.1)	20 (45.4)	0.1	1.76(0.82-3.79)	22 (55)	0.04*	2.35(1.07-5.17)
	AA	13 (12)	7 (15.9)	0.2	1.80(0.62-5.24)	4 (10)	0.7	1.25(0.35-4.43)
	GG+GA	95 (87.9)	37 (84)	0.5	0.72(0.26-1.95)	36 (90)	1.0	1.23(0.37-4.02)
	AA+GA	51 (47.2)	27 (61.3)	0.1	1.77(0.86-3.62)	26 (65)	0.05	2.07(0.97-4.40)
<i>MGMT</i> 533 A/G		ACG n=106 n (%)	IM n=44 n (%)	ACG vs IM p		GC n=36 n (%)	ACG vs GC p	
	AA	87 (82)	40 (90.9)	(ref)		26(72.2)	(ref)	
	AG	17 (16)	3 (6.8)	0.1	0.38(0.10-1.38)	6(16.6)	0.7	1.18(0.42-3.30)
	GG	2 (1.8)	1 (2.2)	1.0	1.08(0.09-12.3)	4(11.1)	0.05	6.69(1.15-38.6)
	AA+AG	104 (98.1)	43 (97.7)	1.0	0.82(0.07-9.36)	32(88.8)	0.03 [†]	0.15(0.02-0.87)
GG+AG	19 (17.9)	4 (9)	0.2	0.45(0.14-1.43)	10(27.7)	0.2	1.76(0.72-4.25)	
<i>XRCC3</i> 18067 C/T		ACG n=108 n (%)	IM n=44 n (%)	ACG vs IM p		GC n=39 n (%)	ACG vs GC p	
	CC	54 (50)	29 (65.9)	(ref)		24 (61.5)	(ref)	
	CT	48 (44.4)	10 (22.7)	0.03*	0.38(0.17-0.87)	13 (33.3)	0.2	0.60(0.27-1.32)
	TT	6 (5.5)	5 (11.3)	0.5	1.55(0.43-5.52)	2 (5.1)	1.0	0.75(0.14-3.39)
	CC+CT	102 (94.4)	39 (88.6)	0.2	0.45(0.13-1.59)	37 (94.8)	1.0	1.08(0.21-5.63)
TT+CT	54 (50)	15 (34)	0.07	0.51(0.24-1.07)	15 (38.4)	0.2	0.62(0.29-1.31)	
<i>XRCC1</i> 28152 G/A		ACG n=106 n (%)	IM n=44 n (%)	ACG vs IM p	$O.R.$	GC n=38 n (%)	ACG vs GC p	$O.R.$
	GG	42 (39.6)	24 (54.5)	(ref)		19 (50)	(ref)	
	GA	52 (49)	13 (29.5)	0.05	0.43(0.19-0.96)	15 (39.4)	0.2	0.63(0.28-1.40)
	AA	12 (11.3)	7 (15.9)	0.9	1.0(0.35-2.94)	4 (10.5)	0.7	0.73(0.21-2.58)
	GG+GA	94 (88.6)	37 (84)	0.4	0.67(0.24-1.84)	34 (89.4)	1.0	1.08(0.32-3.59)

	AA+GA	64 (60.3)	20 (45.4)	0.09	0.54(0.26-1.11)	19 (50)	0.2	0.65(0.31-1.38)
<i>Male - ACG reference</i>								
		ACG n=70 n (%)	IM n=30 n (%)	ACG vs IM <i>p</i>	<i>O.R.</i>	GC n=94 n (%)	ACG vs GC <i>p</i>	<i>O.R.</i>
<i>XRCC1 28152 G/A</i>	GG	22 (31.4)	13(43.3)	(ref)		47(50)	(ref)	
	GA	42 (60)	10(33.3)	0.06	0.40(0.15-1.06)	38(40.4)	0.01*	0.42(0.21-0.82)
	AA	6 (8.5)	7 (23.3)	0.2	1.97(0.54-7.15)	9 (9.5)	0.5	0.70(0.22-2.21)
	GG+GA	64 (91.4)	23(76.6)	0.05	0.30(0.09-1.01)	85(90.4)	0.8	0.88(0.29-2.61)
	AA+GA	48 (68.5)	17(56.6)	0.2	0.59(0.24-1.44)	47(50)	0.02*	0.45(0.24-0.87)

* $p \leq 0.05$. *O.R.* Odds Ratios

3.2 *Helicobacter pylori* genes Analysis

All *H. pylori* *cagPAI* genes studied were significantly more frequent in ACG, IM and GC when compared to ICG (Table 3). Moreover, when the *H. pylori* genes were compared among the lesions, using ACG or IM as reference, *H. pylori* strain harbouring *cagE* and *virB11* genes were also associated to GC patients (*cagE* $p= 0.03$; *virb11* $p= 0.03$ and; *cagE* $p= 0.04$; *virb11* $p= 0.02$, respectively). No differences were found for the *cagA* gene.

In order to verify the relation between *H. pylori* genes and host genotype that could be associated with gastric disease outcome, the CART analysis was performed. This method uses a series of dichotomous splits; according with a combination of factors most strongly associated with gastric diseases outcome. Each tree branch ends in a terminal node defined by the presence or absence of the *H. pylori* genes or host repair enzyme genotype. When all the factors were considered (*H. pylori* genes and host genotype), *cagE* rises as the most important factor, which associated to rs25487 *XRCC1* (GG) genotype has strong possibility for intestinal gastric cancer outcome (Fig. 1A). For rs1800734 *MLH1* polymorphism, homozygous polymorphic or heterozygous genotypes were related to gastritis outcome in absence of *cagE* and *cagA*.

As results of chi-square analysis, the *H. pylori* stream *cagE*(+) *virB11*(+) were associated in one second CART analysis. In this tree (Fig. 1B), the inactive and active gastritis were differentiated by rs1800734 *MLH1* genotypes, in which the absence of *cagE* and *virb11* genes, the terminal branch for patients carrying rs1800734 *MLH1* homozygous wild-type (GG) was ICG, while for rs1800734 *MLH1* (AA) homozygous polymorphic carries the terminal branch was ACG depending on *vacA s2m2* allele. The CART analysis having the all *cagPAI* genes negatives (Fig. 1C) corroborated the previous tree where rs1800734 *MLH1* homozygous wild-type and polymorphic genotypes for gastritis outcome were associated with less *H. pylori* virulent strain, but in this tree included *virB11*. In addition, correlation using Spearman's analysis, also showed positive correlation between rs1800734 *MLH1* polymorphic genotype (AA) with *vacA s2m2* allele among the ACG patients ($r = 324$, $p = 0.008$) while *vacA s1m2* were associated to GC ($r = 204$, $p = 0.022$), corroborating the hypothesis of a relationship of rs1800734 *MLH1* and *vacA* alleles.

Table 3. Genes Frequencies of *Helicobacter pylori* in patients with inactive chronic gastritis (ICG), active chronic gastritis (ACG), intestinal metaplasia (IM) and gastric cancer (GC).

<i>H. pylori</i> genes	ICG n =102 n (%)	ACG n =178 n (%)	ICG vs ACG <i>p</i>	IM n =74 n (%)	ICG vs IM <i>p</i>	ACG vs IM <i>p</i>	GC n=150 n (%)	ICG vs CG <i>p</i>	ACG vs GC <i>p</i>	IM vs GC <i>p</i>
Positive samples	70 (68.6)	161 (90.4)		57 (77)			136 (90.6)			
<i>s2m2</i>	8 (11.4)	13 (8)	(categ ref)	1 (1.7)	(categ ref)		15 (11)	(categ ref)		
<i>s2m1</i>	2 (2.8)	9 (5.5)	0.4	4 (7)	0.08	0.1	5 (3.6)	1.0	0.2	0.04
<i>s1m2</i>	9 (12.8)	18 (11.1)	0.7	5 (8.7)	0.3	0.3	26 (19.1)	0.4	0.6	0.6
<i>s1m1</i>	7 (10)	26 (16.1)	0.1	9 (15.7)	0.04*	0.2	84 (61.7)	0.002*	0.01*	1.0
<i>cagA</i> +	27(38.57)	102 (63.35)	0.0004*	33 (57.8)	0.03*	0.4	86 (63.3)	0.0007*	0.9	0.4
<i>cagE</i> +	12(17.14)	91 (56.5)	0.0000000*	32 (56.1)	0.000004*	0.9	98 (72)	0.0000*	0.005*	0.03*
<i>virB11</i> +	18(25.71)	89 (55.2)	0.00003*	28 (49.1)	0.006*	0.4	92 (67.6)	0.0000*	0.02*	0.01
<i>cagE</i> + <i>virB11</i> +	11 (15.7)	74 (45.9)	0.03 [†]	22 (37.2)	0.1 [†]	0.5 [†]	84 (61.7)	0.002 [†]	0.09 [†]	0.09 [†]
<i>cagE</i> + <i>cagA</i> +	10 (14.2)	77 (47.8)	0.0001 [‡]	23 (38.9)	0.011 [‡]	0.5 [‡]	62 (45.5)	0.0009 [‡]	0.5 [‡]	0.7 [‡]
<i>cagA</i> + <i>virB11</i> +	14 (20)	75 (46.5)	0.05 [‡]	20 (35)	0.67 [‡]	0.23 [‡]	62 (45.5)	0.005 [‡]	0.2 [‡]	0.03 [‡]

(categ ref) categorical reference. * $p \leq 0.05$. [†] vs *cagE-virB11*+; [‡] vs *cagE-cagA*+; [‡] vs *cagA+virB11*-

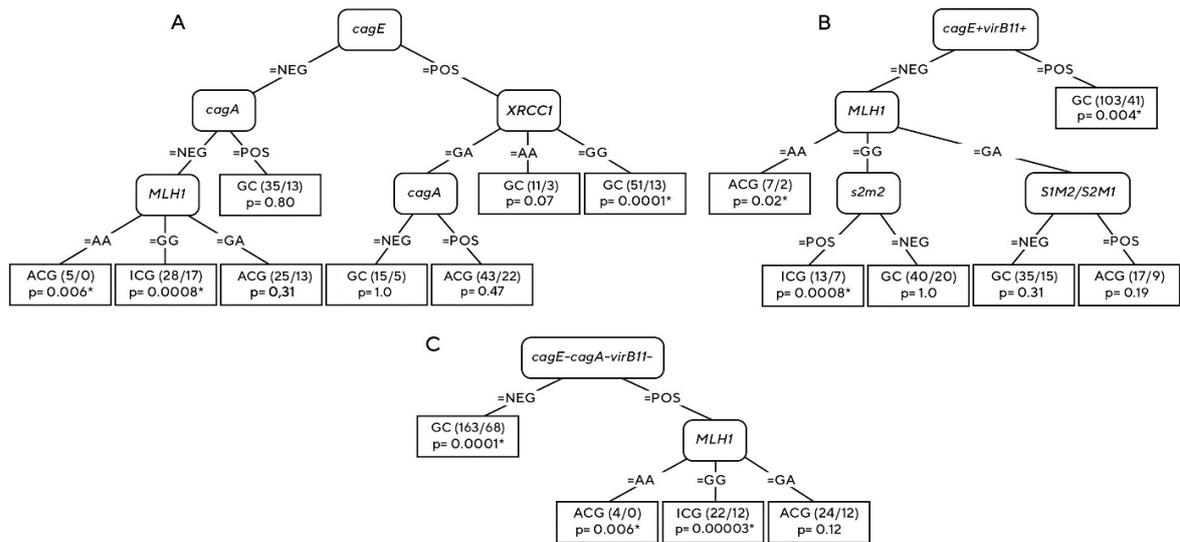


Fig. 1. The CART classification trees topology is showed considering the repair enzymes genotype and *H. pylori* *cagA*, *cagE*, *virB11* and *vacA* alleles. Each terminal node is define by presence or absence of the predictive factors and each terminal node is uniquely defined by gastric lesion outcome. The tree is hierarchical in nature. The numbers in parentheses in the boxes indicate the number of cases evaluated/case numbers with another outcome. * $\leq p=0.05$. A - All repair enzymes genotype and *H. pylori* *cagA*, *cagE*, *virB11* and *vacA* alleles were considered; B - *H. pylori* stream *cagE*+ *virB11*+ was considered as one factor; C - *H. pylori* stream without *cagPAI* genes was considered as one factor.

3. Discussion

Our study is the first report that focuses DNA repair enzymes polymorphisms in gastric diseases including the sequential carcinogenic pathway considering virulent-genes of *H. pylori* in patients from North and Northeast Brazilian region. In this study, among the repair enzymes studied (rs25487 *XRCC1* G28152A, rs1130409 *APE1* T2197G, rs1800734 *MLH1*-93 G>A, rs2308327 *MGMT* A533G and rs861539 *XRCC3* C18067T) stands up the rs25487 *XRCC1* (G>A), also known as Arg399Gln and rs1800734 *MLH1*-93 G>A polymorphisms which showed different aspects for gastric outcome when of *H. pylori* genes are considered in association with the repair enzymes.

Considering the sequential lesions of the carcinogenic pathway, a protection was found for rs25487 *XRCC1* (G>A) polymorphic allelic for gastric cancer development. Interesting, Huang *et al* (2005) [31] reported an association of the *XRCC1* (GG) wild-type homozygous genotype with gastric cancer risk in smokers and Lee *et al* (2002) [32] showed that haplotype combination of wild-types *XRCC1* 194Arg, 280Arg, and 399Arg in the Korean population was associated to gastric cancer risk, mainly antral. Still, Da Costa *et al* (2015) [33] reported an associated between *XRCC1* (GA) genotype to decreased risk of non-cardia tumor. Controversially, various studies have demonstrated that *XRCC1* (A) polymorphic allele

enhance the risk of gastric cancer [10; 34; 35], especially when associated with others polymorphisms [36], and others studies didn't found association between *XRCC1* (G>A) polymorphisms and gastric cancer or other gastric lesion [5; 33; 37; 38].

4.1 Repair enzymes polymorphisms and gender

Due to the higher incidence of men with gastric intestinal cancer [15] and the recently reported that the level of sister chromatid exchanges in women was higher than men [39] the influence of the polymorphisms studied were also evaluated according to gender. From these analyses, the decreased risk of GC observed in patients carrying rs25487 *XRCC1* (A) polymorphic allele in the general samples, was observed in both gender but more evident in males since in women the protection was for IM and in men for GC. In Huang et al study [31] with polish patients taking in account tobacco use, fruit and vegetable intake, the polymorphic allele was associated to the decrease of the risk for gastric cancer for man (mostly smoking); however, the risk for non smokers was associated to *XRCC1* GG genotype which, in a way, corroborates with decrease of GC risk for the rs25487 *XRCC1* polymorphic allele independent of tobacco use. In addition, in the present study, women carrying rs861539 *XRCC3* (CT) genotype also showed a decreased risk to IM, and conversely, rs1800734 *MLH1* (GA) genotype were associated to risk to GC. Contrasting with ours and Huang et al [31] results, a study realized in southeastern Brazilian population [36], which has different ethnic background from North and Northeast population, found that men carrying the rs25487 *XRCC1* (A) and rs861539 *XRCC3* (T) polymorphic alleles were associated with GC risk but only for smokers and alcohol drinkers. In the present study there are no data for smoking in GC cases from Pará state and for that this factor have not been evaluated. However from the above discussed, these findings demonstrate the influence of gender on rs25487 *XRCC1* (G>A) and the others polymorphisms. Also, differences found between the studies may be related to low penetrance of SNPs that depend on of several interactions, genetic composition and behavior of the population studied.

Since gastric cancer is preceded by prolonged precancerous lesions and is considered a disease of the elderly population [40], both age groups (cut-off the median age of 57 years old) showed a decreased risk to IM and GC for patients carrying rs25487 *XRCC1* (A) polymorphic allele. This result indicated that this allele offers a reduction of the risk of evolution of the gastric disease independent of the age group, corroborating with Tahara *et al* (2011) study [41].

