

Aledson Vitor Felipe

**O POLIMORFISMO -251 A/T NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
INTERLEUCINA 8 E O RISCO DE CÂNCER GÁSTRICO:
ESTUDO CASOCONTROLE**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aledson Vitor Felipe

**O POLIMORFISMO -251 A/T NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
INTERLEUCINA 8 E O RISCO DE CÂNCER GÁSTRICO:
ESTUDO CASOCONTROLE**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Orientadora: Prof^a. Dra. Nora Manoukian Forones

São Paulo

2010

Felipe, Aledson Vitor

O polimorfismo -251 A/T na região promotora do gene da interleucina 8 e o risco de câncer gástrico: estudo caso-controle.

/Aledson Vitor Felipe - São Paulo, 2010.

xiii, 49f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Gastroenterologia – Ciências

Título em inglês: The polymorphism -251 A/T in the promoter region of the interleukin 8 gene and the risk of gastric cancer: case-control study.

1. Polimorfismos, 2. Interleucina-8, 3. Câncer Gástrico

iii

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Departamento de Medicina

Disciplina de Gastroenterologia

Chefe da Disciplina de Gastroenterologia:

Prof. Dr. Antonio Eduardo Benedito Silva

Chefe do Departamento de Medicina:

Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paolo

Coordenador do Programa de Pós-Graduação:

Prof^a. Dra. Maria Lucia Gomes Ferraz

iv

Aledson Vitor Felipe

**O POLIMORFISMO -251 A/T NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
INTERLEUCINA 8 E O RISCO DE CÂNCER GÁSTRICO: ESTUDO CASOCONTROLE**

Presidente da Banca: Prof^a. Dr^a. Nora Manoukian Forones

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Cledja Amorim Soares

Prof. Dr. Paulo Kassab

Prof. Dr. Renato Duffles Martins

Suplente:

Profa. Dra. Andrea Aparecida de Fátima Souza Moraes

Aprovado em: 17/05/2010 conforme anexo 1

v

**Estudo realizado no Laboratório de
Gastro-oncologia Molecular da
Disciplina de Gastroenterologia da
Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina.
Auxílio Financeiro da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo – FAPESP nº 08/05763**

vi

Dedicatória

Aos meus pais, Edson (*in memorian*) e Aldenora, que com amor fizeram de mim quem sou hoje. Sei que herdei de vocês qualidades preciosas.

A minha adorada esposa, Juliana de Oliveira, que me ensinou as prioridades na vida e por me fortalecer a cada dia. A você minha gratidão e eterno amor.

Aos meus irmãos, Adriano Vitor de Oliveira e Anderson Felipe Antonio, pela compreensão às minhas ausências em diversas reuniões fraternais

Aos meus sogros Adilson de Oliveira e Eliana Ladeira de Oliveira, por acreditarem em meu potencial e pelo incentivo oferecido.

A TODOS MEU ETERNO AMOR

É mais fácil obter o que se deseja com um sorriso do que à ponta da espada.

William Shakespeare

vii

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Nora Manoukian Forones, minha eterna gratidão por aceitar a difícil tarefa de orientar-me neste trabalho e contribuir decisivamente com a qualidade do mesmo.

Aos professores Dr. Paulo Kassab e Dr. Carlos Alberto Malheiros da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com quem partilhamos diversos interesses comuns, entre os quais a temática de estudo que abrange a Gastroenterologia, nossos afetivos agradecimentos por suas participações, o que com certeza contribuirá para ampliar a qualidade desta tese.

Ao Tiago Donizetti da Silva pela forma como me tem ajudado nestes últimos anos do curso e na realização desta dissertação.

Ao Laboratório de Gastro-Oncologia Molecular, por ter sido minha segunda casa, onde aprendi técnicas essenciais e agora meu mais novo local de trabalho onde pretendo permanecer por muitos anos.

A todos os dirigentes que gentilmente me receberam, também deixo aqui meus agradecimentos. Dentre eles, gostaria de fazer especial menção ao Prof. Dr. Antonio Eduardo Benedito Silva (Chefe da Disciplina de Gastroenterologia), igualmente ao Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paolo (Chefe do Departamento de Medicina), do mesmo modo à Prof^a. Dra. Maria Lucia Gomes Ferraz (Coordenadora do Programa de Pós-Graduação).

Aos colegas e alunos de pós-graduação do Laboratório de Gastro-oncologia Molecular: Célia Aparecida Marques Pimenta, Gisele Vieira, Jacqueline Miranda de Lima e Kátia Barão pela contribuição de suma importância na realização deste trabalho

À Disciplina de Gastroenterologia, pela oportunidade de aprender e almejar o título de Mestre.

Aos pacientes com e sem câncer que participaram deste estudo. Sem a paciência e generosidade de vocês não conseguiríamos realizar este estudo.

A TODOS, MINHA ETERNA GRATIDÃO

viii

Sumário

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
SUMÁRIO	viii
LISTAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Epidemiologia	4
2.2 Classificações do câncer gástrico	4
2.3 Microbiologia do <i>H. pylori</i> e resposta Inflamatória mediada pela IL-8	7
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	11
3.1 Casuística	11
3.2 Método	11
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÕES	30
7. ANEXOS	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
9. ABSTRACT	49
ix	

Lista de Figuras

Figura 1. Carcinogênese mediada pela infecção por <i>H pylori</i> em função das vertentes: Idade e acidez. Correa & Houghton, 2007	8
Figura 2. Estrutura tridimensional da IL-8. Clore <i>et. al.</i> ,1990.	9
Figura 3. Ativação do NF-κB pelo <i>H. pylori</i> através dos LPS presentes em sua membrana e via CagA estimulando as respostas inflamatória e humoral.	10
Figura 4. Extração do DNA genômico de alguns pacientes do grupo câncer	17
Figura 5. Possíveis genótipos: homozigoto TT demonstra uma única banda com 108pb; homozigoto AA possui duas bandas sendo de 76 e 32pb; e heterozigoto AT, três bandas de 108, 76 e 32 pb	18
Figura 6. Frequência genotípica de alguns pacientes do grupo controle	18

x

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sexo dos pacientes com câncer gástrico e controle	16
Tabela 2. Média de Idade dos pacientes com câncer gástrico e controle	16
Tabela 3. Idade dos pacientes com câncer gástrico e controle, conforme o sexo	17
Tabela 4. Perfil sorológico para <i>H. pylori</i> nos pacientes com câncer gástrico e controle	17
Tabela 5. Genótipos e frequência alélica nos pacientes com câncer gástrico e controle	19
Tabela 6. Análise do equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> e teste do qui-quadrado ao polimorfismo da IL-8.	19
Tabela 7. Polimorfismo da IL-8 nos pacientes com câncer gástrico e controles na infecção por <i>H. pylori</i> .	20
Tabela 8. Genótipos AA, AT e TT nos pacientes com câncer gástrico e controle na infecção por <i>H. pylori</i>	20
Tabela 9. Análise conjugada dos genótipos da IL-8 nos pacientes com câncer gástrico e controles infectados por <i>H.pylori</i>	21
Tabela 10. Análise conjugada dos genótipos da IL-8 nos pacientes com câncer gástrico e controles não infectados por <i>H.pylori</i>	21
Tabela 11. Hábitos alimentares, etilismo e tabagismo dos pacientes com CG e controles	22
Tabela 12. Polimorfismo da IL-8 nos pacientes com CG e controle no tabagismo	23
Tabela 13. Polimorfismo da IL-8 nos pacientes com CG e controle em não tabagistas	23
Tabela 14. Regressão logística multivariada para tabagismo, genótipos heterozigoto e homozigoto mutado; fumante; ex-fumante; consumo de verduras e gordura	24

Lista de Abreviaturas e Símbolos

(NF)-κB Fator Nuclear Kappa B

® Marca Registrada

A Adenina

ACS *American Cancer Society* (Sociedade Americana de Câncer)