4.2 Interaction of the repair enzymes polymorphisms

When genotypes interactions were analyzed, only with rs25487 *XRCC1* (GA) genotype significant results were obtained for decrease of the risk for IM and GC indicating the complex interrelation between the functions of the repair enzymes. *XRCC1* plays a major role in the BER pathway and it is also involved in other DNA repair mechanisms, such as single-strand break repair (SSB) and non-homologous end joining in double-strand break DNA repair [42]. In this study, *XRCC1* (GA) heterozygous genotypes were associated to both rs1130409 *APE1* homozygous wild-type (TT) and heterozygous genotypes (TG) that also belong to BER repair system. *XRCC1* acts as scaffold protein involved in both early and late steps of the BER repair system. This enzyme stabilizes 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) on an AP site present in double-stranded DNA until APE1 is able to bind to the DNA. APE1 and *XRCC1* complex recruit Pol1 β followed by PARP-1 and LIGIII, completing the repair process. In particular the *XRCC-1* Arg399Gln occurs in the poly(ADP-ribose) polymerase-binding domain and may alter the efficiency of the repair process [43]. APE1 is a multifunctional protein and beyond be part of the BER pathway; it is involved in the reductive activation of many transcription factors. Although the polymorphism Asp148Glu did not alter APE1 AP site incision activity in vitro, the presence of the polymorphic allele has been showed to decrease the expression of some repair enzymes included *XRCC1* [44, 45]. The association between *XRCC1* (GA) heterozygous genotypes with the presence of the wild-type genotype may insure the transcription level of *XRCC1*. It is interesting to note that in experimental study from Hu *et al* (2001), individuals carrying *XRCC1* (A) and *APE1* (G) polymorphic alleles present prolonged cell cycle G2 delay [20], which may represent an opportunity for DNA repair or activation intrinsic pathways apoptosis, protecting the cell.

The *XRCC1* (GA) heterozygous genotype was also associated to rs1800734 *MLH1* (GG) wild-type. The *MLH1* is a protein of the MMR pathway responsible for repairing errors associated with cell replication with removal and correction of mistaken bases [46]. The interrelation between the *XRCC1* (GA) heterozygous genotype and *MLH1* (GG) wild-type genotype shows the interplay between the DNA repair systems, probably due of different damages in which the gastric tissue is exposed.

4.3 *H. pylori* genes and its relationship between repair system enzymes SNP

In the studied population, the *H. pylori* incidence was higher than a recent meta-analysis performed by Hooi *et al* (2017) [47], but agree with Coelho *et al* (2018) [15], where *H. pylori* prevalence can reach rate of 70%–90% amongst adults depending on the sanitary conditions.

In this study, other genes beyond *cagA*, *cagE* and *virB11* stand up. The presence of others *H. pylori* genes involved in more severe lesions was pointed out by some authors based on the finding that *cagA* is not always present in these lesions [33; 48]. In addition, Khodaii *et al* (2011) demonstrated that *H. pylori* infection was associated with increased oxidative stress, but not *cagA* [49]. As the inflammatory process is hypothesized to be the major carcinogenic mechanism of *H. pylori*, others genes as *cagE* and *virB11* arise, along with *cagA*, as pathogenicity markers.

To better understand the relation between genotype bacteria and polymorphisms repair genes we performed CART analysis. This method uses binary recursive partitioning whereby observations are hierarchically bifurcated into 'nodes', based on parameters considered the best factors predicting outcome. The decision tree generated showed that *cagE* gene was the best parameter to define the branches in determination of the patient's outcome as the previous analysis, being present in all tested trees.

CagE is a protein located in inner membrane of *H. pylori*, of *cag* type 4 secretion system (cag-T4SS). It exhibits ATPase activity and has multiples interacting partners been involved in the localization and stabilization of cag-T4SS pilus. CagE, is therefore necessary for the efficient translocation of the effector oncogenic molecule, the *cagA* protein, which recently was associated with suppression of apoptosis [50]. Thus, the efficient translocation, mediated mainly by *cagE* protein, leads to an imbalance between the anti-apoptotic and pro-apoptotic mechanisms. Besides that, the presence of *cagE* stimulates IL-8 secretion in epithelial gastric cells [51]. Thus, the sustained inflammation increases the EROS generation resulting in high genomic instability, which can not be corrected by rs25487 *XRCC1* wild-type allele. In addition, when *cagE* and *virB11* were combined as one factor, the rs1800734 *MLH1* genotypes were determinant for gastritis outcome in the absence of both *H. pylori* genes, but the gastritis classification was dependent on the *vacA* alleles. Furthermore, the rs1800734 *MLH1* (AA) polymorphic allele had a positive correlation with gastric cancer in individuals infected with moderately virulent strains.

In conclusion, our data suggests that the polymorphic allele of rs25487 *XRCC1* and rs1800734 *MLH1* are potential predictive markers of gastric disease severity in dyspeptic patients in northern and northeastern of Brazil. Taking together the results of this study point out that the risk related to the repair enzymes polymorphism can be modulated by the bacterial genotype. Also, shows an interplay between host and bacterial genotype, where the gender must

be considered. This study is a small step for screening patients who really should be treated for *H pylori* infection.

Funding

This work was supported by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) grant number: 13192399-4.

Acknowledgements

We are grateful to Hospitals participate thus study.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Bray F.; Ferlay J., Soerjomataram, I *et al.* (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca Cancer J Clin.*, 68, 394-424.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Available online: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp> Acesso em: 25 mar 2019.
3. Zhang X-Y, Zhang P-Y, Aboul-Soud MAM. From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori* (Review). (2017). *Oncology Letters.*, **13**:543-548.
4. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. (1992) *Cancer Res.*, **52**: 6735-6740.
5. Tahara T, Shibata T, Nakamura M. *et al.* (2011) Association between Genetic Polymorphisms Related to DNA Repair or Xenobiotic Pathways and Gastric Premalignant Conditions. *Anticancer Research.*, **31**:1459-1466.
6. Mommersteega MC, Yub J, Peppelenboscha MP, Fuhler GM. (2018). Genetic host factors in *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis: Emerging new paradigms. *BBA – Reviews in Cancer.*, **1**: 42-52.

7. Malaty H.M., Engstrand L., Pedersen N.L., Graham D.Y. Helicobacter pylori infection: Genetic and environmental influences. A study of twins. (1994) *Annals of Internal Medicine.*, **120** (12): 982-986.
8. Berra C. M., Menck C. F. M., Mascio P. D. Oxidative stress, lesions in the genome and signaling processes in cell cycle control. (2006) *Quim. Nova.*, **29**: 1340-1344.
9. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J., Lindahl T. Human DNA Repair Genes. (2001). *Science.*, **16**(5507):1284-1291.
10. Putthanachote N., Promthet S., Hurst C., *et al.* The XRCC 1 DNA repair gene modifies the environmental risk of stomach cancer: a hospital-based matched case-control study. (2017). *BMC Cancer.*, **17**:680-86.
11. Li S., Zheng Y., Tian T., *et al.* Pooling-analysis on hMLH1 polymorphisms and cancer risk: evidence based on 31,484 cancer cases and 45,494 cancer-free controls (2017). *Oncotarget*, **8**(54): 93063-93078.
12. He Y., XU X., Chen H., *et al.* The hMLH1 promoter polymorphisms and cancer susceptibility in Asian population: A meta-analysis (2013). *Gene*. **523**:199-204.
13. Zhao L., Long X-D., Yao J-G. Genetic polymorphism of XRCC3 codon 241 and *Helicobacter pylori* infection-related gastric antrum adenocarcinoma in Guangxi Population, China: A hospital-based case-control study. (2011). *Cancer Epidemiology.*, **35**: 3564-568.
14. Ramis I.B., Vianna J.S., Gonçalves C.V. Polymorphisms of the *IL-6*, *IL-8* and *IL-10* genes and the risk of gastric pathology in patients infected with *Helicobacter pylori*. (2017) *J Microbiology, Immunology and Infection.*, **50**: 153-159.
15. Coelho L.G.V., Marinho J.R., Genta R. IVth Brazilian Consensus Conference on Helicobacter pylori infection (2018). *Arq Gastroenterol.*, **55**(20): 97-212.
16. Gastroenterologists in Sydney-histology and Helicobacter. (1990). *Lancet.*, **2**:779-78.
17. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. (1965). *Acta Pathol Microbiol Scand.*, **64**:31-49.
18. Foster G.D., Tweel D. Plant Gene Isolation. Principles and Pratics. Edited by Gary D. Foster & David Twell. John Wiley & Sons Ltd., England 1996, p 426.
19. Yin M., Tan D., Wei Q. Genetic variants of the XRCC1 gene and susceptibility to esophageal cancer: a meta-analysis. (2009). *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **2**:26-35.

20. Hu J.J., Smith T.R., Miller M.S., *et al.* Amino Acid substitutions variants of APE and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. (2001). *Carcinogenesis.*, **22**(6): 917-922.
21. Chen H., Kunnimalaiyaan M., Van Gompel J.J. Medullary thyroid cancer: the functions of raf-1 and human achaete-scute homologue-1. (2005). *Thyroid.*, **15**(6):511-21.
22. Crosbie J., Perusse D., Barr C.L., Schachar R.J. Validating Psychiatric Endophenotypes: Inhibitory control and attention deficit hyperactivity disorder. (2008). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.*, **32**, 40-55.
23. Krupa R., Synowiec E., Pawlowska E., Morawiec Z., Sobczuk A., Zadrozny M., Wozniak K., Blasiak J. Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. (2009). *Exp Mol Pathol.* **87**(1):32-5.
24. Lage A.P., Godfoir E., Fauconnier A., Burette A., Butzler J.P., Bollen A., Gupczynski Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. (1995) . *J. Clin. Microbiol.*, **33**:2752-2756.
25. Domingo D., Alárcon T., Prieto N., Sánchez I., López-Brea M. cagA and vacA status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. (1999). *J Clin Microbiol.*, 37(6):2113-4.
26. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M. Jr., Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. (1995). *J Biol Chem.*, 28(30):17771-17777.
27. Sozzi M., Luisa M., Tomasini L., Vindigni C., *et al.* Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. (2005). *J Lab Clin Med.*, **146**(5): 262-270.
28. Zimmerman R.K., Balasubramani GK., Nowalk M.P., *et al.* Classification and Regression Tree (CART) analysis to predict influenza in primary care patients. (2016). *BMC Infectious Diseases.*, **16**:503-514.
29. Toyoshima O., Tanikawa C., Yamamoto R., *et al.* Decrease in PSCA expression caused by *Helicobacter pylori* infection may promote progression to severe gastritis. (2018). *Oncotarget.*, **9**(3):3936-3945.
30. Bhattacharyya A., *et al.* Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. (2014). *Physiological reviews.*, **94**(2):329-354.
31. Huang W-Y., Chow W-H., Rothman N., *et al.* Selected DNA repair polymorphisms and gastric cancer in Poland. (2005). *Carcinogenesis.*, 26(8):1354-1359.

32. Lee S-G., Kimb B., Choic J., *et al.* Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. (2002). *Cancer Letters.*, **187**:53-60.
33. Da Costa D.M., Pereira E.S., Silva-Fernandes I.J.L., *et al.* Characterization of Gastric Cardia Tumors: Differences in Helicobacter pylori Strains and Genetic Polymorphisms. (2015). *Dig Dis Sci.*, **60**:2712–2717.
34. Engin A.B., Karahalil B., Karakaya A.E., Engin A. Association between xrcc1 arg399gln and p53 arg72pro polymorphisms and the risk of gastric and colorectal cancer in Turkish Population. (2011). *Arh Hig Rada Toksikol.*, **62**:207-214.
35. Halim N.H.A., Chong E.T.J., Goh L.P.W. Variant Alleles in XRCC1 Arg194Trp and Arg399Gln Polymorphisms Increase Risk of Gastrointestinal Cancer in Sabah, North Borneo. (2016). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, **17**: 1925-1931.
36. Duarte M.C., Colombo J., Rossit A.R.B., *et al.* Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric câncer. (2005). *World J Gastroenterol.*, **11**(42):6593-6600.
37. Palli D., Polidoro S., D’Errico M., *et al.* Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric câncer. (2010). *Mutagenesis.*, **25**(6):569-575.
38. Nissar B., Kadla A.S., Khan N.S., *et al.* DNA Repair Gene XRCC1 and XPD Polymorphisms and Gastric Cancer Risk: A Case-Control Study Outcome from Kashmir, India. (2018). *Analytical Cellular Pathology.*, **1**:1-8.
39. Santovito A., Gendusa C., Cervella P. Evaluation of baseline frequency of sister chromatid exchanges in an italian population according to age, sex, smoking habits, and gene polymorphisms. (2017). *American Journal of Human Biology.*, **29**(6).
40. Correa P., Piazuolo M.B. The gastric precancerous cascad. (2012). *J Dig Dis.*, **13**(1): 2-9.
41. Tahara T., Shibata T., Nakamura M., *et al.* Polymorphisms of DNA Repair and Xenobiotic Genes Predispose to CpG Island Methylation in Non-Neoplastic Gastric Mucosa. (2011). *Helicobacter.*, **16**:99–106.
42. London R.E. The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. (2015). *DNA Repair (Amst).*, **30**: 90-103.
43. Vodicka P., Stetina R., Palokova V., *et al.* Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. (2007). *Carcinogenesis.* **28**(3):657-664.
44. Santos J.C., Funck A., Silva-Fernandes I.J.L., Rabenhorst S.H.B., Martinez C.A.R., Ribeiro M.L.Effect of APE1 T2197G (Asp148Glu) polymorphism on APE1, XRCC1, PARP1

- and OGG1 expression in patients with colorectal cancer.(2014). *Int. J. Mol. Sci.* **15**(10):17333-17343.
45. Thakur S., Sarkar B., Cholia R.P. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. (2014). *Exp Mol Med.*, **18**;46:e106.
46. Li S., Zheng Y., Tian T., *et al.* Pooling-analysis on hMLH1 polymorphisms and cancer risk: evidence based on 31,484 cancer cases and 45,494 cancer-free controls. (2017). *Oncotarget.*; **8**(54): 93063-93078.
47. Hooi J.K.Y., Lai W.Y., Ng W.K. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. (2017). *Gastroenterology.*, **153**(2):420-429.
48. Miftahussurur M., Yamaoka Y., Graham D.Y. Helicobacter pylori as an oncogenic pathogen, revisited. (2017). *Expert Reviews in Molecular Medicine.*, **21**:19:e4.
49. Khodaii Z., Vakili H., Ghaderian S.M., Najar R.A., Panah A.S. Association of Helicobacter pylori infection with acute myocardial infarction. (2011). *Coron Artery Dis.*, **22**(1):6-11.
50. Vallejo-Flores G., Torres J., Sandoval-Montes C. Helicobacter pylori CagA Suppresses Apoptosis through Activation of AKT in a Nontransformed Epithelial Cell Model of Glandular Acini Formation. (2015). *BioMed Research International*. ID 761501, 12 pages.
51. Shariq M., Kumar N., Kumari R., Kumar A., Subbarao N., Mukhopadhyay G. Biochemical Analysis of cagE: a VirB4 Homologue of Helicobacter pylori cag-T4SS.(2015). *PlosOne*. e0142606.doi:10.1371

7.3 Resultados

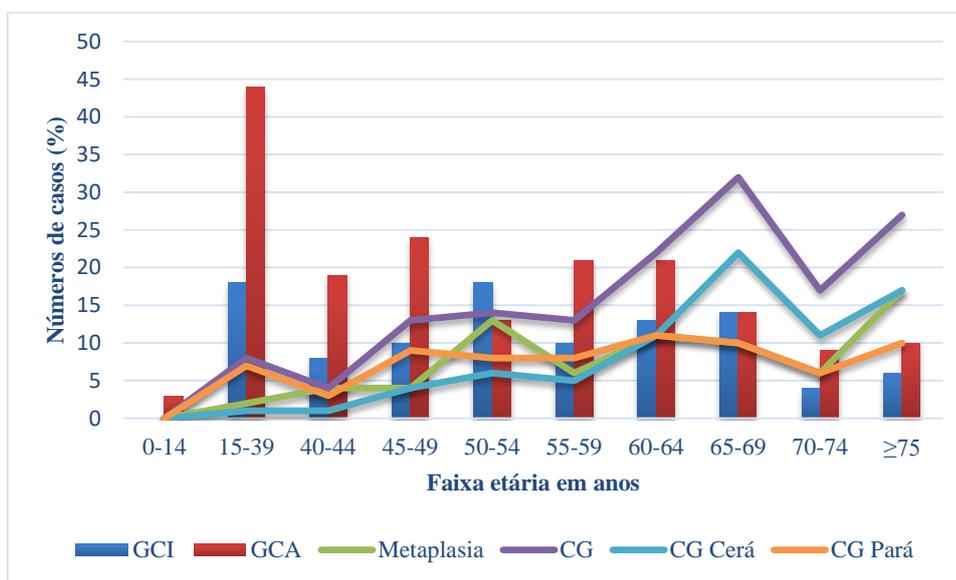
Dados não contemplados nos artigos são apresentados a seguir.

7.3.1 Caracterização da amostra

Do total de 354 amostras de lesões gástricas não-malignas analisadas, 102 foram classificadas como Gastrite Crônica Inativa (GCI), 178 como Gastrite Crônica Ativa (GCA) e 74 como Metaplasia Intestinal (MI), de acordo com a Classificação de Sydney. A população foi composta, ainda, por 150 amostras de câncer gástrico do subtipo intestinal, onde 78 foram provenientes de pacientes atendidos no Estado do Ceará e 72 no Estado do Pará.

A mediana de idade dos pacientes com GCI foi de 54 anos, variando de 20 a 87 anos, na GCA a mediana dos pacientes foi de 49 anos, com variação de 08 a 89 anos, e na MI a mediana foi de 64 anos, variando de 20 a 94 anos. Para os pacientes com câncer gástrico a mediana foi de 66 anos com variação de 23 a 90 anos para a população do Ceará e para a população do Pará a mediana da idade foi de 60 anos, variando de 26 a 88 anos. A distribuição das lesões gástricas não-malignas e câncer de acordo com a faixa etária padrão da população mundial, padronizada pela GLOBOCAN, está representada no gráfico 1.

Gráfico 1. Distribuição das lesões gástricas não-câncer e câncer de acordo com a faixa etária.



GCI: gastrite crônica inativa, GCA: gastrite crônica ativa; MI: metaplasia intestinal, CG: câncer gástrico.

Considerando a mediana da idade de todos os pacientes incluídos no estudo, os indivíduos com idade superior ou igual a 57 anos foram mais frequentes na metaplasia intestinal e câncer gástrico, diferindo, significativamente, dos pacientes com gastrite crônica ativa ou inativa (tabela 3).

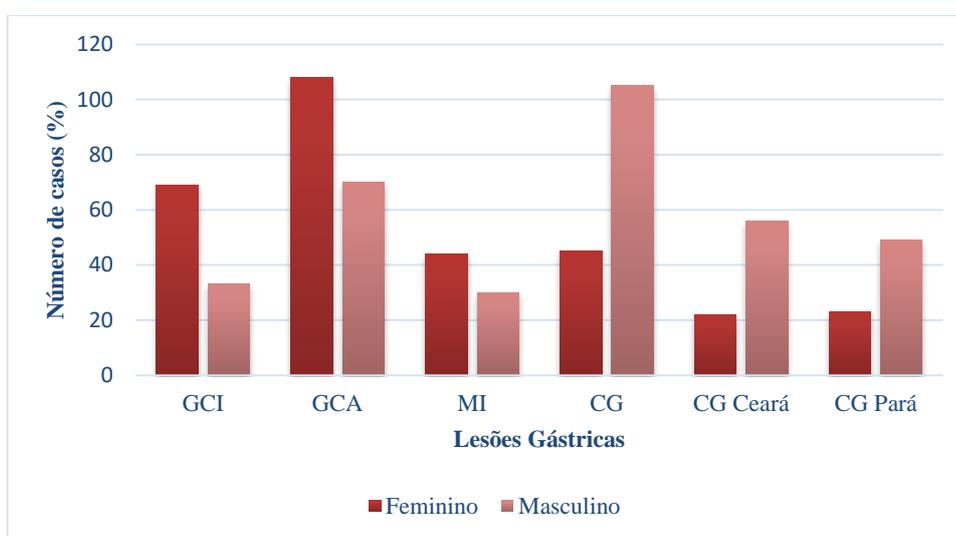
Tabela 3. Frequência das lesões gástricas de acordo com o sexo e a idade.

	Histopatológico										p	
	Total	Gastrite crônica inativa (controle)		Gastrite crônica ativa		Metaplasia intestinal		Câncer gástrico				
Idade												
Até 57	285	56,8%	68	66,7%	129	72,9%	30	41,1%	58	38,7%	<0,00 <i>I</i>	
Mais de 57	217	43,2%	34	33,3%	48	27,1%	43	58,9%	92	61,3%		
Sexo												
Feminino	266	52,8%	70	68,0%	107	60,5%	44	59,5%	45	30,0%	<0,00 <i>I</i>	
Masculino	238	47,2%	33	32,0%	70	39,5%	30	40,5%	105	70,0%		
Total	504	100,0%	103	100,0%	177	100,0%	74	100,0%	150	100,0%	-	

*p<0,05, teste exato qui-quadrado de Pearson.

Na avaliação dos grupos de acordo com o sexo, foi observado que nas lesões não-malignas há um predomínio do sexo feminino e o contrário é observado para o câncer gástrico (gráfico 2 e tabela 3).

Gráfico 2. Distribuição das lesões gástricas não-câncer e câncer de acordo com o gênero.



GCI: gastrite crônica inativa, GCA: gastrite crônica ativa; MI: metaplasia intestinal, CG: câncer gástrico.

7.3.2 Análise comparativa entre as lesões não-malignas e o Câncer Gástrico do Ceará e do Pará

Na população geral do estudo, os cinco genes do sistema de reparo avaliados estavam em equilíbrio de Hard-Weinberg, uma vez que o valor de χ^2 calculado para cada gene foi menor

que o valor tabulado, demonstrando que as frequências gênicas e as proporções genotípicas da população estão em equilíbrio.

O alelo polimórfico de *XRCCI* (GA $p= 0,01$ e GA+AA $p= 0,03$) foi estatisticamente relacionado a GCA quando comparado ao CG no Ceará, enquanto apenas uma tendência foi encontrada quando comparada a GCI (GA $p=0,03\pm$ e GA+AA $p= 0,05$) (tabela 4).

Para o polimorfismo de *MLH1*, foi observado que o genótipo heterozigoto (GA) foi significativamente maior no CG no Pará ($p=0,03$) comparado a GCA, associando-se ao risco para o desenvolvimento do câncer nesta população (tabela 4). Com efeito, uma correlação positiva foi observada entre o genótipo heterozigoto de *MLH1* (GA) e o CG no Pará ($r = 0,100$, $p= 0,02$).

Não houve diferença significativa entre metaplasia intestinal e o câncer gástrico quanto aos genes do reparo avaliados.

7.3.3 Análise comparativa entre os Cânceres Gástricos do Ceará e do Pará

Com o objetivo de verificar se há diferença na frequência dos polimorfismos avaliados neste estudo nas populações do Ceará e do Pará, realizamos uma análise comparativa entre as duas populações (tabela 5).

Apesar das diferenças encontradas para os polimorfismos de *XRCCI* e *MLH1* nas comparações com as lesões não-câncer (tabela 4), não foram observadas diferenças significativas entre estas populações. No entanto, verificamos uma maior tendência do alelo selvagem de *APE1* (TT+TG $p= 0,05$, O.R. não acurado) e o genótipo heterozigoto de *MGMT* (AG $p=0,02$, O.R. não acurado) na população do Ceará e uma frequência sutilmente maior foi observada para o alelo polimórfico de *MLH1* (GA $p= 0,07$ e GA+AA $p= 0,07$, O.R. não acurado) na população do Pará, contudo, sem significância.

Tabela 4 – Análise comparativa da frequência dos polimorfismos genéticos de enzimas do reparo do DNA nas gastrites crônica inativa e ativa e cânceres gástrico intestinal do Ceará e do Pará.

<i>MLH1 G/A</i>	GCI N= 102(%)	CG Ceará N= 67(%)	GCI x CG Ceará	O.R.	CG Pará N= 68(%)	GCI x CG Pará	O.R.	GCA N= 178(%)	GCA x CG Ceará	O.R.	GCA x CG Pará	O.R.
GG	49 (48)	36 (53,7)	-		26 (38,2)	-		91 (51,1)	-		-	
GA	41 (40,1)	28 (41,7)	0,8	0,9 (0,4-1,8)	38 (55,8)	0,09	1,7 (0,8-3,5)	70 (39,3)	0,9	1,0 (0,5-1,8)	0,03*	1,9 (1,01-3,57)
AA	12 (11,7)	3 (4,4)	0,1	0,3 (0,0-1,4)	4 (5,8)	0,4	0,6 (0,1-2,4)	17 (9,5)	0,2	0,4 (0,1-1,7)	1,0	0,8 (0,2-2,9)
GG+GA vs AA	90 (88,2)	64 (95,5)	0,1	2,8 (0,7-13,2)	64 (94,1)	0,1	2,1 (0,6-8,2)	161 (90,4)	0,1	2,2(0,5-10,0)	0,3	1,6(0,5-6,1)
AA+GA	53 (51,9)	31 (46,2)	0,4	0,8 (0,4-1,5)	42 (61,7)	0,2	1,4 (0,7-2,9)	87 (48,4)	0,7	0,9 (0,4-1,6)	0,07	1,6 (0,9-3,1)
AA+GA vs GG+GA			0,4	0,8 (0,4-1,4)		0,6	1,1 (0,6-1,9)		0,6	0,9 (0,5-1,5)	0,4	1,2 (0,7-1,9)
<i>MGMT A/G</i>	GCI N=101 (%)	CG Ceará N= 67(%)	GCI x CG Ceará	O.R.	CG Pará N= 56(%)	GCI x CG Pará	O.R.	GCA N =176(%)	GCA x CG Ceará	O.R.	GCA x CG Pará	O.R.
AA	80 (79,2)	52 (77,6)	-		50 (89,2)	-		143 (81,2)	-		-	
AG	19(18,8)	11 (16,4)	0,7	0,8 (0,3-2,1)	2 (3,5)	0,009	0,17 (0,03-0,80)‡	30 (17)	0,9	1,0 (0,4-2,2)	0,01	0,19 (0,03-0,86)‡
GG	2 (1,9)	4(5,9)	0,2	3,0 (0,4-25,2)	4 (7,1)	0,2	3,2 (0,4-26,2)	3 (1,7)	0,09	3,6(0,6-21,4)	0,08	3,8 (0,6-22,3)
AA+AG vs GG	99 (98)	63(94)	0,2	0,3(0,0-2,1)	52 (92,8)	0,1	0,2(0,0-1,7)	173 (98,2)	0,09	0,2 (0,0-1,4)	0,03	0,23 (0,04-1,2)
GG+AG	21 (20,7)	15 (22,3)	0,8	1,1 (0,4-2,4)	6 (10,7)	0,1	0,4(0,1-1,3)	33 (18,7)	0,5	1,2 (0,5-2,6)	0,1	0,5 (0,1-1,4)
GG+AG vs AA+AG			0,7	1,1 (0,5-2,4)		0,2	0,5 (0,1-1,5)		0,5	1,2 (0,6-2,5)	0,2	0,6(0,2-1,6)
<i>XRCC3 C/T</i>	GCI N=102 (%)	CG Ceará N= 67(%)	GCI x CG Ceará	O.R.	CG Pará N= 64(%)	GCI x CG Pará	O.R.	GCA N =178(%)	GCA x CG Ceará	O.R.	GCA x CG Pará	O.R.
CC	55 (53,9)	38 (56,7)	-		38 (59,3)	-		99 (55,6)	-		-	
CT	41 (40,1)	25 (37,3)	0,7	0,8 (0,4-1,7)	22 (34,3)	0,4	0,7 (0,3-1,5)	68(38,2)	0,8	0,9 (0,5-1,8)	0,5	0,8 (0,4-1,6)
TT	6 (5,8)	4 (5,9)	1,0	0,9 (0,2-4,2)	4(6,2)	1,0	0,9 (0,2-4,2)	11 (6,1)	1,0	0,9 (0,2-3,5)	1,0	0,9 (0,2-3,5)
CC+CT vs TT	96 (94,1)	63 (94)	1,0	0,9 (0,2-4,3)	60(93,7)	1,0	0,9 (0,2-4,1)	167 (93,8)	1,0	1,0 (0,2-4,0)	1,0	0,9 (0,2 -3,8)
TT+CT	47 (46)	29 (43,2)	0,7	0,8(0,4-1,7)	24 (37,5)	0,3	0,7 (0,3-1,4)	79 (44,3)	0,8	0,9 (0,5-1,7)	0,4	0,7 (0,4-1,4)
TT+CT vs CC+CT			0,8	0,9 (0,5-1,7)		0,5	0,8 (0,4-1,5)		0,9	0,9 (0,5-1,6)	0,5	0,8 (0,4-1,5)
<i>APE1 T/G</i>	GCI N=102(%)	CG Ceará N= 60(%)	GCI x CG Ceará	O.R.	CG Pará N= 70(%)	GCI x CG Pará	O.R.	GCA N =178(%)	GCA x CG Ceará	O.R.	GCA x CG Pará	O.R.
TT	34 (33,3)	22 (36,6)	-		31 (44,2)	-		63 (35,3)	-		-	
TG	47 (46)	32 (53,3)	0,8	1,0 (0,4-2,2)	23 (32,8)	0,07	0,5 (0,2-1,1)	84 (47,1)	0,7	1,0 (0,5-2,1)	0,06	0,5 (0,2-1,0)
GG	21(20,5)	6(10)	0,1	0,4 (0,1-1,4)	16 (22,8)	0,6	0,8 (0,3-2,0)	31 (17,4)	0,2	0,5 (0,1-1,6)	0,8	1,0 (0,4-2,3)
TT+TG vs GG	81(79,4)	54(90)	0,08	2,3 (0,8-6,9)	54 (77,1)	0,7	0,8 (0,3-1,9)	147 (82,5)	0,1	1,9 (0,7-5,3)	0,3	0,7 (0,3-1,4)
GG+TG	68 (66,6)	38 (63,3)	0,6	0,8 (0,4-1,7)	39 (55,7)	0,1	0,6 (0,3-1,2)	115 (64,6)	0,8	0,9(0,4-1,8)	0,1	0,6(0,3-1,2)
GG+TG vs TT+TG			0,5	0,8 (0,4-1,4)		0,5	0,8(0,4-1,5)		0,6	0,9 (0,5-1,5)	0,7	0,9 (0,5-1,5)
<i>XRCC1 G/A</i>	GCI N=101(%)	CG Ceará N= 66(%)	GCI x CG Ceará	O.R.	CG Pará N= 66(%)	GCI x CG Pará	O.R.	GCA N =176(%)	GCA x CG Ceará	O.R.	GCA x CG Pará	O.R.
GG	37 (36,6)	34 (51,5)	-		32 (48,4)	-		64 (36,3)	-		-	
GA	53 (52,4)	24 (36,3)	0,03	0,49 (0,2-1)‡	29 (43,9)	0,1	0,6 (0,3-1,2)	94 (53,4)	0,01*	0,48 (0,2-0,9)	0,1	0,6 (0,3-1,1)
AA	11 (10,8)	8(12,1)	0,6	0,7 (0,2-2,4)	5 (7,5)	0,2	0,5 (0,1-1,8)	18 (10,2)	0,7	0,8 (0,3-2,3)	0,2	0,5(0,1-1,70)
GG+GA vs AA	90 (89,1)	58 (87,8)	0,8	0,8(0,3-2,5)	61 (92,4)	0,4	1,4 (0,4-5,2)	158 (89,7)	0,6	0,8 (0,3-2,2)	0,5	1,3 (0,4-4,4)
AA+GA	64 (63,3)	32(48,4)	0,05	0,5(0,2-1,0)	34(51,5)	0,1	0,6 (0,3-1,2)	112 (63,6)	0,03*	0,54 (0,2-0,9)	0,08	0,6(0,3-1,1)
AA+GA vs GG+GA						0,3	0,7(0,4-1,3)		0,2	0,7 (0,4-1,3)	0,3	0,7 (0,4-1,3)

Tabela 5. Análise comparativa entre as populações com câncer gástrico subtipo intestinal no Ceará e no Pará.