AJCC *American Joint Committee on Cancer*

Cag-A citotoxina associada ao antígeno A

cag-PAI Ilha de Patogenicidade cag

CG Câncer Gástrico

DNA *Deoxyribose Nucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

EBV Vírus Epstein-Barr

EDTA ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

HBV Vírus da Hepatite B

HCV Vírus da Hepatite C

HHV-8 Herpes Vírus Humano tipo 8

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV Papilomavírus humano

HSP60 heat-shock protein de 60kDa

IL-8 Interleucina-8

INCA Instituto Nacional do Câncer

JGCA Japanese Gastric Cancer Associations

LPS Lipopolissacarídeo

MyD88 Fator de Diferenciação Mielóide 88

NCI *National Cancer Institute*

OR razão de risco

PCR-RFLP *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*

QFCA Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos

RNA Ácido Ribonucléico

SNPs Polimorfismos de Único Nucleotídeo

T Timina

T4SS Sistema de Secreção do Tipo 4

TNM Tumor, Nódulo e Metástase

TRAF6 Receptor associado ao Fator 6

TRL-4 toll-like receptor 4

UICC União Internacional Contra Câncer

UNIFESP Universidade Federal de São Paulo

vs Versos (comparação ou confronto)

µg Micrograma ou (0,001mg)

µL Microlitro ou (0,001mL)

X

²

Teste Qui-quadrado

xii

Lista de Anexos

Anexo 1. Ata de reunião da comissão julgadora da defesa de tese de mestrado	31
Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM	33
Anexo 3. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de misericórdia de São Paulo	35
Anexo 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes	36
Anexo 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos do grupo controle	38
Anexo 6. Grupo câncer contendo: idade, sexo, genótipo e sorologia p/ <i>H. pylori</i>	40
Anexo 7. Grupo controle contendo: idade, sexo, genótipo e sorologia p/ <i>H. pylori</i>	41

xiii

RESUMO

Introdução: A infecção por *Helicobacter pylori* está associada ao câncer gástrico (CG) não localizado na região da cárdia, no entanto, apenas uma pequena proporção das pessoas infectadas desenvolvem esta neoplasia. Estudos sobre cepas específicas dessa bactéria demonstram que os fatores genéticos e ambientais estão associados a esta carcinogênese. A Interleucina-8 (IL-8) desempenha um papel importante na inflamação da mucosa do estômago após a infecção por *H. pylori*. Estudos têm demonstrado que o polimorfismo da IL-8 pode aumentar o risco de CG.

Objetivo: Investigar a associação entre o polimorfismo da IL-8, infecção por *H. pylori*, hábitos de vida e risco de CG. **Casuística e métodos:** Estudo caso-controle feito em pacientes com CG não-cárdia em comparação com indivíduos saudáveis na proporção de 1:2, respectivamente. O DNA foi extraído de leucócitos, purificado e a análise do polimorfismo foi feita pela técnica de PCR-RFLP e visualizado por eletroforese em gel de agarose a 5%. Infecção por *H. pylori* foi investigada pelos níveis séricos de anticorpos anti-*H.pylori*. Aspectos ambientais como tabagismo, etilismo e dieta foram investigados por questionário. **Resultados:** Um total de 312 indivíduos foi estudado, sendo 208 controles e 104 pacientes com câncer. Não houve diferença significativa entre sexo ou idade, entre o grupo controle e os pacientes com CG. A proporção de pacientes infectados pelo *H. pylori* foi semelhante ($p=0,15$) entre os grupos controle (53,8%) e caso (45,2%). Menor frequência do genótipo AA foi encontrada no grupo com câncer ($p = 0,01$), sem diferença entre os alelos A e T. O tabagismo ($p=0,001$), acentuada ingestão de gordura ($p=0,003$) e baixa ingestão de legumes ($p=0,02$), foram mais frequentes no grupo caso. A análise de regressão logística multivariada demonstrou maior risco de CG em indivíduos com o genótipo heterozigoto AT (OR: 2,28 95%IC 1,16-4,49; $p=0,02$) e consumo excessivo de gordura (OR: 1,77 95%IC 1,12-2,92; $p=0,03$). Fumantes e ex-fumantes também demonstraram maior risco de CG quando comparados ao grupo controle (OR: 1,89 95%IC 1,41-3,11; $p=0,01$). **Conclusões:** A presença do genótipo AT está associada à elevação do risco de CG em aproximadamente duas vezes. O percentual de pacientes com CG infectados pelo *H. pylori*, diagnosticado pelos níveis de anticorpos séricos, não foi diferente do grupo controle na população estudada. Não observamos correlação entre a frequência alélica e o risco de CG. Indivíduos que consomem gorduras em excesso, ex-fumantes e fumantes têm maior risco de CG.

PALAVRAS-CHAVES: Polimorfismo, Interleucina-8, Câncer gástrico

1. INTRODUÇÃO

No mundo, a incidência do câncer gástrico (CG) configura-se como a quarta causa mais comum, e em termos de mortalidade, é a segunda causa de óbitos por câncer. Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento e é maior no sexo masculino que no feminino (INCA, 2010).

A alimentação é um quesito importante no aparecimento do CG. Uma dieta pobre em vitaminas A e C (antioxidantes), carnes e peixes, ou ainda um alto consumo de nitrato, alimentos defumados, enlatados, corantes alimentícios ou conservados no sal são fatores de risco para o aparecimento deste tipo de neoplasia. Outros fatores ambientais como a ingestão de água proveniente de poços que contém uma alta concentração de nitrato e a má conservação dos alimentos também estão relacionados com a incidência do CG (Sandor *et. al.*, 2001).

Há também fatores de risco associados a outras doenças, tais como anemia perniciosa, lesões pré-cancerosas como gastrite atrófica e metaplasia intestinal e as infecções gástricas pela bactéria *Helicobacter pylori* apresentam fortes relações com o aparecimento desta neoplasia. No entanto, uma lesão pré-cancerosa leva aproximadamente 20 anos para evoluir à malignidade. Está comprovada que algumas medidas são eficazes para diminuir os riscos, tais como melhorar as condições sanitárias e iniciar uma dieta balanceada precocemente, ainda na infância (Nieburgs & Glass, 1963; Rothenbacher *et. al.*, 1999).

Pessoas fumantes, que ingerem bebidas alcoólicas ou que já tenham sido submetidas a operações no estômago também têm maior probabilidade de desenvolver este câncer (Ito *et. al.*, 2005).

A Interleucina 8 (IL-8) é uma citocina importante na mediação da resposta inflamatória da infecção pelo *H. pylori*, além de atrair fagócitos e causar danos à mucosa gástrica pela liberação de radicais de oxigênio reativo (Torok *et. al.*, 2005; Ohyuchi *et. al.*, 2005).

Os pacientes infectados por *H. pylori*, demonstram diferentes manifestações clínicas que são caracterizadas por cepas específicas e também pelo polimorfismo genético do hospedeiro (Kim *et. al.*, 2009).

Os polimorfismos genéticos, conhecidos como *SNP's* (polimorfismos de único

2

nucleotídeo), são variações genéticas que podem ocorrer em sequências codificadoras e não-codificadoras, levando a alterações qualitativas e/ou quantitativas na síntese das proteínas em questão (Collins *et. al.*, 1998).

Alguns autores descrevem o envolvimento do polimorfismo -251A/T na região promotora do gene da IL-8 com a incidência, prevalência e/ou prognóstico em algumas enfermidades, tais como, na suscetibilidade de infecção por tuberculose (Selvaraj *et. al.*, 2006), síndrome de stress respiratório em neonatos (Capasso *et. al.*, 2007), câncer colorretal (Lee *et. al.*, 2005), asma brônquica, infecções respiratórias virais, câncer de próstata (Puthothu *et. al.*, 2006), e principalmente estudos envolvendo o CG (Shirak *et. al.*, 2006; Kamangare *et. al.*, 2006; Lee *et. al.*, 2005; Taguchi *et. al.*, 2005)

Visto que, o polimorfismo -251A/T na região promotora do gene da IL-8 possui incidência variável em diversas populações, o presente trabalho procurou correlacionar esta variação genética entre pacientes com CG e um grupo controle sem câncer, e assim estabelecer um perfil genotípico com predisposição ao CG na população da

região metropolitana de São Paulo.

3

1.1 OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS:

Correlacionar a presença do polimorfismo –251A/T na região promotora do gene da IL-8 ao risco de CG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar a frequência dos genótipos AA, AT e TT e dos alelos na região promotora do gene da IL-8 (–251A/T), nos grupos CG e controle.
2. Associar o polimorfismo –251A/T na região promotora do gene da IL-8 com a infecção por *H. pylori*.
3. Correlacionar o consumo de carne vermelha, gordura, etilismo, tabagismo e o risco de CG aos genótipos AA, AT e TT.