<i>MLHI</i> -93 G/A	CG CEARÁ N=67	CG PARÁ N=68	P	O.R. (95 I.C.)
GG	36 (53,7)	26 (38,2)	-	
GA	28 (41,7)	38 (55,8)	0,07	1,8 (0,8-4,0)
AA	3 (4,4)	4 (5,8)	0,6	1,8 (0,3-11,5)
GG+AG vs AA	64 (95,5)	64 (94,1)	1,0	0,7 (0,1-4,1)
AA+AG	31 (46,2)	42 (61,7)	0,07	1,8 (0,8-3,9)
GG+AG vs AA+AG			0,3	1,3 (0,7-2,5)
<i>APEI</i> 2197 T/G	CG CEARÁ N=60	CG PARÁ N=70	p	O.R. (95 I.C.)
TT	22 (36,6)	31 (44,2)	-	
TG	32 (53,3)	23 (32,8)	0,08	0,5 (0,2-1,1)
GG	6 (10)	16 (22,8)	0,2	1,8 (0,5-6)
TT+TG vs GG	54 (90)	54 (77,1)	0,05	0,3 (0,1-1,1)
GG+TG	38 (63,3)	39 (55,7)	0,3	0,7 (0,3-1,5)
TT+TG vs GG+TG			0,9	1,0 (0,5-1,9)
<i>MGMT</i> 533 A/G	CG CEARÁ N= 67	CG PARÁ N=56	p	O.R. (95 I.C.)
AA	52 (77,6)	50 (89,2)	-	
AG	11 (16,4)	2 (3,5)	0,02	0,1 (0,0-0,9)*
GG	4 (5,9)	4 (7,1)	1,0	1,0 (0,2-5,3)
AA+AG vs GG	63 (94)	52 (92,8)	1,0	0,8 (0,1-4,1)
GG+AG	15 (22,3)	6 (10,7)	0,08	0,4 (0,1-1,2)
AA+AG vs GG+AG			0,1	0,4 (0,1-1,4)
<i>XRCCI</i> 28152 G/A	CG CEARÁ N=66	CG PARÁ N=66	p	O.R. (95 I.C.)
GG	34 (51,5)	32 (48,4)	-	
GA	24 (36,3)	29 (43,9)	0,4	1,2 (0,5-2,8)
AA	8 (12,1)	5 (7,5)	0,5	0,6 (0,1-2,5)
GG+GA vs AA	58 (87,8)	61 (92,4)	0,3	1,6 (0,4-6,3)
AA+GA	32 (48,4)	34 (51,5)	0,7	1,1 (0,5-2,3)
GG+GA vs AA+GA			0,9	1,0 (0,5-1,9)
<i>XRCC3</i> 18067 C/T	CG CEARÁ N=67	CG PARÁ N=64	p	O.R. (95 I.C.)
CC	38 (56,7)	38 (59,3)	-	
CT	25 (37,3)	22 (34,3)	0,7	0,8 (0,4-1,9)
TT	4 (5,9)	4 (6,2)	1,0	1,0 (0,1-5,2)
CC+CT vs TT	63 (94)	60 (93,7)	1,0	0,9 (0,1-4,8)
TT+CT	29 (43,2)	26 (40,6)	0,7	0,9 (0,4-1,9)
CC+CT vs TT+CT			0,8	0,9 (0,4-1,8)

7.3.4 Análise comparativa entre lesões gástricas não-malignas e o câncer gástrico do Ceará e do Pará de acordo com a idade

Analisando os pacientes com câncer gástrico do Pará, observou-se que os pacientes com idade igual ou superior a 57 anos portadores do alelo polimórfico de *MLHI* (GA p= 0,008; GA+AA p= 0,01) foram significativamente mais frequentes na população com câncer comparado a GCA (tabela 6). Por outro lado, para os pacientes mais jovens, apenas tendências foram observadas para o alelo polimórfico de *XRCCI* (GA p= 0,04‡ e GA+AA p= 0,03‡) em pacientes com GCA (tabela 6).

Quando comparamos os pacientes do Ceará com as lesões gástricas não malignas, não foram observadas diferenças significativas, porém, notou-se uma tendência entre os indivíduos mais jovens com o alelo polimórfico de *XRCC1* (GA $p=0,03\ddagger$ e GA+AA $p=0,03\ddagger$) na GCA e GCI ($p=0,05\ddagger$) (tabela 6).

7.3.5 Análise Comparativa entre as lesões não-malignas com o câncer gástrico do Ceará e do Pará de acordo com o gênero

Quando comparamos as lesões não-câncer com o CG do Ceará, foi observado que os pacientes do sexo masculino portadores do alelo polimórfico de *XRCC1* (GA e GA+AA) foram mais frequentes nas GCI ($p= 0,01; 0,01$) e GCA ($p= 0,001; 0,003$), enquanto que para a população do Pará notou-se apenas uma tendência do alelo polimórfico em mulheres na GCI ($p=0,02; 0,04$) e GCA ($p=0,03; 0,03$). No Pará, foi verificada uma associação significativa entre mulheres portadoras do alelo polimórfico de *APE1* (TG+GG) e a GCA ($p= 0,02$). Por outro lado, uma associação de risco para o CG em mulheres paraenses foi encontrada nas portadoras do alelo polimórfico de *MLH1* (GA $p=0,014$ e GA+AA $p=0,019$) (tabela 7).

Tabela 6 - Comparação entre gastrite crônica inativa e gastrite crônica ativa e o câncer gástrico do Pará e do Ceará de acordo com a idade.

	<57			≥57			<57			≥57		
MLHI	GCI	CG Pará	p	GCI	CG Pará	p	GCA	CG Pará	p	GCA	CG Pará	p
-93 G/A	N=58(%)	N=26(%)		N=44(%)	N=42(%)		N=115(%)	N=26(%)		N=63(%)	N=42(%)	
GG	29 (50)	12 (46,1)	-	20 (45,4)	14 (33,3)	-	54 (46,9)	12(46,1)	-	37 (58,7)	14 (33,3)	-
GA	20 (34,4)	12(46,1)	0,4	21 (47,7)	26 (61,9)	0,2	47 (40,8)	12(46,1)	0,7	23 (36,5)	26 (61,9)	0,008*
AA	9 (15,5)	2 (7,6)	0,7	3 (6,8)	2 (4,7)	1,0	14(12,1)	2 (7,6)	0,7	3 (4,7)	2 (4,7)	0,6
GG+GA vs AA	49 (84,4)	24 (92,3)	0,4	41 (93,1)	40 (95,2)	1,0	101(87,8)	24(92,3)	0,7	60(95,2)	40(95,2)	1,0
AA+GA	29 (50)	14 (53,8)	0,7	24 (54,5)	28 (66,6)	0,2	61 (53)	14(53,8)	0,9	26(41,2)	28(66,6)	0,01*
AA+GA vs GG+GA			0,9			0,6			0,9			0,1
XRCCI	GCI	CG Pará	p	GCI	CG Pará	p	GCA	CG Pará	p	GCA	CG Pará	p
28152 G/A	N=58(%)	N=24(%)		N=43(%)	N=42(%)		N=114 (%)	N=24 (%)		N=62 (%)	N=42 (%)	
GG	23 (39,6)	15 (62,5)	-	14(32,5)	17 (40,4)	-	44 (38,5)	15 (62,5)	-	20 (32,2)	17 (40,4)	-
GA	28 (48,2)	8 (33,3)	0,1	25 (58,1)	21 (50)	0,4	60 (52,6)	8 (33,3)	0,04‡	34(54,8)	21 (50)	0,4
AA	7 (12)	1 (4,1)	0,2	4 (9,3)	4 (9,5)	1,0	10 (8,7)	1 (4,1)	0,4	8 (12,9)	4 (9,5)	0,4
GG+GA vs AA	51(87,9)	23(95,8)	0,4	39 (90,6)	38(90,4)	1,0	104 (91,2)	23 (95,8)	0,6	54 (87)	38 (90,4)	0,7
AA+GA	35(60,3)	9 (37,5)	0,05	29 (67,4)	25 (59,5)	0,4	70 (61,4)	9 (37,5)	0,03‡	42 (67,7)	25 (59,5)	0,3
AA+GA vs GG+GA			0,2			0,7			0,1			0,6
	<57			≥57			<57			≥57		
XRCCI 28152 G/A	GCI	CG Ceará	p	GCI	CG Ceará	p	GCA	CG Ceará	p	GCA	CG Ceará	p
	N=58(%)	N=13(%)		N=44(%)	N=54(%)		N=115(%)	N=13(%)		N=63(%)	N=54(%)	
GG	23 (39,6)	9 (69,2)	0,06	14 (32,5)	25 (47,1)	-	44 (38,5)	9 (69,2)	-	20 (32,2)	25 (47,1)	-
GA	28 (48,2)	3 (23)	0,6	25 (58,1)	21 (39,6)	0,08	60 (52,6)	3 (23)	0,03‡	34 (54,8)	21 (39,6)	0,08
AA	7 (12)	1 (7,6)	1,0	4 (9,3)	7 (13,2)	1,0	10 (8,7)	1 (7,6)	1,0	8 (12,9)	7 (13,2)	0,5
GG+GA vs AA	51 (87,9)	12 (92,3)	0,05	39 (90,6)	46 (86,7)	0,7	104 (91,2)	12 (92,3)	1,0	54 (87)	46 (86,7)	0,9
AA+GA	35 (60,3)	4 (30,7)	0,2	29 (67,4)	28 (52,8)	0,1	70 (61,4)	4 (30,7)	0,03‡	42 (67,7)	28 (52,8)	0,1
AA+GA vs GG+GA			-			0,5			0,2			0,4

‡O.R. não acurado. *p<0,05, teste exato qui-quadrado de Pearson.

Tabela 7. Comparação entre gastrite crônica inativa e gastrite crônica ativa o câncer do Ceará e do Pará de acordo com o gênero.

	Feminino			Masculino			Feminino			Masculino		
	GCI	CG Ceará	P	GCI	CG Ceará	P	GCA	CG Ceará	P	GCA	CG Ceará	p
XRCCI 28152	N=69(%)	N=18(%)		N=33 (%)	N=49(%)		N=108(%)	N=18(%)		N=70(%)	N=49	
G/A												
GG	27 (39,1)	6 (33,3)	-	10 (31,2)	28 (58,3)	-	42 (39,6)	6 (33,3)	-	22 (31,4)	28 (58,3)	-
GA	36 (52,1)	10 (55,5)	0,6	17 (53,1)	14 (29,1)	0,01*	52 (49)	10 (55,5)	0,5	42 (60)	14 (29,1)	0,001*
AA	6 (8,6)	2 (11,1)	0,6	5 (15,6)	6 (12,5)	0,2	12 (11,3)	2 (11,1)	1,0	6 (8,5)	6 (12,5)	0,7
GG+GA vs AA	63 (91,3)	16 (88,8)	0,6	27 (84,3)	42 (87,5)	0,7	94 (88,6)	16 (88,8)	1,0	64 (91,4)	42 (87,5)	0,5
AA+GA	42 (60,8)	12 (66,6)	0,6	22 (68,7)	20 (41,6)	0,01*	64 (60,3)	12 (66,6)	0,6	48 (68,5)	20 (41,6)	0,003*
AA+GA vs GG+GA			0,7			0,1			0,8			0,1
	Feminino			Masculino			Feminino			Masculino		
MLHI -93 G/A	N=69(%)	N=22(%)		N=33 (%)	N=46(%)		N=108(%)	N=22(%)		N=70(%)	N=46(%)	
G/A												
GG	31 (44,9)	5 (22,7)	-	18 (54,5)	21 (45,6)	-	57 (52,7)	5 (22,7)	-	34 (48,5)	21 (45,6)	-
GA	29 (42)	14 (63,6)	0,05	12 (36,3)	24 (52,1)	0,2	38 (35,1)	14 (63,6)	0,014*	32 (45,7)	24 (52,1)	0,6
AA	9 (13)	3 (13,6)	0,3	3 (9)	1 (2,1)	0,3	13 (12)	3 (13,6)	0,3	4 (5,7)	1 (2,1)	0,6
GG+GA vs AA	60 (86,9)	19 (86,3)	1,0	30 (90,9)	45 (97,8)	0,3	95 (87,9)	19 (86,3)	0,7	66 (94,2)	45 (97,8)	0,6
AA+GA	38 (55)	17 (77,2)	0,06	15 (45,4)	25 (54,3)	0,4	51 (47,2)	17 (77,2)	0,019*	36 (51,4)	25 (54,3)	0,7
AA+GA vs GG+GA			0,3			0,7			0,1			0,9
	GCI	CG Pará		GCI	CG Pará		GCA	CG Pará		GCA	CG Pará	
APEI 2197 T/G	N=69 (%)	N=22(%)		N=33(%)	N=48(%)		N=108(%)	N=22(%)		N=70(%)	N=48(%)	
T/T												
TT	26 (37,6)	11 (50)	-	8 (24,2)	20 (34,4)	-	33 (30,5)	11 (50)	-	30 (42,8)	20 (34,4)	-
TG	28 (40,5)	7 (31,8)	0,3	19 (57,5)	16 (33,3)	0,04‡	56 (51,8)	7 (31,8)	0,05	28 (40)	16 (33,3)	0,7
GG	15 (21,7)	1 (4,5)	0,08	6 (18,1)	12 (25)	0,7	19 (17,5)	1 (4,5)	0,08	12 (17,1)	12 (25)	0,4
TT+TG vs GG	54 (78,2)	18 (81,8)	0,1	27 (81,8)	36 (75)	0,4	89 (82,4)	18 (81,8)	0,3	58 (82,8)	36 (75)	0,2
GG+TG	43 (62,3)	8 (36,3)	0,1	25 (75,7)	28 (58,3)	0,1	75 (69,4)	8 (36,3)	0,02*	40 (57,1)	28 (58,3)	0,8
GG+TG vs TT+TG			0,2			0,6			0,1			0,7
	GCI	CG Pará		GCI	CG Pará		GCA	CG Pará		GCA	CG Pará	
XRCCI 28152	N=69(%)	N=20(%)		N=32(%)	N=46(%)		N=106(%)	N=20(%)		N=70(%)	N=46 (%)	
G/A												
GG	27 (39,1)	13 (65)	-	10 (31,2)	19 (41,3)	-	42 (39,6)	13 (65)	-	22 (31,4)	19 (41,3)	-
GA	36 (52,1)	5 (25)	0,02‡	17 (53,1)	24 (52,1)	0,5	52 (49)	5 (25)	0,03‡	42 (60)	24 (52,1)	0,2
AA	6 (8,6)	2 (10)	1,0	5 (15,6)	3 (6,5)	0,2	12 (11,3)	2 (10)	0,7	6 (8,5)	3 (6,5)	0,2
GG+GA vs AA	63 (91,3)	18 (90)	1,0	27 (84,3)	43 (93,4)	0,2	94 (88,6)	18 (90)	1,0	64 (91,4)	43 (93,4)	0,2
AA+GA	42 (60,8)	7 (35)	0,04‡	22 (68,7)	27 (58,6)	0,3	64 (60,3)	7 (35)	0,03‡	48 (68,5)	27 (58,6)	0,2
AA+GA vs GG+GA			0,2			0,4			0,2			0,2

‡O.R. não acurado

*p<0,05, teste exato qui-quadrado de Pearson.

7.3.6 Análise comparativa entre os haplótipos dos genes das enzimas de reparo estudadas nas lesões gástricas

A fim de avaliar o efeito sinérgico dos polimorfismos estudados, foi analisada a combinação dos polimorfismos das enzimas de reparo do DNA entre as lesões não-câncer e as populações do Ceará e do Pará com câncer. Duas combinações haplotípicas se associaram a proteção quando comparadas ao CG no Ceará. Pacientes portadores do genótipo heterozigoto de *XRCCI* (GA) e homozigoto selvagem de *MGMT* (AA) foram associados a GCI (p= 0,01) (tabela 8) e indivíduos portadores do genótipo heterozigoto de *XRCCI* (GA) e homozigoto selvagem de *MLHI* (GG) a GCA (p=0,01) (tabela 9).

Comparando as lesões não câncer com o CG do Pará, foi observado que pacientes portadores dos genótipos heterozigotos de *XRCCI* (GA) e *APEI* (TG) foram mais frequentes na GCA (p= 0,006) (tabela 9).

Tabela 8. Comparação de haplótipos utilizando GCI como referência.

XCCCI (G>A) + MGMT (A>G)	GCI(%)	CG Ceará(%)	P	O.R.	CG Pará(%)	P	O.R.
GG+AA	26 (25,7)	27 (40,9)	-		25 (44,6)	-	
GG+AG	10 (9,9)	6 (9)	0,3	0,5 (0,1-2,0)	2 (3,5)	0,04	0,2 (0,0-1,1)
GG+GG	1 (0,9)	1 (1,5)	1,0	0,9 (0,0-37,6)	2 (3,5)	1,0	2,0 (0,1-62,1)
GA+AA	44 (43,5)	17 (25,7)	0,01	0,37 (0,16-0,8)*	21 (37,5)	0,06	0,5 (0,2-1,1)
GA+AG	8 (7,9)	4 (6)	0,2	0,4 (0,1-2,0)	0	0,001	0,0 (0,0-0,7)‡
GA+GG	1 (0,9)	3 (4,5)	0,6	2,8 (0,2-77,1)	1 (1,7)	1,0	1,0 (0,0-40,7)
AA+AA	10 (9,9)	7 (10,6)	0,4	0,6 (0,1-2,3)	4 (7,1)	0,1	0,4 (0,0-1,7)
AA+AG	1 (0,9)	1 (1,5)	1,0	0,9 (0,0-37,6)	0	1,0	0,0 (0,0-19,3)
AA+GG	0	0	-	-	1 (1,7)	1,0	Indef
Total	101	66			56		

‡O.R. não acurado. *p<0,05, teste exato qui-quadrado de Pearson.

Tabela 9 - Comparação de haplótipos utilizando GCA como referência.