4

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A incidência do CG estimada para o Brasil para 2010 é de 21.490 de novos casos, sendo 13.810 (64,3%) entre homens e de 7.680 (35,7%) nas mulheres. Estes números equivalem a um risco de 14 casos novos a cada 100 mil homens e 8 para cada 100 mil mulheres. O CG em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (10/100.000) e Nordeste (10/100.000). Na região Centro-Oeste (12/100.000) é o terceiro e nas regiões Sul (19/100.000) e Sudeste (17/100.000), o quarto. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na região Norte (6/100.000) e o quarto na região Nordeste (6/100.000). Nas demais regiões, Sul (10/100.000), Sudeste (9/100.000) e Centro-Oeste (6/100.000), é o quinto (INCA, 2010). Devido a seu mau prognóstico, em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que ocorresse uma mortalidade global de 780 mil mortes por CG, menor apenas que a mortalidade relacionada ao câncer de pulmão. (WHO, 2008)

Nos Estados Unidos da América, a estimativa de novos casos de CG para 2009 é de 21.130 sendo 12.820 homens e 8.310 mulheres; levando a morte 10.620 pessoas sendo 6.320 homens e 4.300 mulheres (ACS, 2009). Um levantamento estatístico relatou que no mundo cerca de 700.000 pessoas morrem por CG ao ano (Matysiak-Budnika *et. al.*, 2006).

Embora a incidência da doença continue a declinar lentamente no Ocidente, o CG foi a segunda causa mais comum de mortes por câncer no mundo, o quinto câncer mais comum e a quarta causa de morte na Europa (Wen *et. al.*, 2008).

Em 2006 existiam cerca de 86.000 novos casos de CG diagnosticados na União Européia (UE). A maior taxa de incidência foi encontrada na Lituânia e a menor na Dinamarca (Ferlay *et. al.*, 2007).

O declínio nas taxas de mortalidade por CG em ambos os sexos em toda a Europa é geralmente atribuído a conservação de alimentos, melhor nutrição e controle da infecção pelo *H. pylori* (Ferlay *et. al.*, 2007).

5

2.2 Classificações do CG

Existem varias classificações para o CG, como a classificação macroscópica de Borrmann que divide o câncer avançado em:

∩ Tipo I: vegetante, protruso ou polipóide;

- ✂ Tipo II: ulcerado bem-delimitado;
- ✂ Tipo III: ulcerado infiltrativo;
- ✂ Tipo IV: infiltrativo ou tipo esquirroso, pode invadir grande extensão do estômago (Borrmann, 1926).

Existe também a classificação macroscópica precoce do CG segundo a Associação Japonesa do CG que classifica como tipo 0 (zero), e subdivide em:

- ✂ Tipo 0 I: elevado ou polipóide;
- ✂ Tipo 0 II: superficial, que se divide em 3 subtipos:
 - ✂ II a: tipo superficialmente elevado;
 - ✂ II b: tipo plano;
 - ✂ II c: tipo deprimido;
- ✂ Tipo 0 III: ulcerado ou escavado (JGCA, 1998).

Uma terceira classificação, a de Lauren, divide o adenocarcinoma gástrico em tipo intestinal e difuso. O tipo intestinal ou bem diferenciado tem origem a partir da mucosa gástrica com metaplasia intestinal e do ponto de vista histopatológico, é constituído pelo adenocarcinoma papilotubular ou tubular. O tipo difuso, indiferenciado ou infiltrativo constitui-se histopatologicamente da forma mucocelular, e se origina da mucosa gástrica normal (Lauren, 1965).

O tipo Intestinal do CG tem maior incidência em pacientes mais idosos envolvendo fatores dietéticos e ambientais. Por outro lado o tipo difuso de CG está relacionado a fatores genéticos (Torok *et. al.*, 2005).

No setor de Oncologia da Disciplina de Gastroenterologia da Unifesp-EPM, entre os tumores gástricos, 60% são de antro e 58% são do tipo intestinal (Forones, 2005).

A União Internacional Contra o Câncer (UICC) classifica os tumores gástricos segundo o TNM, onde T = Tumor primário, N = Linfonodos regionais e M = Metástase à

distância. O estágio clínico e patológico são importantes na avaliação do prognóstico (UICC, 2004).

O estadiamento dos tumores gástricos pela classificação TNM:

Tumor primário:

- ✂ TX: O tumor primário não pode ser avaliado;
- ✂ T0: Não há evidência de tumor primário;
- ✂ Tis: Carcinoma *in situ*: tumor intra-epitelial sem invasão da lâmina própria;
- ✂ T1: Tumor que invade a lâmina própria ou a submucosa;
- ✂ T2: Tumor que invade a muscular própria ou a subserosa;
- ✂ T2a: Tumor que invade a muscular própria;
- ✂ T2b: Tumor que invade a subserosa;
- ✂ T3: Tumor que penetra a serosa (peritônio visceral) sem invadir as estruturas adjacentes;
- ✂ T4: Tumor que invade as estruturas adjacentes.

Linfonodos regionais:

- ✂ NX: Os linfonodos regionais não podem ser avaliados;
- ✂ N0: Ausência de metástase em linfonodos regionais;
- ✂ N1: Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais;
- ✂ N2: Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais;
- ✂ N3: Metástase em mais de 15 linfonodos regionais;

Metástase à distância:

∞ MX: A presença de metástase à distância não pode ser avaliada;

∞ M0: Ausência de metástase à distância;

7

∞ M1: Metástase à distância

Segundo o TNM os tumores são classificados em estágio I a IV.

∞ Estádio I: T1N0, T1N1, T2N0, todos M0;

∞ Estádio II: T1N1, T2N2, T3N0, todos M0;

∞ Estádio III: T2N2, T3N1, T4N0, todos M0;

∞ Estádio IV: T4N2M0, qualquer M1.

2.3 Microbiologia do *H. pylori* e resposta Inflamatória mediada pela IL-8.

O *H. pylori* é uma bactéria gram negativa, microaerófila e espiralada em forma de “S” ou em bastonete curvo, que mede cerca de 3-5 µm de comprimento por 0,5 µm de largura. Possui uma parede celular externa lisa com quatro a seis flagelos unipolares. O *H. pylori* tem uma enzima chamada urease que hidrolisa a uréia, presente no estômago, em amônia e CO₂ permitindo sua sobrevivência em um meio ácido (Siqueira *et. al.*, 2007).

A infecção pode ocorrer por água contaminada, via fecal-oral ou oral-oral e ainda através do instrumento utilizado para realizar endoscopia caso tenha sido contaminado e sua assepsia não seja efetuada adequadamente. (Siqueira *et. al.*, 2007; Ladeira *et. al.*, 2003)

Pesquisadores descobriram que durante o processo evolutivo da bactéria *H. pylori* houve um aumento de sua diversidade genômica em paralelo com a colonização em seres humanos. Isto ocorreu há pelo menos 60.000 anos na África Oriental (Wen *et. al.*, 2008).

Existe uma variação na manifestação clínica nos pacientes infectados pelo *H. pylori*, da qual é influenciada pela diversidade genômica bacteriana e fatores que envolvem diretamente os pacientes, tais como o polimorfismo genético e hábitos alimentares (Kim *et. al.*, 2009).

Estudos demonstram que a erradicação do *H. pylori* diminui efetivamente a incidência de CG em pacientes sem lesões pré-cancerígenas (Murakami *et al.*, 2006). A colonização persistente pelo *H. pylori* na mucosa gástrica pode levar a inflamação crônica, pólipos e ao CG (Joh *et. al.*, 2005; Taguchi *et. al.*, 2005).

8

A alteração fisiopatológica vista na inflamação crônica com atrofia gástrica pode levar a hipocloridria, que é uma anormalidade fisiológica presente na evolução da mucosa normal ao CG (Smith *et. al.*, 2006). Contudo, menos de 20% dos indivíduos infectados apresentam sintomas clínicos. O motivo da variação desta manifestação clínica se faz pelo complexo de interação hospedeiro, fatores de virulência bacteriana e ambientais (Kim *et. al.*, 2009).

O *H. pylori* possui um papel importante na carcinogênese gástrica, gerando as lesões precursoras do CG, como a gastrite crônica de antro, a qual evolui para gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e finalmente o carcinoma invasivo (Figura 1) (Correa & Houghton, 2007).

No início da década de 90, Clore e colaboradores descreveram a estrutura tridimensional da IL-8 (Figura 2). Seu *loci* no genoma humano é identificado no cromossomo 4q21.1. Em 2002 a IL-8 foi renomeada a CXCL8 pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional das Sociedades de Imunologia, embora o

símbolo IL-8 ainda permanece (Bacon *et. al.*, 2002). A IL-8 é uma quimiocina produzida por macrófagos e outros tipos de células, como as células epiteliais e endoteliais (Wolff *et. al.*, 1998).

Figura 1. Carcinogênese mediada pela infecção por *H. pylori* em função das vertentes: idade e acidez. Fonte: Correa & Houghton, 2007

A IL-8 atua na atração dos neutrófilos e linfócitos aos locais da inflamação.

Níveis elevados de IL-8 co

2005). É uma importante citocina na mediação da resposta inflamatória na infecção por *H. pylori*, além de atrair fagócitos e causar danos à mucosa gástrica pela liberação de radicais de oxigênio reativo. (Torok

revelaram que a IL-8 induz a proliferação celular e a angiogênese (Karashima 2003; Taguchi *et. al.*, 2005).

A rápida normalização dos níveis de IL

erradicação da bactéria *H. pylori*

infecção pelo *H. pylori* (Ando

A persistência da colonização do

citocinas de quimiotaxia como a IL

gástrica, levando a gastrite crônica

A indução da transcrição do fator de ativação da proteína 1 (AP

nuclear (NF)- κ B e a libera

infecção por *H. pylori* e regulam a infiltração de n

Moss, 2008; Backert *et. al.*,

O sistema de secreção do tipo 4 (T4SS) codificado pela ilha de patogenicidade

cag (PAI), presente no *H. pylori*

virulência chamado de citotoxina associada ao antígeno A (Cag

células do epitélio gástrico

resíduo de tirosina, em seguida ao stress oxidativo, ativando o NF

a IL-8. (Brandt *et. al.*, 2006)

contribuem na inflamação crônica dos tecidos

, *et. al.*, 2005; Ohyauchi *et.*

IL-8 nas células da mucosa gástrica após a

pylori, indica claramente a estimulação

et. al., 1998).

H. pylori na região gástrica induz a liberação de

IL-8, estimulando a infiltração de neutrófilos na mu

ica, (Brandt *et. al.*, 2006).

A liberação de IL-8 são respostas inflamatórias causadas pela

neutrófilos citada anteriormente

2006).

pylori, tem como função injetar um de seus fatores de

Cagcélulas

gástrico. Este antígeno é submetido a uma fosforilação por um

NF- κ

2006).

Figura 2. Estrutura tridimensional da IL-8.

Clore *et. al.*, 1990.

os (Lee *et. al.*,
al., 2005). Estudos
et. al.,
aramente desta citocina pela
mucosa
AP-1), o fator
eutrófilos (Wen &
, -A) para dentro das
ste κB e assim liberando
10

A ativação principal do NF-κB pelo *H. pylori* é realizada através dos lipopolissacarídeos (LPS) presente em sua parede celular. O alvo destes LPS é o receptor transmembrana toll-like receptor 4 (TRL4) presente em macrófagos e monócitos (Figura 3) (Smith *et. al.*, 2006).

Cepas do *H. pylori* com genótipo *cagA*⁺ têm probabilidade três vezes maior de desenvolver CG do que aqueles infectados por cepas *cagA*⁻. (Con *et. al.*, 2009). No Ocidente, as cepas *cagA*⁺ são comumente associadas com ulceração péptica, atrofia gástrica e CG (Wen *et. al.*, 2008).

Outro estudo sugeriu que o fator de virulência CagA do *H. pylori* não está associado a indução de liberação da IL-8 pelos monócitos e células epiteliais, mas a outros componentes bacterianos, tais como: flagelos, LPS, proteínas superficiais de membrana e a HSP60 (uma proteína de 60kDa da *H. pylori* chamada de *heat-shock protein* com o papel de um potente antígeno na resposta imunológica), as quais tem maior importância na indução na liberação da IL-8. A HSP60 ativa a NF-κB e induz fortemente a produção de IL-8 através dos receptores TRL4 nas células do epitélio gástrico e contribuem para o desenvolvimento da inflamação gástrica causada pela infecção pelo *H. pylori* (Takenaka *et. al.*, 2004).

Os LPS ao se ligar nos receptores TRL4, ativam o sinal de transdução através do Fator de Diferenciação Mielóide 88 (MyD88). O Myd88 é uma proteína adaptadora essencial na transdução de sinais gerados por receptores do tipo *Toll-like* (Li *et. al.*, 2005), o receptor da IL-1 e o Receptor associado ao Fator 6 (TRAF6) ativam a NF-κB
Figura 3. Ativação do NF-κB pelo *H. pylori* através dos LPS presente em sua membrana e via CagA estimulando a resposta inflamatória e humoral. Smith *et. al.*, 2006

11
que por sua vez conduz a síntese e a liberação da IL-8 e outras citocinas (Smith *et. al.*, 2006).

Estudo realizado com pacientes iranianos com o polimorfismo -251A/T na região promotora do gene da IL-8 e o polimorfismo do gene *vacA* da bactéria *H. pylori*, demonstrou gastrites, ulcera péptica e maior risco ao CG (Sarventani *et. al.*, 2006).

Um estudo realizado no México com o polimorfismo -251A/T na região promotora do gene da IL-8 demonstrou que o alelo IL8-251A está presente no desenvolvimento do CG não-cárdica nesta população (Gonzalez *et. al.*, 2007).

Por outro lado, na população polonesa não foi observada correlação com o polimorfismo -251A/T na região promotora do gene da IL-8 e o aumento do risco em adenocarcinoma gástrico (Savage *et. al.*, 2006).

Visto que, diversos pesquisadores demonstraram interesse na determinação de

um perfil genotípico da IL-8 e o risco de CG, achamos necessário pesquisar este polimorfismo genético em nossa população, sendo estas informações ainda não encontradas na literatura.

12

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Casuística

Foram estudados indivíduos com CG atendidos no ambulatório na Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) e na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Participaram do grupo controle, homens e mulheres que frequentaram o setor de coleta de sangue do Laboratório Central do Hospital São Paulo, com idade e sexo semelhantes ao grupo caso.

O projeto foi avaliado e aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo sob n°. 1940/07 (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo sob n°. 026/09 (Anexo 2).

Todos os pacientes envolvidos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3 e 4)

Fatores de inclusão:

☒ Grupo Caso: pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, com CG do tipo adenocarcinoma nas regiões do corpo, antro ou piloro;

☒ Grupo controle: indivíduos sem sintomas de doenças gastrintestinais, sem doença crônica descompensada, sem conhecimento de outros cânceres e com mais de 18 anos.

Fatores de exclusão:

☒ Não ter assinado o termo de consentimento para participar do estudo.

3.2 Método

Todos os pacientes preencheram o questionário de frequência de consumo de alimento (QFCA), tais como, carnes, gorduras, verduras e frutas. Os hábitos como fumo e álcool também foram questionados e divididos em ativos, nunca fizeram uso e usuários atuais.

Pesquisa de anticorpos IgG anti-H.pylori

13

Foi realizada a pesquisa de anticorpos IgG anti-*H.pylori* pelo método de ELISA com o soro retirado do sangue coletado por punção venosa periférica em tubo simples (sem anticoagulante), centrifugado e armazenado a -20°C antes de ser analisado. Esta sorologia foi realizada em todas as amostras (IMMULITE, 2006).

Extração do DNA

O DNA foi extraído dos leucócitos do sangue venoso periférico coletado com o anticoagulante: ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Com o kit comercial *Invisorb® Spin Blod Mini KIT*, foi extraído e purificado de 4,5 a 7,5 µg de DNA em 300 µL de sangue total com aproximadamente 3x10⁶ leucócitos com os seguintes procedimentos:

Hemólise: foram adicionados 900 µL de solução de hemólise em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e adicionado ao tubo 300 µL de sangue total com EDTA. Foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugado em velocidade entre 12.000–16.000 rpm por 20 segundos e removido o sobrenadante cuidadosamente até

visualizar um pellet de aproximadamente 20 - 30 μ L.