		GCA (%)	CG CE(%)	P	O.R.	CG PA(%)	P	O.R.
	GG+TT	20 (11,3)	13 (22)	-		13 (19,6)	-	
	GG+TG	33 (18,7)	17 (28,8)	0,6	0,7 (0,2-2,1)	13 (19,6)	0,2	0,6 (0,2-1,7)
	GG+GG	11 (6,25)	2 (3,3)	0,1	0,2 (0,0-1,7)	6 (9)	0,7	0,8 (0,2-3,3)
XRCC1 (G>A) + APE1 (T>G)	GA+TT	34 (19,3)	5 (8,4)	0,009	0,2 (0,0-0,8)*	12 (18,1)	0,2	0,5 (0,1-1,5)
	GA+TG	44 (25)	11 (18,6)	0,04	0,3 (0,1-1,1)	7 (10,6)	0,006	0,24 (0,07-0,79)
	GA+GG	16 (9)	4 (6,7)	0,1	0,3 (0,0-1,6)	10 (15,1)	0,9	0,9 (0,2-3,1)
Total	AA+TT	7 (3,9)	3 (5)	0,7	0,6 (0,1-3,6)	2 (3)	0,4	0,4 (0,0-2,9)
	AA+TG	7 (3,9)	4 (6,7)	1,0	0,8 (0,1-4,3)	3 (4,5)	0,7	0,6 (0,1-3,6)
	AA+GG	4 (2,2)	0	0,2	0,0 (0,0-2,8)	0	0,2	0,0 (0,0-2,8)
		176	59			66		
		GCA (%)	CG CE(%)	P	O.R.	CG PA (%)	P	O.R.
	GG+GG	31 (17,6)	21 (31,8)	-		14 (21,5)	-	
	GG+GA	27 (15,3)	11 (16,6)	0,2	0,6 (0,2-1,6)	16 (24,6)	0,5	1,3 (0,5-3,4)
	GG+AA	6 (3,4)	2 (1)	0,6	0,4 (0,0-3,1)	1 (1,5)	0,6	0,3 (0,0-3,7)
XRCC1 (G>A) + MLH1 (G>A)	GA+GG	48 (27,2)	11 (16,6)	0,01	0,34 (0,13-0,86)	9 (13,8)	0,06	0,4 (0,1-1,1)
	GA+GA	36 (20,4)	12 (18,1)	0,1	0,4 (0,1-1,2)	18 (27,6)	0,8	1,1 (0,4-2,8)
	GA+AA	10 (5,6)	1 (1,5)	0,07	0,1 (0,0-1,2)	2 (3)	0,4	0,4 (0,0-2,6)
Total	AA+GG	12 (6,8)	4 (6)	0,2	0,4 (0,1-1,9)	3 (4,6)	0,5	0,5 (0,1-2,6)
	AA+GA	5 (2,8)	4 (6)	1,0	1,1 (0,2-5,9)	1 (1,5)	0,6	0,4 (0,0-4,6)
	AA+AA	1 (0,56)	0	1,0	0,0 (0,0-27,4)	1 (1,5)	0,5	2,2 (0,0-88,8)
		176	66			65		
		GCA (%)	CG CE(%)	P	O.R.	CG PA (%)	P	O.R.
	GG+CC	48 (26,9)	18 (26,8)	-		15 (23,4)	-	
	GG+CT	37 (20,7)	15 (22,3)	0,8	1,0 (0,4-2,6)	10 (15,6)	0,7	0,8 (0,3-2,0)
	GG+TT	6 (3,3)	3 (4,4)	0,7	1,3 (0,2-7,0)	0	0,3	0,0 (0,0-3,4)
MLH1 (G>A) + XRCC3 (C>T)	GA+CC	43 (24,1)	18 (26,8)	0,7	1,1 (0,4-2,5)	21 (32,8)	0,2	1,5 (0,6-3,6)
	GA+CT	22 (12,3)	9 (13,4)	0,8	1,0 (0,3-3,0)	10 (15,6)	0,4	1,4 (0,5-4,1)
	GA+TT	5 (2,8)	1 (1,4)	1,0	0,5 (0,0-5,3)	4 (6,2)	0,2	2,5 (0,4-13,1)
Total	AA+CC	8 (4,4)	2 (2,9)	1,0	0,6 (0,0-3,9)	2 (3,1)	1,0	0,8 (0,1-4,8)
	AA+CT	9 (5,0)	1 (1,4)	0,4	0,3 (0,0-2,6)	2 (3,1)	1,0	0,7 (0,0-4,1)
	AA+TT	0	0	-	-	0	-	-
		178	67			64		

GCA foi usada como referência. ‡O.R. não acurado. *p<0,05, teste exato qui-quadrado de Pearson.

7.3.7 Detecção de *Helicobacter pylori*

Baseando-se na detecção do gene *ureC*, foi verificada uma alta positividade em todas as lesões avaliadas. No câncer gástrico, o gene foi detectado em 82% dos pacientes do Ceará e 100% nos pacientes do Pará. A distribuição dos genes de virulência de *H. pylori* nas lesões gástricas foi realizada através da detecção dos alelos do gene *vacA* e genes de *cagPAI* (tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição dos genes de *Helicobacter pylori* nas lesões não-malignas e câncer.

Genes <i>H. pylori</i>	ICG N=102 (%)	ACG N=178 (%)	IM N=74 (%)	CG Ceará N=78 (%)	CG Pará N=72 (%)
<i>urec</i>	70 (68,6)	161 (90,4)	57 (77)	64 (82)	72 (100)
<i>s2</i>	16 (22,85)	30 (18,63)	8 (14)	6 (9,3)	15 (20,8)
<i>s1</i>	31 (44,2)	84 (52,17)	25 (43,85)	58 (90,6)	57 (79,1)
<i>s1s2</i>	23 (32,85)	47 (29,19)	24 (42,1)	0	0
<i>m2</i>	24 (34,18)	37 (22,98)	8 (14)	18 (28,1)	23 (31,9)
<i>m1</i>	12 (17,14)	44 (27,3)	22 (38,59)	44 (68,7)	45 (62,5)
<i>m1m2</i>	34 (48,57)	80 (49,68)	27 (47,3)	2 (3,1)	4 (5,5)
<i>s2m2</i>	8 (11,4)	13 (8)	1 (1,7)	5 (7,8)	10 (13,8)
<i>s2m1</i>	2 (2,8)	9 (5,5)	4 (7)	1 (1,5)	4 (5,5)
<i>s1m2</i>	9 (12,8)	18 (11,1)	5 (8,7)	13 (20,3)	13 (18)
<i>s1m1</i>	7 (10)	26 (16,1)	9 (15,7)	43 (67,1)	41 (56,9)
<i>cagA</i>	27(38,57)	102 (63,35)	33 (57,8)	43 (67,1)	43 (59,7)
<i>cagE</i>	12(17,14)	91 (56,5)	32 (56,1)	35 (54,6)	63 (87,5)
<i>virB11</i>	18(25,71)	89 (55,2)	28 (49,1)	40 (62,5)	52 (72,2)

Uma correlação positiva foi observada entre os alelos *vacA s1* e *m1* e as populações com câncer do Ceará ($r= 0,198$, $p=0,000$; $r=0,209$, $p= 0,000$) e do Pará ($r= 0,228$, $p= 0,000$; $r=0,253$; $p=0,000$). Quanto a *cagPAI*, os genes *cagE* ($r= 0,338$; $p= 0,000$) e *virB11* ($r= 0,221$; $p=0,000$) foram correlacionados a população paraense com câncer gástrico.

7.3.8 Comparação dos genes de *H. pylori* nas lesões gástricas

O genótipo *vacA s1m1* foi significativamente maior nos casos de câncer gástrico do Ceará quando comparados a GCI ($p=0,0013$) e GCA ($p=0,018$) e também no casos de câncer do Pará quando comparados a GCI ($p=0,002$). Não houve diferença entre o CG e a IM.

Quanto a distribuição dos genes da ilha de patogenicidade *cag*, os genes *cagA*, *cagE* e *virB11* foram significativamente mais frequentes no CG Ceará ($p=0,0009$; $0,0000$; $0,0000$) e CG Pará ($p= 0,01$; $0,0000$; $0,0000$) quando comparados a GCI (tabelas 11 e 12).

Para o estado do Pará, os genes *cagE* ($p= 0,0000$) e *virB11* ($p= 0,01$) foram mais frequentes no CG quando comparado a GCA e IM (tabela 12).

7.3.9 Análise agrupada dos genes de cagPAI de acordo com a lesão gástrica

A fim de avaliar uma maior integridade da ilha de patogenicidade de *H. pylori*, analisamos os genes de *cagPAI* associados 2 a 2. Nesta análise, verificamos que a combinação dos genes *cagA+* *cagE+* foi estatisticamente mais frequente nos casos GC Pará ($p=0,0000$) quando comparado a GCI, mas apenas uma tendência foi notada para o Ceará ($p=0,05$) quando comparado a GCA (tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Comparação dos genes de *H. pylori* distribuídos nas lesões gástricas não-malignas e o Câncer Gástrico do Ceará.

Genes <i>H. pylori</i>	ICG	CG Ceará	ICG vs CG Ceará		ACG	ACG vs Ceará		MI	MI vs Ceará	
	N=102	N=78	p	O.R.	N=178	p	O.R.	N=74	p	O.R.
ureC+	70 (68,6)	64 (82)			161 (90,4)			57 (77)		
<i>s2</i>	16 (22,85)	6 (9,3)	-		30 (18,63)	-		8 (13,55)	-	
<i>s1</i>	31 (44,2)	58 (90,6)	0,001	4,9 (1,6-16,0)*	84 (52,17)	0,006	3,4 (1,2-9,9)*	25 (43,85)	0,06	3,0 (0,8-11,4)
<i>s1s2</i>	23 (32,85)	0			47 (29,19)			24 (40,67)		
<i>m2</i>	24 (34,18)	18 (28,1)	-		37 (22,98)	-		8 (14,03)	-	
<i>m1</i>	12 (17,14)	44 (68,7)	0,0002	4,8 (1,8-13,1)	44 (27,3)	0,04	2,0 (0,9-4,4)	22 (38,59)	0,8	0,8 (0,3-2,6)
<i>m1m2</i>	34 (48,57)	2 (3,1)			80 (49,68)			27 (47,36)		
<i>s2m2</i>	8 (11,4)	5 (7,8)	-		13 (8)	-		1 (1,7)	-	
<i>s2m1</i>	2 (2,8)	1 (1,5)	1,0	0,8 (0,0-17,8)	9 (5,5)	0,3	0,2 (0,0-3,5)	4 (7)	0,08	0,0 (0,0-1,7)
<i>s1m2</i>	9 (12,8)	13 (20,3)	0,2	2,3 (0,4-12,0)	18 (11,1)	0,3	1,8 (0,4-7,9)	5 (8,7)	1,0	0,5 (0,0-7,3)
<i>s1m1</i>	7 (10)	43 (67,1)	0,001	9,8 (2,0-49,8)	26 (16,1)	0,008	4,3 (1,2-15,8)*	9 (15,7)	1,0	0,9 (0,0-10,6)
<i>cagA</i> -	43 (61,42)	21 (32,8)	-		59 (36,6)	-		24 (42,1)	-	
<i>cagA</i> +	27 (38,57)	43 (67,1)	0,0009	3,2 (1,5-7,0)	102 (63,3)	0,5	1,1 (0,6-2,2)	33 (57,8)	0,2	1,4 (0,6-3,3)
<i>cagE</i> -	58 (82,85)	29 (45,3)	-		70 (43,4)	-		25 (43,8)	-	
<i>cagE</i> +	12 (17,14)	35 (54,6)	0,000005	5,8 (2,4-13,9)	91 (56,5)	0,8	0,9 (0,5-1,7)	32 (56,1)	0,8	0,9 (0,4-2,0)
<i>virB11</i> -	52 (74,28)	24 (37,5)	-		72 (44,7)	-		29 (50,8)	-	
<i>virB11</i> +	18 (25,71)	40 (62,5)	0,00001	4,8 (2,1-10,8)	89 (55,2)	0,3	1,3 (0,7-2,5)	28 (49,1)	0,1	1,7 (0,7-3,8)
<i>cagE-virB11</i> +	7 (10)	6 (9,3)	-		15 (9,3)	-		6 (10,5)	-	
<i>cagE+virB11</i> +	11 (15,7)	34 (53,1)	0,08	3,6 (0,8-15,8)	74 (45,9)	0,7	1,1 (0,3-3,6)	22 (37,2)	0,5	1,5 (0,3-6,3)
<i>cagE-cagA</i> +	17 (24,2)	18 (28,1)	-		25 (15,5)	-		10 (17,5)	-	
<i>cagE+cagA</i> +	10 (14,2)	25 (39)	0,08	2,3 (0,7-7,1)	77 (47,8)	0,05	0,5 (0,3-0,9)	23 (38,9)	0,3	0,6 (0,2-1,7)

*p<0,05, teste exato qui-quadrado de Pearson.

Tabela 12- Comparação dos genes de *H. pylori* distribuídos nas lesões gástricas não-malignas e o câncer gástrico do Pará.

Genes <i>H. pylori</i>	ICG	CG Pará	ICG vs Pará		ACG	ACG vs Pará		MI	MI vs Pará	
	N=102	N=72	p	O.R.	N=178	p	O.R.	N=74	p	O.R.
ureC+	70 (68,6)	72 (100)			161 (90,4)			57 (77)		
<i>s2</i>	16 (22,85)	15 (20,8)	-		30 (18,63)	-		8 (13,55)	-	
<i>s1</i>	31 (44,2)	57 (79,1)	0,1	1,9 (0,7-4,8)	84 (52,17)	0,3	1,3 (0,6-2,9)	25(43,85)	0,6	1,2 (0,4-3,5)
<i>s1s2</i>	23 (32,85)	0			47 (29,19)			24(40,67)		
<i>m2</i>	24 (34,18)	23 (31,9)	-		37 (22,98)	-		8 (14,03)	-	
<i>m1</i>	12 (17,14)	45 (62,5)	0,001	3,9 (1,5-10,1)	44 (27,3)	0,1	1,6 (0,8-3,3)	22(38,59)	0,4	0,7 (0,2-2,0)
<i>m1m2</i>	34 (48,57)	4 (5,5)			80 (49,68)			27(47,36)		
<i>s2m2</i>	8 (11,4)	10 (13,8)	-		13 (8)	-		1 (1,7)	-	
<i>s2m1</i>	2 (2,8)	4 (5,5)	1,0	1,6 (0,1-17,1)	9 (5,5)	0,4	0,5 (0,1-2,9)	4 (7)	0,1	0,1 (0,0-1,5)
<i>s1m2</i>	9 (12,8)	13 (18)	0,8	1,1 (0,2-4,9)	18 (11,1)	0,9	0,9 (0,2-3,2)	5 (8,7)	0,3	0,2 (0,0-3,0)
<i>s1m1</i>	7 (10)	41 (56,9)	0,01	4,6 (1,1-19,2)	26 (16,1)	0,1	2,0 (0,7-5,9)	9 (15,7)	0,6	0,4 (0,0-4,3)
<i>cagA</i> -	43 (61,42)	29 (40,2)	-		59 (36,6)	-		24 (42,1)	-	
<i>cagA</i> +	27 (38,57)	43 (59,7)	0,01	2,3 (1,1-4,9)	102 (63,3)	0,5	0,8 (0,4-1,5)	33 (57,8)	0,8	1,0 (0,5-2,3)
<i>cagE</i> -	58 (82,85)	9 (12,5)	-		70 (43,4)	-		25 (43,8)	-	
<i>cagE</i> +	12 (17,14)	63 (87,5)	0,00000	33,8 (12,2-97,7)	91 (56,5)	0,0000	5,3 (2,3-12,5)	32 (56,1)	0,0000	5,4 (2,1-14)
<i>virB11</i> -	52 (74,28)	20 (27,7)	-		72 (44,7)	-		29 (50,8)	-	
<i>virB11</i> +	18 (25,71)	52 (72,2)	0,00000	7,5 (3,3-17,0)	89 (55,2)	0,01	2,1 (1,1-4,0)	28 (49,1)	0,007	2,6 (1,2-5,9)
<i>cagE-virB11</i> +	7 (10)	2 (2,7)	-		15 (9,3)	-		6 (10,5)	-	
<i>cagE+virB11</i> +	11 (15,7)	50 (69,4)	0,0006	15,9(2,4-130,4)	74 (45,9)	0,02	5,0 (1,0-33,6)	22 (37,2)	0,01	6,8 (1,1-53)
<i>cagE-cagA</i> +	17 (24,2)	6 (8,3)	-		25 (15,5)	-		10 (17,5)	-	
<i>cagE+cagA</i> +	10 (14,2)	37 (51,3)	0,00002	10,4 (2,8-40,4)	77 (47,8)	0,1	2,0 (0,7-5,9)	23 (38,9)	0,08	2,6 (0,7-9,7)

*p<0,05, teste exato qui-quadrado de Pearson.