Extração: Foi ressuspenso o pellet (que contém os leucócitos) vigorosamente com o auxílio do vórtex, adicionado 500 μ L de solução de extração nesta suspensão de leucócitos e agitado vigorosamente no vórtex. Foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente.

Recuperação do DNA: Transferido todo volume do tubo após a extração para a coluna GFX de separação de DNA, centrifugado a 5.000 g por 1 minuto na microcentrífuga e aplicada a seguinte equação para descobrir o rpm: $FCR = 1.12 \times r \times N^2$, onde: FCR = força centrífuga relativa (g); r = o raio em centímetros (cm) e N = a velocidade em rotações por minuto (rpm).

Descarte dos resíduos (limpeza): Foi adicionado 500 μ L de solução de extração a 5.000 g por 1 minuto. Em seguida retirado a coluna GFX, foi descartada a solução remanescente do tudo coletor e retornar a coluna ao tubo coletor. Foram adicionados 500 μ L de solução de lavagem na coluna GFX e centrifugado a 12.000 – 16.000 rpm por 3 minutos. O tubo foi descartado e a coluna GFX transferida para o tubo definitivo de 1,5mL para microcentrífuga.

Remoção do DNA da coluna GFX: Foram adicionados 200 μ L de H₂O (livre de nucleases pré-aquecida a 70°C) diretamente na matriz da coluna GFX, incubado em 14

temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado 5.000 g por 1 minuto para recuperar o DNA purificado (Invisorb®, 2009).

Em seguida o DNA extraído foi aferido pelo quantificador de DNA/RNA

Nanodrop®, que confirmou a eficácia do método de extração e possibilitou a sequência dos procedimentos.

Amplificação e análise do polimorfismo da IL-8

As amostras foram submetidas à técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) e posteriormente genotipadas pela técnica de polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (RFLP). Os *primers* utilizados foram: *forward* na sequência: 5` - TTCTAACACCTGCCACTCTAG - 3` e para os *primers reverse* a sequência: 5` - CTGAAGCTCCACAATTTGGTG - 3` (Taguchi *et. al.*, 2005). A PCR foi realizada com os seguintes componentes e condições: 10 μ L contendo 40 ng de DNA, reagente tampão 1x, 0.125 mmol/L de cada desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.75 μ mol/L de cada primer e 0,5 unidades de *Taq DNA polymerase Platinum*. O DNA foi desnaturado em 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos com a extensão final em 72°C por 7 minutos. Após a amplificação foram utilizados 5 unidades da enzima de digestão *MfeI*. A digestão foi realizada durante 12hs em 37°C. Foram ser visualizados os resultados através da eletroforese em gel de agarose a 5% com brometo de etídio, dos seguintes genótipos AA, AT e TT, do grupo CG, do grupo controle. Pacientes homocigotos TT demonstram uma única banda com 108pb; pacientes homocigotos AA demonstram duas bandas sendo de 76 e 32pb; e pacientes heterocigotos AT demonstram três bandas de 108, 76 e 32 pb (Taguchi *et. al.*, 2005).

Análise estatística.

As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS – *Statistical Package for Social Sciences* (v16.0).

Para comparação de dados quantitativos foram utilizados os testes de Mann-Whitney, para dados não paramétricos.

Foi estudada a razão de risco (*OR*) de cada genótipo e o risco de câncer, assim como de cada genótipo e a infecção por *H. pylori*.

15

As frequências genóticas esperadas foram estimadas a partir das frequências alélicas observadas e desvios no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram calculados através do teste de Qui-Quadrado.

A pesquisa das variáveis independentes que possam alterar o risco de câncer foi estudada pela análise de regressão logística multivariada.

Os níveis de significância utilizados para os testes serão de $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$).

16

4. RESULTADOS

No grupo caso participaram 104 indivíduos adultos com diagnóstico de CG atendidos no ambulatório da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da UNIFESP-EPM e na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. O grupo controle foi constituído por 208 pacientes sem sintomas de doenças gastrintestinais, admitidos no mesmo período, com idade e sexo semelhantes ao grupo caso. Entre os indivíduos com CG, 47 eram do sexo feminino e 57 do sexo masculino. No grupo controle participaram 114 mulheres e 94 homens sem câncer (Tabela 1).

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DO SEXO DOS PACIENTES COM CG E CONTROLE

CONTROLE

CÂNCER

SEXO n (%) n (%) p*

FEMININO 114 (54,8) 47 (45,2) 0,12

MASCULINO 94 (45,2) 57 (54,8)

TOTAL

208 (100) 104 (100)

A média de idade entre os pacientes do grupo caso e do grupo controle foi de 61,1 e 63 anos, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2. MÉDIA DE IDADE DOS PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO E CONTROLE

MÉDIA n (SD) U p*

CONTROLE 63,0 208 (12,4) 9565,0 0,10

CÂNCER 61,1 104 (11,9)

*(Referente ao teste de *Mann-Whitney*); (SD) Desvio Padrão

* Teste de X

2

17

Figura 4. Extração do DNA genômico de alguns pacientes do Grupo CG.

No grupo controle, no sexo feminino e masculino a média de idade foi de 62,3 e 63,9 anos, respectivamente. No grupo câncer a média foi de 60,8 anos para as mulheres e 61,4 anos para os homens (Tabela 3).

A pesquisa de anticorpos contra *H. pylori* apresentou positividade em 112 (53,8%) indivíduos do grupo controle e 47 (45,2%) pacientes do grupo câncer (Tabela 4).

TABELA 4. PERFIL SOROLÓGICO PARA *H. pylori* NOS PACIENTES COM CG E CONTROLE

Controle

Câncer

n=208 (%)

n=104 (%) p*

Infecção por *H. pylori*

Positivo 112 (53,8) 47 (45,2) **0,15**

Negativo 96 (46,2)

57 (54,8)

A Figura 4 exibe a imagem do DNA genômico extraído dos leucócitos do sangue venoso periférico coletado com o anticoagulante EDTA de alguns pacientes do CG demonstrando a obtenção deste DNA.

TABELA 3. IDADE DOS PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO E CONTROLE, CONFORME O SEXO

Controle

Câncer

SEXO MÉDIA N (SD) MÉDIA N (SD)

FEMININO 62,3 114 (13,7) 60,8 47 (11,6)

MASCULINO 63,9 94 (10,5) 61,4 57 (12,3)

* *Teste de X*

2

e (SD) Desvio Padrão

* *Teste de X*

2

18

Figura 5. Possíveis genótipos: Homozigoto TT demonstra uma única banda com 108pb; homozigoto AA possui duas bandas sendo de 76 e 32pb; e heterozigoto AT, três bandas de 108, 76 e 32 pb.

A padronização da genotipagem (Figura 5) demonstrou por consequência a eficácia dos métodos de extração do DNA, amplificação da sequência de interesse e finalmente a digestão destes *amplicons* (produto da amplificação do DNA por PCR).

A genotipagem ou digestões dos *amplicons* pela técnica de RFLP foi aplicada em todas as amostras deste estudo. A Figura 6 demonstra exemplos de pacientes do grupo controle.

Figura 6. Frequência genotípica de alguns pacientes do grupo controle.

19

No grupo controle foi observada a presença de 57 (27,4%) indivíduos com o genótipo AA, 85 (40,9%) com o AT e 66 (31,7%) com o genótipo TT. No grupo câncer foi encontrado 15 (14,4%) pacientes com o genótipo AA, 58 (55,8%) com o genótipo AT e 31 (29,8%) com TT. O grupo controle apresentou 199 (47,8%) alelos A e 217 (52,2%) alelos T. O grupo câncer reportou 88 (42,3%) alelos A e 120 (57,7%) alelos T (Tabela 5). Estas diferenças foram significantes em relação aos genótipos, mas não em relação aos alelos.

TABELA 5. GENÓTIPOS E FREQUÊNCIA ALÉLICA NOS PACIENTES COM CG E CONTROLE

Controle Câncer

n=208 (%) n=104 (%) p*

Genótipos AA 57 (27,4) 15 (14,4) **0,01**

AT 85 (40,9) 58 (55,8)

TT 66 (31,7)

31 (29,8)

Alelos A 199 (47,8) 88 (42,3) **0,20**

T 217 (52,2) 120 (57,7)

* *Teste de X*

2

Foi realizada a análise do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e calculados através do

teste de Qui-Quadrado as frequências genóticas Homozigoto Selvagem AA, Heterozigoto AT e Homozigoto Mutado TT (Tabela 6).

Genótipo
GRUPO
Homozigoto
Selvagem (AA)
Heterozigoto
(AT)
Homozigoto
Mutado (TT)
Qui-
Quadrado

p*
CONTROLE

Observado 57 85 66

6,83 **0,01**

Esperado 47,6 103,8 56,6

CÂNCER

Observado 15 58 31

2,11 **0,15**

Esperado 18,6 50,8 34,6

* *Teste de X*

²

TABELA 6. ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E TESTE DO QUI-QUADRADO AO

POLIMORFISMO DA IL-8

20

O polimorfismo genético da IL-8 nos dois grupos foi comparado ao resultado da pesquisa de anticorpos contra *H. pylori*. Na ausência destes anticorpos foram observados 23 (41,1%) indivíduos sem câncer do genótipo AA, 43 (50,6%) AT e 30 (45,5%) do genótipo TT. No grupo com câncer foi observado 5 (33,3%) pacientes com genótipo AA, 36 (62,1%) AT e 16 (51,6%) com genótipo TT. Estas diferenças foram significantes. Nos pacientes com sorologia positiva para *H. pylori* observamos 34 (30,4%) indivíduos sem câncer do genótipo AA, 42 (37,5%) AT e 36 (32,1%) do genótipo TT. No grupo câncer foram observados 10 (66,7%) pacientes com genótipo AA, 22 (37,9%) AT e 15 (48,4%) do genótipo TT (Tabela 7).

TABELA 7. POLIMORFISMO DA IL-8 NOS PACIENTES COM CG E CONTROLES NA INFECÇÃO POR *H.pylori*.

AA AT TT

H. pylori* NEGATIVO n (%) n (%) n (%) p

CONTROLE 23 (41,1) 43 (50,6) 30 (45,5) **0,03**

CÂNCER 5 (33,3) 36 (62,1) 16 (51,6)

***H. Pylori* POSITIVO**

CONTROLE 34 (30,4) 42 (37,5) 36 (32,1) **0,42**

CÂNCER 10 (66,7) 22 (37,9) 15 (48,4)

Na análise dos genótipos AA, AT e TT no grupo câncer e controle segundo a presença ou não de infecção por *H. pylori*, não se observou diferença estatística entre os grupos (Tabela 8).

TABELA 8. GENÓTIPOS AA, AT E TT NOS PACIENTES COM CG E CONTROLE NA INFECÇÃO POR *H. pylori*

CONTROLE (%) CÂNCER (%) p*

AA + *H.pylori* POSITIVO 34 (59,6) 10 (66,7) **0,77**

NEGATIVO 23 (40,4) 5 (33,3)

AT + *H.pylori* POSITIVO 42 (49,4) 22 (37,9) **0,23**

NEGATIVO 43 (50,6) 36 (62,1)

TT + *H.pylori* POSITIVO 36 (54,5) 15 (48,4) **0,66**

NEGATIVO

30 (45,5) 16 (51,6)

Foi realizada a análise conjugada, isto é, a soma combinada dos genótipos AT+TT vs AA, nos pacientes com CG e Controles infectados por *H. pylori*. No grupo controle, 78 (69,6%) indivíduos apresentaram genótipos AT+TT e 34 (30,4%) genótipo

* Teste de X

2

* Teste de X

2

21

AA. No grupo câncer 37 (32,2%) indivíduos tinham genótipos AT+TT e 10 (23,3%) genótipo AA. Esta análise conjugada foi aplicada aos genótipos AA+AT vs TT, nos pacientes com CG e controles também infectados por *H. pylori*. No grupo controle foi observado 76 (70,1%) indivíduos com genótipos AA+AT e 36 (70,6%) com o genótipo TT. No grupo câncer foi encontrado 32 (29,2%) indivíduos com genótipos AA+AT e 15 (29,4%) com o genótipo TT (Tabela 9).

TABELA 9. ANÁLISE CONJUGADA DOS GENÓTIPOS DA IL-8 NOS PACIENTES COM CG E CONTROLES

INFECTADOS POR *H.pylori*

CONTROLE (%) CÂNCER (%) p*

AT+TT 78 (69,6) 37 (32,2) **0,33**

AA 34 (30,4) 10 (23,3)

AA+AT 76 (70,1) 32 (29,9) **1,00**

TT 36 (70,6) 15 (29,4)

Foi realizada a análise conjugada dos genótipos AT+TT vs AA, nos pacientes com CG e Controles não infectados por *H. pylori*. No grupo controle 73 (58,4%) indivíduos que tinham genótipos AT+TT e 23 (82,1) genótipo AA. No grupo câncer 52 (41,6%) indivíduos tinham genótipos AT+TT e 5 (17,9%) genótipo AA. Esta análise conjugada foi aplicada aos genótipos AA+AT vs TT, nos pacientes com CG e controles também nunca infectados por *H. pylori*. No grupo controle foram observados 66 (61,7%) indivíduos com genótipos AA+AT e 30 (65,2%) com o genótipo TT. No grupo câncer 41(38,3%) indivíduos tinham genótipos AA+AT e 16 (34,8%) genótipo TT (Tabela 10).

TABELA 10. ANÁLISE CONJUGADA DOS GENÓTIPOS DA IL-8 NOS PACIENTES COM CG E CONTROLES

NÃO INFECTADOS POR *H.pylori*.

CONTROLE (%) CÂNCER (%) p*

AT+TT 73 (58,4) 52 (41,6) **0,02**

AA 23 (82,1) 5 (17,9)

AA+AT 66 (61,7) 41 (38,3) **0,72**

TT

30 (65,2) 16 (34,8)

* *Teste de X*

2

* *Teste de X*

2

22

A Tabela 11 reporta o resultado da análise comparativa entre o grupo câncer e controle quanto ao tabagismo, etilismo e hábito alimentar segundo o questionário de frequência alimentar (QFCA).

TABELA 11. HÁBITOS ALIMENTARES, ETILISMO E TABAGISMO DOS PACIENTES COM CG E CONTROLES.

Controle n= 208 Câncer n=104 p*

n (%) n (%)

Tabagismo Nunca fumou 119 (57,2) 40 (38,5) **<0,01**

Ex-fumante 57 (27,4) 51 (49,0)

Fumante 32 (15,4) 13 (12,5)

Consumo de Álcool Nunca 143 (68,8) 66 (63,5) *0,46*

Ex-Etilistas 7 (3,4) 6 (5,8)

Etilistas 58 (27,9) 32 (30,8)

Etilismo Destilados diariamente 4 (6,9) 1 (3,1) *0,67*

Destilados Semanalmente 2 (3,4) 3 (9,4)

Destilados Mensalmente 1 (1,7) 0 (0,0)

Fermentado Diariamente 2 (3,4) 2 (6,3)

Fermentado Semanal//te 25 (43,1) 12 (37,5)

Fermentado Mensalmente 18 (31,0) 8 (25,0)

Ambos Semanalmente 6 (10,3) 6 (18,8)

Não Comem Frutas 1 (0,5) 1 (1,0) *1,00*

Comem Frutas 207 (99,5) 103 (99,0)

Consumo de frutas Frutas diariamente 153 (73,9) 69 (67,0) *0,08*

Frutas semanalmente 48 (23,2) 25 (24,3)

Frutas mensalmente 6 (2,9) 9 (8,7)

Não comem Verduras 1 (0,5) 5 (4,8) **0,02**

Comem Verduras 207 (99,5) 99 (95,2)

Consumo de Verduras Verduras diariamente 150 (72,5) 68 (68,7) *0,32*

Verduras semanalmente 53 (25,6) 26 (26,3)

Verduras mensalmente 4 (1,9) 5 (5,1)

Não comem cereais 96 (46,2) 53 (51,0) *0,47*

Comem Cereais 112 (53,8) 51 (49,0)