7.3.10 Polimorfismos Genéticos e *Helicobacter pylori*

Tendo em vista a multiplicidade de fatores que levam as doenças gástricas, analisamos a interação entre os genes de virulência de *H. pylori* e os polimorfismos genéticos investigados nas lesões gástricas.

Para a população com câncer gástrico do Ceará, os polimorfismos de *APE1* e *MGMT* foram mais relevantes. Para esta população, notou-se uma correlação negativa entre cepas com genótipo *vacA s1m1* e pacientes com o genótipo homozigoto polimórfico (GG) de *MGMT* ($r = -0,264$; $p = 0,04$). Já as infecções com cepas menos virulentas, *vacA s2m1*, apresentaram correlação positiva com o genótipo homozigoto polimórfico (GG) de *APE1* ($r = 0,389$; $p = 0,004$), e no Pará, cepas com capacidade ainda menor de sintetizar toxinas, *vacA s2m2*, estavam correlacionadas negativamente a pacientes com genótipo homozigoto selvagem (TT *APE1*) ($r = -0,273$; $p = 0,28$).

Quanto aos genes de *cagPAI*, foi observado para a população paraense uma correlação positiva entre o gene *cagA* de *H. pylori* e indivíduos portadores dos genótipos selvagens de (GG) *MLH1* ($r = 0,267$; $p = 0,027$) e (GG) *XRCC1* ($r = 0,258$; $p = 0,037$), por outro lado, foi encontrada uma correlação negativa com o genótipo heterozigoto (GA) de *XRCC1* ($r = -0,316$; $p = 0,010$).

Os genes *cagE* e *virB11* relacionaram-se com o polimorfismo de *APE1*. No Pará, indivíduos portadores do genótipo selvagem (TT) de *APE1* estavam infectados com cepas *cagE+* ($r = 0,263$; $p = 0,029$), ao passo que para a população cearense, cepas de *H. pylori* portadoras do gene *virB11* correlacionaram-se negativamente com indivíduos portando genótipo homozigoto polimórfico (*APE1* GG) ($r = -0,269$; $p = 0,038$).

8 DISCUSSÃO

Embora o cenário da incidência do câncer gástrico esteja em declínio constante das mortes oncológicas, 1 em 12 são atribuíveis ao câncer de estômago, sendo a terceira principal causa de morte por câncer no mundo (RAWALA; BARSOUK, 2019) e, por essa razão, a prevenção continua sendo uma prioridade (SITARZ *et al*, 2018).

Seguindo a tendência das taxas de incidência do câncer de estômago nos países em desenvolvimento (RAWALA; BARSOUK, 2019), em nosso estudo, os homens foram mais diagnosticados com câncer gástrico que as mulheres. Dentre as possíveis explicações biológicas, tem sido proposto que o estrogênio desempenha um papel protetor para o desenvolvimento do câncer gástrico, demonstrado por outros autores pela redução do risco para o câncer de estômago na menopausa tardia e aumento de fertilidade, com um aumento significativo da incidência após a menopausa (CAMARGO *et al*, 2012). Outras causas que também podem contribuir para maior incidência nos homens são as diferenças na dieta e ocupação (RAWALA; BARSOUK, 2019).

As lesões pré-cancerosas de longa data (SITARZ *et al*, 2018) que antecedem o câncer gástrico do subtipo intestinal conferem um caráter tardio a doença, o que corrobora com o maior número de casos de metaplasia intestinal e câncer gástrico nos pacientes maiores de 57 anos.

Devido a multicausalidade do câncer de estômago, faz-se necessário estudos que combinem fatores ambientais e alterações genéticas no hospedeiro que são apontados como os principais determinantes da doença. Dentre os fatores genéticos relevantes para o desenvolvimento de tumores, destacam-se os polimorfismos genéticos em genes do reparo do DNA, que tem sido investigados em diversos tipos de cânceres, incluindo o câncer de estômago (PALLI *et al*, 2011; HSIEH *et al*, 2017; LI *et al*, 2017). No entanto, os resultados na literatura ainda são bastantes controversos e, provavelmente, a etnia seja um fator que contribua para a discrepância encontrada entre os estudos ao redor do mundo (ZHAO *et al*, 2011; HOI *et al*, 2017; HSIEH *et al*, 2017).

Em análise geral dos polimorfismos das enzimas de reparo do DNA estudados não houve diferença significativa entre os polimorfismos entre os estados do Ceará e do Pará, embora a frequência do alelo polimórfico de *MLH1* seja sutilmente mais frequente no Pará. Neste último, o câncer de estômago foi associado aos indivíduos portadores do genótipo heterozigoto de *MLH1* (GA), especialmente nos maiores de 57 anos e em mulheres. O estudo funcional de Mei *et al* (2010) demonstrou que a presença do alelo polimórfico na posição -93 do gene *MLH1*

pode alterar a ligação de proteínas à região promotora afetando a expressão do gene e assim contribuindo para a instabilidade genética e o aumento do risco de desenvolvimento do câncer de estômago. Além disso, o alelo polimórfico foi associado a mulheres com câncer de colo retal (MIYAKURA *et al*, 2014), sugerindo que para o polimorfismo -93 *MLH1* as diferenças biológicas entre os gêneros não protege as mulheres, mas lhes confere um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores.

Quanto ao polimorfismo de *XRCC1*, observou-se que o alelo polimórfico diminuiu o risco para o desenvolvimento do câncer de estômago tanto para os cearenses como para os paraenses. Quando consideramos o gênero no Ceará, os homens foram mais associados ao alelo polimórfico, enquanto no Pará uma tendência foi observada entre as mulheres. Essa diferença provavelmente deve-se a diferenças genéticas entre estas populações que foram influenciadas pela colonização e a aspectos culturais/comportamentais que não foram avaliadas neste estudo.

Quando realizamos a análise haplotípica entre os genes de reparo do DNA observamos que o genótipo heterozigoto de *XRCC1* associado aos genótipos selvagens de *MGMT* (AA) e *MLH1* (GG) e heterozigoto de *APE* (TG) foram mais frequentes nas gastrites, mostrando a intrincada relação entre as diferentes vias de reparo e reforçando a importância do polimorfismo de *XRCC1* na diminuição do risco para a progressão da lesão gástrica tanto no Ceará quanto no Pará.

As taxas de infecção por *H. pylori* foram altas para ambas as populações, sendo superior a metanálise recente realizada por Hooi *et al* (2017), mas corroborando com o estudo de Coelho *et al* (2018) que descreveram taxas de prevalência de *H. pylori* entre 70% a 90% nos adultos, dependendo das condições sanitárias. Esse microrganismo é considerado o principal fator de risco para o câncer de estômago do subtipo intestinal (RAWALA; BARSOUK, 2019).

Quando os dados dos polimorfismos genéticos foram integrados aos fatores de virulência de *H. pylori*, foi observado que os indivíduos portadores do alelo polimórfico de *APE*, tanto do Ceará quanto do Pará, eram infectados com cepas menos virulentas. Hu *et al* (2009) descreveram que o alelo polimórfico de *APE* pode afetar a eficiência do reparo, desta forma, cepas de baixa virulência podem contribuir com a carcinogênese gástrica. A importância de cepas menos virulentas na susceptibilidade ao câncer de estômago foi demonstrado anteriormente por Silva-Fernandes *et al* (2014) na população cearense. Por outro lado, mesmo com um sistema de reparo eficiente (*XRCC1*, *MLH1* e *APE* genótipos selvagens), os indivíduos infectados com cepas virulentas (*cagA*, *cagE* e *virB11*) desenvolveram câncer de estômago,

destacando a importância do genótipo bacteriano na carcinogênese gástrica para ambas as populações.

As pequenas diferenças encontradas entre as populações do Ceará e do Pará provavelmente se devem a heterogeneidade populacional e também de fatores ambientais e culturais. Além disso, o número de indivíduos analisados também pode ser um fator que contribuiu com essa diferença. Ademais, é recomendado que os marcadores genéticos sejam avaliados em um número maior de indivíduos de diferentes regiões geográficas para validação.

9 CONCLUSÃO

Os polimorfismos dos genes de interleucinas estudados contribuem para o desenvolvimento da doença gástrica, principalmente na presença de cepas mais virulentas que superestimulam a inflamação e podem contribuir para danos no DNA.

O sistema de reparo eficiente pode ser superado em infecções com cepas virulentas de *H. pylori* e nos indivíduos com reparo insuficiente, cepas menos virulentas estão envolvidas na carcinogênese gástrica.

Os polimorfismos de *IL6-174 G/C*, *IL8-251 A/T*, *IL1 β -511 C/T*, *IL1RN VNTR*, *XRCC1 G28152A*, *MLH1-93 G/A* e *APE T2197G* são potenciais biomarcadores para o desenvolvimento da doença gástrica e devem ser analisados em conjunto com marcadores de virulência de *H. pylori*. De modo particular, sugerimos a utilização da genotipagem conjunta de *XRCC1 G28152A* e *cagE* e *MLH1-93 G/A* associado a *cagE* e *vacA* para a identificação de pacientes com maior risco de progressão da doença gástrica.

REFERÊNCIAS

- ALGOOD, M. S.; COVER, T. L. Helicobacter pylori Persistence: an Overview of Interactions between H. pylori and Host Immune Defenses Holly. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v.19, n.4, p. 597–613, 2006.
- ASFELDT, A.M. **Helicobacter pylori and dyspepsia from a public health perspective**. 2009.Tese-University of Tromsø, Norway.
- ASSUMPCÃO, P.P.; ARAÚJO, T.M.T.; ASSUMPCÃO, P.B. *et al.* Suicide journey of Helicobacter pylori through gastric carcinogenesis: the role of non-H. pylori microbiome and potencial consequences for clinical practice. **Eur J Clin Microbial Infec Dis**, [s.l.], 10.1007/s10096-019-03564-5, 2019.
- ATHERTON, J.C.; CAO, P.; PEEK, R.M.; TUMMURU, M.K.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem.**, [s.l.], v.270, p. 17771–17777, 1995.
- AVILÉZ-JIMENÉZ F. *et al.* In vivo expression of Helicobacter pylori virulence genes in patients with gastritis, ulcer, and gastric cancer. **Infec Immun.**, [s.l.], v.8, n.12, p. 594-601, 2012.
- AZUMA, T. Role of Cag A in the Helicobacter pylori infection and pathology. En Wang TC, (Eds). The biology of gastric cancers. **Springer Science Business Media.**, [s.l.], p. 389-401, 2009.
- BABUSHKINA, N. P.; ANDKUCHER, A. N. Functional Role of VNTR Polymorphism of Human Genes 10227954, **Russian Journal of Genetics**, [s.l.], v.47, n.6, p.637–645, 2011.
- BAGHERIA, N.; SALIMZADEHB, L.; SHIRZADA, H. The role of T helper 1-cell response in Helicobacter pylori-infection. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v.123, p.1-8, 2018.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativa: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, [s.l.], v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BASHIR, H. *et al.* Polymorphism of the : a case–control studyXRCC3: a case–control study gene and risk of gastric cancer in a Kashmiri population: a case–control study. **European Journal of Cancer Prevention.**, [s.l.], v.24, n.3, p.167–175, 2015.
- BERRA, C. M., MENCK, C. F. M., MASCIIO, P. D. Oxidative stress, lesions in the genome and signaling processes in cell cycle control. **Quim. Nova.**, [s.l.], v.29, p.3401-3440, 2006.
- BESSLER, H; SHAVIT, Y; MAYBURD, M; SMIRNOV, G; BEILIN, B. Postoperative pain, morphine consumption, and genetic polymorphism of IL1B and IL1 receptor antagonist. **Neuroscience letters.**, [s.l.], v.404, p.154-158, 2006.
- BLANCHARD, T.; NEDRUD, J. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. **Current Protocols in Microbiology.**, [s.l.], supplement 24, 2012.

BOCKERSTETT KA, D.R.J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol.**, [s.l.], v.14, n.4, p.47-53, 2017.

BRIDGE, G.; RASHID, S.; MARTIN, S. A. DNA Mismatch Repair and Oxidative DNA Damage: Implications for Cancer Biology and Treatment. **Cancers**, [s.l.], v. 6, p. 1597-1614, 2014.

BUGNI, J.M.; HAN, J.; TSAI, M.S.; HUNTER, D.J.; SAMSON, L.D. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. **DNA Repair**, Amst., v.1, n.6, p.1116-26, 2007.

CALEMAN-NETO *et al.* "Gene polymorphism of interleukin 1 and 8 in chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori*. **JVATITD.**, [s.l.], v. 20, p.17-23, 2014.

CAPELLA, G.; PERA, G.; SALA, N.; AGUDO, A.; RICO, F.; GIUDICCE, G. *et al.* DNA repair polymorphisms and the risk of stomach adenocarcinoma and severe chronic gastritis in the EPIC-EURGAST study. **Int. J. Epidem.**, [s.l.], v.3, n.7, p.1316–1325, 2008.

CAPELLE, L.G.; DE VRIES, A.C.; HARINGSMA, J.; TER BORG, F.; DE VRIES, R.A.; BRUNO, M.J.; VAN DEKKEN, H.; MEIJER, J.; VAN GRIEKEN, N.C.; KUIPERS, E.J. The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. **Gastrointest. Endosc.**, [s.l.], v.71, n.7, p.1150-1158, 2010.

CENSINI, S. *et al.* Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA.**, v. 93, p. 14648–14653, 1996.

CHENG, Y.K. *et al.*, Increased Prevalence of Interleukin1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism in Patients with Chronic Rhinosinusitis, **Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.**, [s.l.], v. 132, p. 285-290, 2006.

CHENG, SHIDAN; WANG, LIYING; WANG, LEI; WANG, ZHENGTING. Association of XRCC3 gene rs861539 polymorphism with gastric cancer risk: evidence from a case-control study and a meta-analysis. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, [s.l.], v.8, n.2, p.1911-1919, 2015.

CHEUNG, S.K.; CHAN, E.W.; WONG, A.Y.S. *et al.* Long-term proton pump inhibitors and risk of gastric cancer development after treatment for *Helicobacter pylori*: a population-based study. **Gut**, [s.l.], v.67, p.28-35, 2018.

CHIARINI, C. *et al.* Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, [s.l.], v. 28, p. 437–446, 2009.

CHRISTMANN, M. *et al.* O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. **BBA - Reviews on Cancer.**, [s.l.], v.1816, n. 2, p.179-190, 2011.

CONTEDEUCA, V. S.D.; LAULETTA, G.; RUSSI, S. *et al.* H. pylori infection and gastric cancer: State of the art (Review). **Inter. J. Onco.**, [s.l.], v.42, n.1, 2012.

CORREA, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Am. J. Surg. Pathol.**, [s.l.], v. 19, Suppl 1:S37-43, 1995.

COSTA, D.M; PEREIRA, E.S; RABENHORST, S.H.B. What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. **World. J. Gastroenterol.**, [s.l.], v.7, n.21, p. 10563-72, 2015.

CROSBIE, J., PERUSSE, D., BARR, C. L., SHACHAR, R., J. Validating Psychiatric Endophenotypes: Inhibitory control and attention deficit hyperactivity disorder. **Neuro. Biobeh. Rev.**, [s.l.], v.32, p.40-55, 2008.

DAI, Z-J. *et al.* Relationship between apurinic endonuclease 1 Asp148Glu polymorphism and gastrointestinal cancer risk: An updated meta-analysis. **World. J. Gastroenterol.**, [s.l.], v.28, n.21, p. 5081-5089, 2015.

DANI; PASSOS. **Gastroenterologia Essencial**. Guanabara Koogan, 2011.

DIACONU, S.; PREDESCU, A.; MOLDOVEANU, A.; POP, C.S.; FIERBINȚEANU-BRATICEVICI, C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. **J. Med. Life.**, [s.l.], v. 10, n.2, p.112-117, 2017.

DINIS-RIBEIRO, M.; AREIA, M.; DE VRIES, A.C.; MARCOS-PINTO, R.; MONTEIRO-SOARES, M.; O'CONNOR, A. *et al.* *Endoscopia Digestiva* (SPED). **Endoscopy.**, [s.l.], v.44, n.1, p. 74-94, 2012.

DIXON, M.F. *et al.* Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am. J. Surg. Pathol.**, [s.l.] v. 20, n. 10, p. 161-81, 1996.