Consumo de Cereais Cereais diariamente 31 (27,7) 19 (37,3) *0,07*

Cereais semanalmente 52 (46,4) 14 (27,5)

Cereais mensalmente 29 (25,9) 18 (35,3)

Não comem carne vermelha 6 (2,9) 1 (1,0) *0,43*

Comem carne vermelha 202 (97,1) 103 (99,0)

Cons. Carne Vermelha Diariamente 48 (23,8) 32 (30,8) *0,22*

Três vezes por semana 84 (41,6) 34 (32,7)

Semanalmente 60 (29,7) 28 (26,9)

Mensalmente 10 (5,0) 9 (8,7)

Não comem Fritura/Gordura 133 (63,9) 48 (46,2) **<0,01**

Comem Fritura/Gordura 75 (36,1) 56 (53,8)

Cons. Fritura/Gordura Diariamente 6 (8,0) 12 (11,5) *0,18*

Três vezes por semana 22 (29,3) 11 (10,6)

Semanalmente 38 (50,7) 27 (26,0)

Mensalmente 9 (12,0) 6 (5,8)

* Teste de X

2

23

O polimorfismo genético da IL-8 nos grupo controle e grupo câncer foram comparados com o hábito de fumar. Os pacientes do grupo câncer que fumam tinham 13,3% genótipo AA, 6,5% TT e 15,5% genótipo AT. Neste mesmo grupo, os pacientes que nunca fumaram foram 26,7% do genótipo AA, 41,9% TT e 39,7% do genótipo AT e por fim os ex-fumantes foram 60,0% do genótipo AA, 51,6% TT e 44,8% do genótipo AT. Os pacientes do grupo controle que fumam eram 12,3% do genótipo AA, 15,2% TT e 17,6% do genótipo AT. Neste mesmo grupo, os pacientes que nunca fumaram foram 61,4% do genótipo AA, 57,6% TT e 54,1% do genótipo AT e por fim os ex-fumantes foram 26,3% do genótipo AA, 27,3% TT e 28,2% do genótipo AT (Tabela 12).

TABELA 12. POLIMORFISMO DA IL-8 NOS PACIENTES COM CG E CONTROLE NO TABAGISMO

AA (%) TT % AT % p

Câncer

Fumantes 2 (13,3) 2 (6,5) 9 (15,5) 0,624

Nunca fumou 4 (26,7) 13 (41,9) 23 (39,7)

Ex-fumante 9 (60,0) 16 (51,6) 26 (44,8)

Controle

Fumantes 7 (12,3) 10 (15,2) 15 (17,6) 0,909

Nunca fumou 35 (61,4) 38 (57,6) 46 (54,1)

Ex-fumante 15 (26,3) 18 (27,3) 24 (28,2)

*Teste de Qui-Quadrado

O polimorfismo genético da IL-8 nos dois grupos foi comparado em indivíduos que nunca fumaram. Entre os indivíduos do grupo controle 61,4% eram genótipo AA, 57,6% TT e 54,1% do genótipo AT, no entanto, entre os pacientes do grupo câncer 26,7% eram genótipo AA, 41,9% TT e 39,7% do genótipo AT (Tabela 13).

TABELA 13. POLIMORFISMO DA IL-8 NOS PACIENTES COM CG E CONTROLE EM NÃO TABAGISTAS

AA (%) TT (%) AT (%) p

NUNCA FUMARAM

Controle 35 (61,4) 38 (57,6) 46 (54,1) **0,029**

Câncer 4 (26,7) 13 (41,9) 23 (39,7)

* Teste de X

2

24

Foram analisadas as variáveis: genótipos heterozigoto e homozigoto mutado; fumante; ex-fumante; consumo de verduras e frituras (Tabela 14). O genótipo heterozigoto mutado, o fumo e o consumo de frituras aumentaram o risco de câncer.

TABELA 14. REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA PARA TABAGISMO, GENÓTIPOS HETEROZIGOTO

E HOMOZIGOTO MUTADO; FUMANTE; EX-FUMANTE; CONSUMO DE VERDURAS E GORDURA.

Odds Ratio

95,0% IC

P

Lower Upper

Heterozigoto 2,28 1,16 4,49 **0,02**

Homozigoto Mutado 1,66 0,80 3,45 0,17

Ex-Fumante + Fumantes 1,89 1,41 3,11 **0,01**

Consome Verdura 0,12 0,01 1,10 0,06

Consome Gordura 1,77 1,07 2,92 **0,03**

* Teste de X

2

25

DISCUSSÃO

Estíma-se que no Brasil para 2010, os indivíduos com CG sejam 64,3% do sexo masculino e 35,7% feminino, com incidência acima dos 50 anos para ambos os sexos (INCA, 2010). Em nosso estudo também observamos maior prevalência nos homens (54,8%) em relação às mulheres (45,2%), com idade média de 61,1 anos em ambos os sexos.

Foram incluídos pacientes com CG do tipo intestinal e não localizados na cárdia por serem mais frequentes em nosso país e associados a infecção pelo *H. pylori* (Voutilainen *et. al*, 2002).

Em Nagoya-Japão, Shirai *et. at.*, (2006) demonstraram associação entre CG e infecção por *H pylori*, Estes autores verificaram um índice elevado de infecção pelo *H. pylori* nos pacientes com CG (91,1%) em relação aos indivíduos sem câncer (58,8%). Quanto ao risco de CG em pacientes infectados por *H. pylori*, nosso estudo não demonstrou diferença significativa ($p=0,15$) entre os dois grupos. Assim como em nosso estudo, Lu *et. al.* (2005) também não encontraram maior risco de câncer nos pacientes infectados ($p=0,18$).

Ando *et. al.* (1998) e Backert *et. al.* (2006) descreveram estudos moleculares que envolve o aumento da patogenicidade mediada por fatores de virulência codificados em determinadas cepas. Em cultura de tecidos da mucosa duodenal, Ando *et. al.* (1998) as infectou com *H.pylori* cepas *cagA+* e *cagA-*, após 18 meses foi verificado um aumento significativo ($p=0,001$) na produção de IL-8 nas culturas infectadas por *H.pylori* cepas *cagA+*. Neste mesmo estudo, os pesquisadores em paralelo relataram alta capacidade infiltrativa dos neutrófilos ($p=0,0005$) no tecido gástrico infectado por esta mesma cepa de alta virulência. Backert *et. al.* (2006) exploraram o mecanismo molecular da *H.pylori* responsável por transferir a citotoxina CagA, com isso, descobriram o sistema de secreção do Tipo 4 (T4SS) que age com uma seringa molecular que injeta esta citotoxina nas células gástrica infectadas. Portanto, ao analisar um estudo envolvendo infecção por *H.pylori*, deve ser considerada a condição multifatorial citada anteriormente.

Pesquisamos a presença de anticorpos IgG séricos anti-*H.pylori* em todas as amostras colhidas, no entanto, estes anticorpos tem a característica de memória, nos

26

traz a informação se o paciente foi imunologicamente sensibilizado (Johnson, 2008). No entanto a infecção atual por *H. pylori* diagnosticada por este método, pode não ser verdadeira. A realização do teste de uréase na endoscopia digestiva alta, a realização da cultura ou pesquisa tecidual pelo método de *Giemsa* aumentam a acurácia do método de diagnóstico de infecção pelo *H pylori*, mas tornaria necessária a indicação de um método invasivo para os indivíduos do grupo controle, sem queixa gastrointestinal e por isso, não houve condições éticas que justificasse tal procedimento. O teste respiratório com uréia marcada com o radioisótopo carbono-14, método não invasivo, possui alta sensibilidade e especificidade sendo um método diagnóstico possível de ser

realizado (Hegedus *et. al.*, 2002). O teste consiste em administrar por via oral a uréia marcada. A bactéria (quando presente) hidrolisa a uréia e libera CO₂, este gás é absorvido, exalado e detectado por espectrometria de massa. A radiação envolvida é 70 vezes menor que uma radiografia de tórax (Stubbs JB & Marshall, 2003). Este método não foi adotado por apresentar resultado falso-negativo após gastrectomia e falso-positivos nos casos de acloridria ou gastrectomia prévia, devido à colonização por outras bactérias uréase-positivas (Flatland, 2002). Diante destes inconvenientes, optamos pelo teste sorológico.