DORE, M.P.; CIPOLLI, A.; RUGGIU, M.W.; MANCA, A.; BASSOTTI, G.; MARIO, P.G. *Helicobacter pylori* eradication may influence timing of endoscopic surveillance for gastric cancer in patients with gastric precancerous lesions. A retrospective study. **Medicine** (Baltimore), [s.l.], v.97, n.4, e9734, 2018.

DU, L. *et al.* The polymorphisms in the MGMT gene and the risk of cancer: a meta-analysis. **Tumor Biol.**, [s.l.], v.34, p.3227–3237, 2013.

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. J. Gastroenterol.**, [s.l.], v.11, n.42, p.6593-6600, 2005.

DUBOIS, A.; BORÉN, T. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. **Cell. Microbiol.**, [s.l.], v. 9, p. 1108–1116, 2007.

EL-OMAR, E.M. *et al.* *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. **Gastroenterology.**, [s.l.], v. 109, p. 681–691, 1995.

EMARAA, M.S.; SALAMAA, R.I.; SALEMC, A.A. Demographic, Endoscopic and Histopathologic Features Among Stool *H. pylori* Positive and Stool *H. pylori* Negative Patients With Dyspepsia. **Gastroenterol. Res.**, [s.l.], v.10, n.5, p.305-310, 2017.

FAZELI, Z., ALEBOUYEH, M., REZAEI TAVIRANI, M., AZIMIRAD, M., YADEGAR, A. *Helicobacter pylori* CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells. **Gastroente. Hep. Bed Bench.**, [s.l.], 9(Suppl), S42-S46. v.11, n. 30. doi:10.1186/s13027-016-0078-5, 2016.

FEHLINGS, M. *et al.* Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. **Infect. Immun.**, [s.l.], v. 80, p. 2724-2734, 2012.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer.**, [s.l.], v.1, p. 359-386, 2015.

FERNÁNDEZ-REAL, *et al.* Interleukin-6 Gene Polymorphism and Insulin Sensitivity. **Diabetes**, [s.l.], v. 49, 2000.

FIGUEIREDO, C., *et al.* *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, [s.l.], v. 20, n. 22, p. 1680-1687, 2002.

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

FOX, J.G., WANG, T.C. Inflammation atrophy and gastric cancer. **J. Clin. Invest.**, [s.l.], v. 17, p. 60-9, 2007.

FRANK, B. *et al.* DNA repair gene polymorphisms and risk of chronic atrophic gastritis: a case-control study. **BMC Cancer**, [s.l.], v.11, p.440, 2011.

GATTI, L.L. *et al.* Interleukin-6 polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in Brazilian adult patients with chronic gastritis. **Clin. Exp. Med.**, [s.l.], v.5, p. 112-116, 2005.

GAUBEUR, M.A.; MOURA, E.I.; CHAMMAS, R. Marcadores radiométricos de dano ao DNA: possíveis alvos e estado atual. **Rev Med.**, [s.l.], v.95, n.1, p. 46-56, 2015.

GENTA, R.M.; TURNER, K.O. Demographic and socioeconomic influences on *Helicobacter pylori* gastritis and its pre-neoplastic lesions amongst US residentes. **Aliment. Pharmacol.**, [s.l.], v.46, p.322-330, 2017.

GHOLIZADETOBNAGH, S. *et al.* Role of Plasticity Region Genes and *cagE* gene of *cagPAI* of *Helicobacter pylori* in Development of Gastrointestinal (GI) Diseases. **Asian. Pac. J. Cancer. Prev.**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 43, 2017.

GO, M.F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, [s.l.], v. 16, (Suppl. 1), p. 3-15, 2002.

- GRAHAM, D.Y. *et al.* Monath. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. **Gut**, [s.l.], v.53, p.1235–1243, 2004.
- GREEN, E.R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems – An overview. **Microbiol. Spectr.**, [s.l.] v.4, n.1, doi:10.1128/microbiolspec, 2016.
- GUIMARÃES, J.; CORVELO, T.C.; BARILE, K.A. *Helicobacter pylori*: pathogenesis associated factors. **Rev. Para. Med.**, [s.l.], v. 22, n.1; 2008.
- GULLO, I. Heterogeneity in Gastric Cancer: From Pure Morphology to Molecular classifications. **Pathobiology**, [s.l.], v.16, 2017.
- HE, Y. *et al.* The hMLH1 promoter polymorphisms and cancer susceptibility in Asian populations: A meta-analysis. **Gene**, [s.l.], v.523, p.199-204, 2013.
- HOOI, J.K.Y. *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 153, p. 420-429, 2017.
- HSIEH, P.; YAMANEDNA, K. Mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing Mech Ageing. **Gastro. Dis.: Patho., Diag., Manag.**, [s.l.], v.129, p.391–407, 2008.
- HSIEH, W.C., *et al.* Genetic polymorphisms in APE1 Asp148Glu(rs3136820) as a modifier of the background levels of abasic sites in human leukocytes derived from breast cancer patients and controls. **Breast Cancer**, [s.l.], v. 24, n.3, p.420-426, 2017.
- HUANG, J. *et al.* Amino acid substitution polymorphisms of the DNA repair gene MGMT and the susceptibility to cervical carcinoma. **Carcinogenesis**. [s.l.], v. 28, n. 6, p. 1314–1322, 2007.
- IARC. World Health Organization. **Age-Standardized Rate**. [s.l.]. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/today/help>>. Acesso em: 24 maio 2019
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.
- KALISPERATI, P. *et al.* Inflammation, DNA Damage, *Helicobacter pylori* and Gastric Tumorigenesis. **Front. Genet.**, [s.l.], v.27, p.8-20, 2017.
- KAMANGAR, F. *et al.* Interleukin-1B Polymorphisms and Gastric Cancer Risk-A Meta-analysis. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, [s.l.], v. 15, n. 10, 2006.
- KAO, C.Y.; SHEU, B.S.; WU, J.J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomed. J.**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 14-23, 2016.
- KARKI, R.; PANDYA, D.; ELSTON, R.C.; FERLINI, C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, [s.l.], v.8, p.37, 2015.

KAWANISHI, S.; OHNISHI, S.; MA, N.; HIRAKU, Y.; MURATA, M. Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. **Int. J. Mol. Sci.**, [s.l.], v.18, p.1808, 2017.

KAYAÇETIN, S; GÜREŞÇİ, S. What is gastritis? What is gastropathy? How is it classified? **Turk. J. Gastroenterol.**, [s.l.], v.25, p.233-247, 2014.

KHALIFEHGHOLI, M. *et al.* Comparison of five diagnostic methods for *Helicobacter pylori*. **Iran. J. Microbiol.**, [s.l.], v.5, n.4, p.396-401, 2013.

KIM, J.Y. *et al.* Cytokine expression associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinogenesis. **APMIS**, [s.l.], v. 125, p. 808-815, 2017.

KRUPA, R., SYNOWIEC, E., PAWLOWSKA, E., MORAWIEC, Z., SOBCZUK, A., ZADROZNY, M., WOZNIAK, K., BLASIAK, J. Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. **Exp. Mol. Pathol.**, [s.l.], v.87, n.1, p.32-35, 2009.

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.**, [s.l.], v.64, p.31-49, 1965.

LEE, S-G.; KIM, B.; CHOI, J.; KIM, C.; LEE, I.; SONGF, K. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. **Cancer Letters**, v.187, p.53–60, 2002.

LEE J.Y.; KIM, N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. **Ann. Transl. Med.**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.10, 2015.

LI, S. *et al.* Pooling-analysis on hMLH1 polymorphisms and cancer risk: evidence based on 31,484 cancer cases and 45,494 cancer-free controls. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 54, p. 93063-93078, 2017.

LIMA, V.P. *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. **Cancer Epidemiol.**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.32-37, 2011.

LIN, H.J. *et al.* *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *vacA* genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. **World. J. Gastroenterol.**, [s.l.], v. 10, p. 2493-2497, 2004.

LING, X., ZHANG, H., SHEN, C., YAN, W., WANG, P., FENG, J., PENG, Z., PENG, G., CHEN, W., FANG, D. H. *pylori* infection is related to mitochondrial microsatellite instability in gastric carcinogenesis. **Infec. Age. Cancer**, [s.l.], v.11, p.30, 2016.

LIU, L.; ZHUANG, W.; WANG, C.; CHEN, Z.; WU, X.T.; ZHOU, Y. Interleukin -8 -251 a/t gene polymorphism and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis of epidemiological studies. **Cytokine**, [s.l.], v.50, p.328-334, 2010.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth Factor Rev.**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 189–195, 2011.

- MA, J. *et al.* Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. **Oncol Lett.**, [s.l.], v.11, n.5, p.2959–2964, 2016.
- MALIK, T.H. *et al.* Gastric Intestinal Metaplasia: An Intermediate Precancerous Lesion in the Cascade of Gastric Carcinogenesis. **J. Coll. Physicians. Surg. Pak.**, [s.l.], v.27, n. 3, p. 166-172, 2017.
- MALYAK, M. *et al.* Characterization of a Low Molecular Weight Isoform of IL-1 Receptor Antagonist. **J. Immunol. August.**, [s.l.], v. 15, n. 161, 1997-2003, 1998.
- MANTA, F.S.N. *et al.* Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **Plos One**, [s.l.], v.8, n.9, e75145, 2013.
- MARCH, C.J. *et al.* Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. **Nature**, [s.l.], v. 20, n. 315, p. 641-647, 1985.
- MARSHALL, B.J. *et al.* Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. **Med J Aust.**, v. 15, n. 142, p.436-439, 1985.
- MOYAT, M; VELIN, D. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. **World J Gastroenterol.**, [s.l.], v.20, n.19, p.5583-5593, 2014.
- MONTERO-OLEAS, SN-G; DANIEL S-R. The remarkable geographical pattern of gastric cancer mortality in Ecuador Nadia. **Cancer Epidemiol.**, [s.l.] v.51, p.92-97, 2017.
- MORRIS, A.; NICHOLSON, G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. **Am. J. Gastroenterol.**, [s.l.], v.82, n.3, p.192-199, 1987.
- MORRIS, A.J. *et al.* Long-Term Follow-up of Voluntary Ingestion of *Helicobacter pylori*. **Ann. Intern. Med.**, [s.l.], v.15, n.114, p.662-663, 1991.
- MURATA, M. *et al.* Role of Nitrate and Oxidative DNA Damage in Inflammation-Related Carcinogenesis. **J. Biomed. Biotechnol.** [s.l.], doi: 10.1155/2012/623019, 2012.
- NAKAGAWA, H; *et al.* Significant Association between Serum Interleukin-6 and *Helicobacter pylori* Antibody Levels among *H. pylori*-Positive Japanese Adults. **Med. Inflamm.**, [s.l.], 142358, 2013.
- NCBI – National Center of Biotechnology Information. **Genes**, [s.l.], Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 24 maio 2019
- NURGALIEVA, Z. Z. *et al.* B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. **Infect. Immun.**, [s.l.], v.73, p.2999–3006, 2005.
- OHNISHI, N. *et al.* Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. **Proc. Natnl. Acad. Sci.**, [s.l.], v.105, p. 1003-1008, 2008.
- PAJARES, J M; GILBERT, J.P. *Helicobacter pylori*: su descubrimiento e importancia en la medicina. **Rev. Esp. Enferm. Diag.**, [s.l.], v.98, n.10, 2006.

- PALLI, D. *et al.* Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric. **Mutagenesis.**, [s.l.], v.25, n.6, p.569-575, 2010.
- PASCUAL, M.G-C.; IZAQUIRRE, L.C. Helicobacter pylori y dispepsia, un problema de salud comunitaria. **Rev. Cubana. Med. Gen. Integ.**, [s.l.], v.18, n.3, 2002.
- PENA, S.D.J. *et al.* The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **Plos One**, [s.l.], v.6, n.2, e17063, 2011.
- PIGOSSIA, S.C. *et al.* Functionality of the Interleukin 8 haplotypes in lymphocytes and macrophages in response to gram-negative periodontopathogens. **Gene**, [s.l.], v.689, p.152–160, 2019.
- POHJANEN, V-M. *et al.* Role of *Helicobacter pylori* and interleukin 6-174 gene polymorphism in dyslipidemia: a case–control study. **BMJ**, [s.l.], v.6, n.1, 2016.
- PUTTHANACHOTE, N. *et al.* The XRCC1 DNA repair gene modifies the environmental risk of stomach cancer: a hospital-based matched case-control study. **BMC Cancer**, [s.l.], v.17, p.680, 2017.
- QUEIROZ, D.M., *et al.* Immune Response and Gene Polymorphism Profiles in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis, **Inflamm. Bowel Dis.**, [s.l.], v.5, n.3, p.353-358, 2009.
- RAD, R.. *et al.* Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during Helicobacter pylori infection. **Gut**, [s.l.], v.53, n.8, p.1082-1089, 2004.
- RIBEIRO, I.C.S. *et al.* Relação entre a presença do Helicobacter Pylori com alterações endoscópicas inflamatórias na mucosa gastroduodenal. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.142-145, 2016.
- ROESLER, B.M.; RABELO-GONÇALVES, E.; ZEITUNE, J.M.R. Virulence Factors of Helicobacter pylori: A Review. **Clin. Med. Ind.: Gastroenterology**, [s.l.], v.7, 2014.
- SHAHID KHAN, A.K.; SHAHERYAR, I.Q.B.A.L. Helicobacter urease: Niche construction at the single molecule level. **J. Biosci.**, [s.l.], v.34, n.4, p.503-51, 2009.
- ROJAS, M.A.B. Condiciones microbiológicas para el cultivo de Helicobacter pylori. **Rev. Col. Gastroenterol.**, [s.l.], v.28, n.2, 2013.
- RUSSO, R. C. *et al.* The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Rev. Clin. Immunol.**, [s.l.], v.10, p.593-619, 2014.
- SAMPAIO, A.M. *et al.* Association Between IL-4 and IL-6 Expression Variants and Gastric Cancer Among Portuguese Population. **GE. Port. J. Gastroenterol.**, [s.l.] v.22, n.4, p.143-152, 2015.
- SANTA-GONZALEZ, C. DNA repair after oxidative stress: Current challenges Bennett Van Houten, Gloria A. **Curr. Op. Tox.**, [s.l.], v.7, p.9, 2018.

SANTOS, J.C.; LADEIRA, M.S.P.; PEDRAZZOLI JR. J.; RIBE, M.L. Relationship of IL-1 and TNF- α polymorphisms with *Helicobacter pylori* in gastric diseases in a Brazilian population. **B. J. Med. Biol. Res.**, [s.l.], v.45, p.811-817, 2012.

SANTOS, J.C.; RIBEIRO, M.L. Epigenetic regulation of DNA repair machinery in *Helicobacter pylori* -induced gastric carcinogenesis. **World. J. Gastroenterol.**, [s.l.], v.14, n.30, p.9021-9037, 2015.

SHEN, M. *et al.* Polymorphisms of the DNA Repair Genes XRCC1, XRCC3, XPD, Interaction with Environmental Exposures, and Bladder Cancer Risk in a Case-Control Study in Northern Italy. **Cancer. Epid., Bio. Prev.**, [s.l.], v.12, p.1234-1240, 2003.

SHEN, M. *et al.* Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. **Haematologica**, [s.l.], v.92, p.1180-1185, 2007.

SILVA, F.M. Dispepsia: caracterização e abordagem. Dispepsia: caracterização e abordagem. **Rev. Med.**, [s.l.], v.87, n.4, p.213-223, 2008.

SIPPONEN, P.; PRICE, A.B. Review: The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago_6536 31. **J. Gastro. Hep.**, [s.l.], 26Suppl. v.1, p.31-34, 2011.

SOBALA, G. M., *et al.* Axon. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. **Gut**, [s.l.], v.32, p.1415-1418, 1991.

SOZZI, M.; TOMASINI, M.L.; VINDIGNI, C.; ZANUSSI, S.; TEDESCHI, R.; BASAGLIA, G. *et al.* Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. **J. Lab. and Clin. Med.**, [s.l.], v.146, p.262-70, 2005.

SU, Y.L. *et al.* The C-terminal disulfide bonds of *Helicobacter pylori* GroES are critical for IL-8 secretion via the TLR4-dependent pathway in gastric epithelial cells. **J. Immunol.**, [s.l.], v.15, n.8, p.3997-4007, 2015.

SUN, X. *et al.* Association between IL-1 β polymorphisms and gastritis risk: A meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, [s.l.], v.96, n.5, e6001, 2017.

SUNG, J.K. Diagnosis and management of gastric dysplasia. **KJIM**, [s.l.], v.31, n.2, 2016.

SZKARADKIEWICZ, A. *et al.* Expression of *cagA*, *virB/DC* complex and/ or *vacA* Genes in *Helicobacter pylori* Strains Originating from Patients with Gastric Diseases. **Plos One**, [s.l.] v.11, 2016.

SZOKEA, D. *et al.* T-251A polymorphism of IL-8 relating to the development of histological gastritis and G-308A polymorphism of TNF- α relating to the development of macroscopic erosion. **Europ. J. Gast. Hep.**, [s.l.], v.20, n.3, 2008.

TABORDA, A.G.; PROLLA, J.C. Alimentary factors in the development of gastric intestinal metaplasia in functional dyspeptic patients. **Arq. Gastroenterol.**, [s.l.], v.49, n.3, 2012.

TAHARA, T. *et al.* Association between Genetic Polymorphisms Related to DNA Repair or Xenobiotic Pathways and Gastric Premalignant Conditions. **Anticancer Res.**, [s.l.], v.31, p.1459-1466, 2011.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.**, [s.l.], v.6, n.10, a016295, 2014.

UPADHYAY, R.; JAIN, M.; KUMAR, S.; GHOSHAL, U.C.; MITTAL, B. Potential influence of interleukin-1 haplotype IL-1 beta-511*T-IL-1RN*1 in conferring low risk to middle third location of esophageal cancer: a case-control study. **Hum. Immunol.**, [s.l.], v.69, n.3, p.179-86, 2008.

VALENZUELA, J. Helicobacter pylori: la revolucion bacteriologica. **Rev. Med. Chil.**, [s.l.], v.127, n.8, 1999.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citokines: a review. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, [s.l.], v.24, n.4, p.146-154, 2001.

VARON, A.R. Infeccion por Helicobacter pylori. Asociaciones causales y causuales. **Rev. Col. Gastroenterol.**, [s.l.], v.29, n.3, 2014.

WANG, J.; HE, W.; LIU, J.; NONG, L.; WEI, Y.; YANG, F. Association of IL-6 polymorphisms with gastric cancer risk: evidences from a meta-analysis. **Cytokine**. v.59, n.1, p.176-83, 2012.

WANG, C. *et al.* Oxidative stress-related DNA damage and homologous recombination repairing induced by N,N-dimethylformamide. **J. Appl. Toxicol.**, [s.l.], v.36, n.7, p.936-45, 2016.

WASSERMANN, G.E. *et al.* Helicobacter pylori urease activates blood platelets through a lipoxigenase-mediated pathway. **Cell. Mol. Med.**, [s.l.], v.14, n.7, p.2025-2034, 2010.

WAUGHAND, D.J.J.; WILSON, C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. **Clin. Cancer Res.**, [s.l.], v.14, n.2, 2008.

WEI, Y.S.; LAN, Y.; TANG, R.G.; XU, Q.Q.; HUANG, Y.; NONG, H.B.; HUANG, W.T. Single nucleotide polymorphism and haplotype association of the interleukin-8 gene with nasopharyngeal carcinoma. **Clin. Immunol.**, [s.l.], v.125, n.3, p.309-317, 2007.

WELEDJI, E.P.; OROCK, G.W.; NGOWE, M.N. Intestinal metaplasia and anastomotic recurrence of gastric carcinoma. **Gastrointest. Oncol.**, [s.l.], v.5, n.6, p.474-480, 2014.

WOO, P.; HUMPHRIES, S.E. IL-6 Polymorphisms: A Useful Genetic Tool For Inflammation Research? **J. Clin. Inv.**, [s.l.], v.123, n.4, 2013.

XUE, H. *et al.* Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: A meta-analysis. **J. Gastro. Hep.**, [s.l.], v.25, p.1604-1617, 2001.

YIN, H.; ZHANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; HE, J.; YANG, T.; HONG, X.; YANG, Q.; GONG, Z. Epigenetic regulation, somatic homologous recombination, and abscisic acid

signaling are influenced by DNA polymerase epsilon mutation in Arabidopsis. **Plant. Cell.** , [s.l.], v.21, p.386-402, 2009.

ZHANG, W.; CHEN, H. The study on the interleukin-8 (IL-8). **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.**, [s.l.], v.19, n.4, p.697-702, 2002.

ZHANG, X-Y.; ZHANG, P-Y.; ABOULD-SOUD, M.A.M. From inflammation to gastric cancer: Role of Helicobacter pylori. **Oncol. Lett.**, [s.l.], v.13, n.2, p.543-548, 2017.

ZHAO, L. *et al.* Genetic polymorphism of XRCC3 codon 241 and Helicobacter pylori infection-related gastric antrum adenocarcinoma in Guangxi Population, China: A hospital-based case-control study. **Cancer Epidem.**, [s.l.], v.35, p.564-568, 2011.

ZHU, W.; LIU, Y.; GUO, W.; ZHANG, M.; ZHANG, Y. Rome III Criteria Cannot Distinguish Patients with Chronic Gastritis from Those Functional Dyspepsia Patients. **Helicobacter**, [s.l.], v.19, p.124-128, 2014.

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFC.



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 220/12

Fortaleza, 05 de julho de 2012.

Protocolo COMEPE nº 326/11

Pesquisador responsável: Sílvia Helena Barem Rabenhorst.

Título do Projeto: "Estudo de suscetibilidade genética, caracterização de fatores etiológicos e identificação de marcadores com aplicabilidade para prevenção e prognóstico".

Levamos ao conhecimento de V.Sª, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 04 de julho de 2012.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,


Sílvia Helena Barem Rabenhorst
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO II - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HGF.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF

Fortaleza, 24 de abril de 2013.

Ilma. Sra. comunicamos-lhe o parecer do CEP

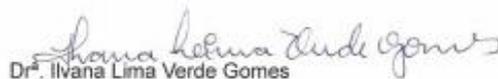
Pesquisadora: Silvia Helena Barem Rabenhorst
Projeto Intitulado: Polimorfismo de interleucinas e enzimas do sistema de reparo ao estresse oxidativo no câncer gástrico: associado com helicobacter pylori
Protocolo do CEP: 071002/10

Parecer:

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

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

Atenciosamente,


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

ANEXO III - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO ICC.

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre cepas de *Helicobacter pylori* e polimorfismos em genes associados a resposta inflamatória e ao sistema de reparo do DNA em lesões gástricas

Pesquisador: Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51324415.1.3001.5528

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.397.331

Apresentação do Projeto:

Os distúrbios gástricos são frequentes na população mundial e apresentam uma diversidade de danos tissulares cuja evolução pode culminar no câncer gástrico. Diversos são os fatores associados a progressão das lesões gástricas, incluindo os fatores do ambiente e do hospedeiro. Dentre os fatores ambientais, a bactéria *H. pylori* é destacada, sendo considerada, pela IARC, um carcinógeno tipo I. No entanto, muitos indivíduos possuem a bactéria sem desenvolver lesões agressivas, sugerindo a importante participação do hospedeiro neste processo. Os polimorfismos genéticos explicam porque pessoas diferentes tem respostas distintas a um mesmo patógeno. Polimorfismos em genes de citocinas podem levar a um aumento ou diminuição de seus níveis de expressão que, por sua vez, interferem na resposta imunológica contra o bactéria e contribuem com o dano tecidual. Neste cenário inflamatório diversas espécies reativas

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.397.531

Outros	DEPOSITARIO.pdf	12:05:03	Oliveira Barboza	Aceito
Outros	PARECER.pdf	05/11/2015 12:03:43	Morgana Maria de Oliveira Barboza	Aceito
Outros	APRESENTACAO.pdf	05/11/2015 12:00:55	Morgana Maria de Oliveira Barboza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PESQUISADORES.pdf	05/11/2015 11:58:17	Morgana Maria de Oliveira Barboza	Aceito
Folha de Rosto	FR.pdf	05/11/2015 11:56:29	Morgana Maria de Oliveira Barboza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 28 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

ANEXO IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA AS AMOSTRAS DE CÂNCER GÁSTRICO

Você está sendo convidado pela Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst a participar como voluntário de uma pesquisa. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos as etapas desta pesquisa sejam devidamente esclarecidas. A pesquisa intitulada Estudo de suscetibilidade genética, caracterização de fatores etiológicos e identificação de marcadores com aplicabilidade para a prevenção e prognóstico está sendo realizada pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo em questão pretende analisar características genéticas do paciente e alguns hábitos que podem levar ao desenvolvimento do câncer gástrico, nos ajudando a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria chamada *H.pylori* e de um vírus chamado EBV. Estes microorganismos serão identificados por meio da presença do material genético destes agentes infectantes no tumor. Serão também observadas as alterações genéticas das células tumorais. Essas alterações serão vistas pela expressão de proteínas ou pela análise do DNA/RNA do tumor. Participarão deste estudo 200 pacientes atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídeo. Portanto, concordando em participar, você será um dos pacientes participantes que permitem a coleta do material tumoral do estômago além de uma amostra de sangue necessários para o estudo. Esta coleta não irá afetar o diagnóstico da sua doença ou o tratamento. Paralelamente, serão anotadas algumas questões referentes a seus dados pessoais, como data de nascimento, hábitos de vida e em relação à sua doença. Estas informações serão retiradas do seu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a você. Sua participação não terá benefício direto imediato, em princípio, mas que poderá contribuir para que se entenda melhor os fatores de risco e alterações que propiciem o aparecimento do câncer gástrico. A identificação dos fatores de risco para o câncer gástrico servirá para direcionar medidas preventivas. Por outro lado, as alterações genéticas encontradas no material coletado auxiliarão no diagnóstico, na avaliação da gravidade da doença e também podem dar informações para novos tratamentos que estão sendo desenvolvidos. Todos os dados da sua participação neste estudo serão documentados e mantidos em sigilo, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao seu prontuário. Como sua participação é voluntária, você poderá abandonar o estudo a qualquer momento, sem que

isso resulte em qualquer penalidade ou perda de seus direitos onde você recebe atendimento médico.

Endereço da responsável pela pesquisa: Nome: Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst
Instituição: Universidade federal do Ceará. Endereço: Rua: Marcos Macedo, 1301, Apto 802.
Telefone: 3366-8639/9994-5689

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de ética em pesquisa da UFC - Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo 3366-8344.

Eu, _____, _____ anos, RG: _____, declaro que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. Declaro ainda estar recendo uma cópia

assinado deste termo.

Fortaleza, ___/___/___

Nome do Voluntário _____ Data ___/___/___

Assinatura _____

Nome do Pesquisador _____ Data ___/___/___

Assinatura _____

Nome da testemunha _____ Data ___/___/___

Assinatura _____

(se o voluntário não souber ler)

Nome do profissional que aplicou o TCLE _____

Data ___/___/___

Assinatura _____

ANEXO V - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA AS AMOSTRAS DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Endereço: R. Coronel Nunes de Melo, 1315, Porangabaçu

Investigadora Responsável: Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Título: "Associação entre cepas de *Helicobacter pylori* e polimorfismos em genes associados a resposta inflamatória e ao sistema de reparo do DNA em lesões gástricas"

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa sob a responsabilidade da Prof. Dr^a Sílvia Helena Barem Rabenhorst. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Eu, _____,

por este meio, fui informado (a) em detalhes sobre o estudo intitulado: "Associação entre cepas de *Helicobacter pylori* e polimorfismos em genes associados a resposta inflamatória e ao sistema de reparo do DNA em lesões gástricas". O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Este estudo tem como objetivo associar os fatores de risco para as doenças gástricas, como os genéticos (que são as características herdadas dos nossos pais) e ambientais (como a presença da bactéria *H. pylori*). A detecção da bactéria será verificada pela presença do material genético desta. As variações do meu material genético serão realizadas extraindo o DNA do material coletado durante o procedimento médico e serão utilizadas técnicas específicas de análises de DNA. Os materiais utilizados para estas análises serão provenientes da endoscopia e da coleta do sangue realizadas durante o procedimento feito pelo médico, sem interferir no exame e no resultado do mesmo.

Concordando em participar do estudo permitirei a coleta de material da endoscopia e de 3ml. de sangue, bem como permitirei o uso de todo material gerado a partir desta coleta, como material histopatológico (blocos e lâminas). As amostras da endoscopia serão coletadas durante o procedimento realizado pelo médico. Os riscos de complicações são aqueles existentes em procedimentos minimamente invasivos, raramente podem incluir sangramento e infecção. Os riscos associados com a coleta de sangue são os usuais de uma coleta de sangue laboratorial e incluem: dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecção no local da punção podem ocorrer. Todos os cuidados serão tomados para minimizar estes riscos. Não haverá mudança ou perdas em relação à análise pelo patologista do meu material. Paralelamente, serão coletadas informações referentes à minha pessoa, através de consulta ao prontuário ou, na ausência deles, serão perguntadas pessoalmente a mim. Estas informações dizem respeito a dados pessoais como a data de nascimento e hábitos de vida (como alimentação, consumo de bebida alcoólica, cigarros) e também em relação à minha

doença, no que se refere aos sintomas e quando começa. Todas as informações serão mantidas sob sigilo e utilizadas, única e exclusivamente, com finalidade científica. 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. Meu anonimato está assegurado.

Como benefício terei no meu prontuário os dados relativos a presença da *H. pylori* de modo mais confiável. Quanto a investigação do meu material genético, a princípio, minha participação não terá benefício direto imediato, mas poderá estar contribuindo para que se entenda melhor a relação entre a bactéria e as variações genéticas nos indivíduos que possam contribuir para o desenvolvimento das doenças gástricas e servirá para direcionar medidas preventivas e de tratamento.

Pela participação na pesquisa, não receberei nenhum pagamento, assim como não haverá prejuízo alguma caso eu não queira participar. 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. Sílvia Helena Rabenhorst no telefone 3288 8206 ou 9994 5689 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará no telefone 3366.8344 localizado à Rua Coronel Nunes de Melo, 1000.

Assinatura do paciente: _____

Endereço do paciente: _____

Telefone: _____ Data: ____ / ____ / ____

Nome da testemunha _____

Assinatura da testemunha: _____

Assinatura do investigador: _____

ANEXO VI – FICHA DE COLETA CÂNCER GÁSTRICO

Código CG: _____ Data ____/____/____

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

Depto Responsável _____ Hospital _____

Nome _____ Sexo F [] M []

Endereço _____

Contato _____ Naturalidade _____ Procedência _____

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

Grau de instrução _____ Profissão _____

História familiar:

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

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

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

[] Álcool Tipo _____ Freqüência _____

Dados relativos à neoplasia.

Data do primeiro diagnóstico ____/____/____ Exame _____

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 VII – FICHA DE COLETA DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS

CADASTRO DE PACIENTES SUBMETIDOS À ENDOSCOPIA

Data ____/____/____ N° Prontuário _____

Código

			-			
--	--	--	---	--	--	--

Local da coleta _____

I – IDENTIFICAÇÃO

Nome _____ Sexo F [] M []

Mãe _____

Endereço _____ Tel _____

Naturalidade _____

_____ Procedência _____ Ascendência _____

Cor: [] caucasiano [] negro [] asiático [] pardo [] mulato

Idade _____ Nasc ____/____/____ ABO _____

Profissão _____ Grau de instrução _____

Peso: _____ Altura: _____

II-HISTÓRIA FAMILIAR:

Familiares com história de distúrbios pépticos _____

Familiares com história de câncer gástrico _____

III-HÁBITOS: [] Sal [] Frutas [] Verduras [] Carne vermelha [] Carne branca

*consumo pelo menos 4 vezes por semana.

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

*tabagismo: 1 carteira e meia por dia. Observações: _____

[] Álcool Tipo _____ (fermentado ou destilado) Frequência _____

IV-DOENÇA ASSOCIADA: _____

V- USO DE MEDICAMENTOS: _____

VI- ENDOSCOPIA ANTERIOR: [] Sim [] Não H. pylori []

Método detecção (endoscopia/citologia/histologia): _____

Diagnóstico: _____

Tratamento: _____

Biópsia: N° _____ data ____/____/____ Laudo _____

VII-DADOS RELATIVOS À LESÃO ATUAL

Motivo da endoscopia (sintomas) _____

Teste de urease []

VIII-LAUDO ENDOSCÓPICO

Médico _____

Tipo de lesão: _____

Sítio anatômico: _____

Conclusão: _____

XV-LAUDO HISTOPATOLÓGICO

X- COLETA: N° de amostra []

Sítio de coleta 1 (DNA): [] Corpo [] Antro [] Outro: _____ N° de fragmentos []

Observação: _____

Sítio de coleta 2 (RNA): [] Corpo [] Antro [] Outro: _____ N° de fragmentos []

Observação: _____

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

Local Armazenamento: _____

Biópsia [] _____

Responsável pela Coleta: _____