O resultado da relação Infecção por *H. pylori* vs CG demonstrada pelos pesquisadores e em nosso estudo tem característica multifatorial, podendo estar relacionada à diversidade genômica tanto bacteriana como do hospedeiro, erradicação pela antibioticoterapia para outras infecções não causadas pelo *H. pylori* ou por automedicação.

A ocorrência do CG vem sendo associada à exposição aos fatores intrínsecos (genéticos) e a fatores extrínsecos, como o uso de dietas com altas concentrações de cloreto de sódio, nitratos e nitritos contidos em alimentos defumados, embutidos e frituras. (Teixeira e Nogueira, 2003)

Não observamos diferença significativa de hábitos alimentares dos pacientes com CG em relação ao consumo de frutas ($p=1,00$), cereais ($p=0,47$), carne vermelha ($p=0,43$) e verduras ($p=0,32$). No entanto, ao analisar o consumo de frituras e gorduras verificamos um aumento significativo ($p=0,003$) no consumo destes alimentos pelos pacientes com câncer (53,8%) quando comparado aos indivíduos sem câncer (36,1%). Estudos epidemiológicos comprovam a relação entre nutrição e CG, indicando um fator protetor da dieta composta por legumes frescos e frutas, provavelmente pela

27

presença de vitamina C e caroteno que diminuem o risco desta neoplasia (Kono & Hirohata, 1996; Latorre, 1997). No entanto esta relação não foi observada neste estudo, possivelmente pela dificuldade de avaliarmos a quantidade ingerida destes alimentos no decorrer da vida. Optamos pela realização de um método frequentemente utilizado para verificar a associação de dieta e doença, é o Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos (QFCA), usado na abordagem do indivíduo sobre seu consumo de determinados alimentos e bebidas. (Salvo e Gimeno, 2002).

Buckland *et. al.*, (2010) realizaram um estudo multicêntrico em dez países europeus e observaram uma redução significativa de risco de GC, onde houve maior aderência à dieta do Mediterrâneo. Os alimentos utilizados basicamente foram peixe, azeite de oliva, óleo de canola, cereais integrais, massas de trigo integral, frutas, hortaliças, leguminosas e consumo moderado de vinho tinto.

A descoberta do polimorfismo genético de único nucleotídeo (SNP's), ocorreu através de pesquisas iniciadas por Collins *et. al.*, (1998), os quais levaram diversos autores a estudarem estes SNP's, em várias doenças, utilizando diversas técnicas moleculares, hoje bem elucidadas. O polimorfismo -251A/T na região promotora do gene da Interleucina-8 tem sido alvo de pesquisadores, para determinar qual perfil genético tem maior risco ou proteção nas doenças gastrointestinais. (Savage *et.al.*, 2006; Shirak *et. al.*, 2006; Kamangare *et. al.*, 2006; Li *et. al.*, 2005; Ohyachi *et. al.*, 2005).

Song *et. al.*, (2010) recentemente observaram a elevação dos níveis séricos de IL-8 em pacientes com CG e caquexia. Verificaram maior frequência do alelo T em

pacientes com caquexia (OR = 1,765, IC 95%: 1,192-2,615, $p=0,004$). Estes resultados sugerem que o polimorfismo genético da IL-8 também poderia estar associado com a caquexia em pacientes com este câncer.

Um estudo polonês verificou a frequência do polimorfismo -251A/T na região promotora do gene da Interleucina-8, mas, não encontrou diferenças significantes nesta genotipagem (OR: 1,00 95%IC 0,71-1,42; $p=0,96$) (Savage *et. al.*, 2006).

Pesquisadores japoneses não encontraram diferença significativa nas frequências genotípica ($p=0,95$) e alélica ($p=0,93$) do polimorfismo da IL-8 em seu estudo caso-controle (Shirak *et. al.*, 2006). Neste mesmo ano, Kamangare *et. al.*, 28

(2006), obtiveram resultados semelhantes na Finlândia ($p=0,82$) no estudo do mesmo gene da IL-8 (OR: 0,92 95%IC: 0,42-2,00).

Kamali-Sarvestani *et. al.*, (2006) relataram que pacientes iranianos com CG possuem o genótipo TT com maior frequência ($p=0,04$) e uma diferença marginal ($p=0,07$) na frequência alélica T desses pacientes (62%) em relação ao grupo controle (56%). Similarmente, Lee *et. al.*, (2005) demonstraram na população chinesa que o genótipo homozigoto TT possui alta frequência nos pacientes com CG ($p=0,002$), o que resultou em um risco maior de 90% desta malignidade (OR: 1,93 95%IC 1,26-2,95). Houve também diferença significativa ($p=0,004$) na frequência alélica T no grupo com câncer (64,8%) em relação ao grupo controle (57,5%).

Ao contrário, na China, Lu *et. al.*, (2005) confirmaram um elevado risco de CG nos indivíduos com o genótipo AA e infectados por *H.pylori* (OR 2.54; 95% CI 1.38-4.72, $p=0,012$). Entre os japoneses, Taguchi *et. al.*, (2005) demonstraram que o genótipo AA está fortemente relacionado à carcinogênese gástrica quando comparado ao genótipo TT (OR: 2,22 95%IC 1,08-4,56; $p=0,03$).

Em 2005, Ohyauchi *et. al.* estimaram que o genótipo AT aumenta significativamente o risco de CG na população japonesa (OR: 2,02 95%IC 1,37-2,97; $p=0,0005$).

Neste estudo foi observado maior frequência do genótipo homozitoto TT nos dois grupos, sendo que o genótipo heterozigoto AT aumenta mais de duas vezes o risco de CG (OR:2,39 95%IC 1,21-4,74). Resultado semelhante ao estudo de Ohyauchi *et. al* (2005). Houve uma redução significativa ($p=0,01$) na frequência do genótipo AA nos pacientes com CG. Não observamos diferença na frequência alélica em nosso estudo ($p=0,20$).

Como visto anteriormente, há diferenças genotípicas entre os vários estudos, e isto pode ser decorrente de diferenças étnicas assim como do número de pacientes incluídos no estudo. Conseqüentemente em nosso estudo, a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg demonstrou um desequilíbrio significativo ($p=0,01$), que pode estar diretamente relacionada à miscigenação no grupo controle que não se correlacionou com o grupo câncer quanto à etnia (Collins *et. al.*, 2009).

Kamali-Sarvestani *et. al.*, (2006) também compararam a frequência genotípica da IL-8 em grupos de pacientes com gastrites, ulcera péptica e CG e encontraram 29

prevalência do genótipo AA nos pacientes do grupo CG (47,4%) quando comparado a doenças benignas (16,8%, $p=0,013$).

Quanto ao tabagismo praticado pelos pacientes com CG e controles, em nosso estudo dividimos a incidência em: Nunca fumou, Ex-fumante e Fumante; e observamos

um aumento significativo de ex-fumantes entre os indivíduos com câncer ($p=0,001$), Ito *et. al.* (2005) verificaram a elevação dos níveis de IL-8 em indivíduos que nunca fumaram ($p=0,004$) e indivíduos fumantes ($p=0,023$) sugerindo assim que um determinado perfil genético inflamatório pode estar relacionado ao impedimento do início ao tabagismo ou não aderência ao hábito de fumar. Liang *et. al.* (2009), recentemente observaram um aumento semelhante ao risco em indivíduos fumantes em relação a não fumantes, no entanto o aumento no risco foi um pouco mais forte para ex-fumantes do que para fumantes, sugerindo que o efeito do tabagismo persiste de forma irreversível, ou pelo menos por muitos anos, mesmo após deixar o hábito. Não foi observado diferença significativa entre os genótipos da IL-8 e o hábito de fumar no grupo controle ($p=0,909$) e câncer ($p=0,624$). No entanto, ao analisar somente os indivíduos que nunca fumaram, verificamos uma redução significativa ($p=0,029$) nos pacientes com CG com genótipo AA, isto sugere que indivíduos com o genótipo AA e que nunca entraram em contato com o fumo, tem maior proteção ao CG. Podemos concluir a partir dos resultados que são fatores independentes de risco de câncer gástrico na amostra estudada os indivíduos com o genótipo heterozigoto AT (OR: 2,28 95%IC 1,16-4,49; $p=0,02$); os que consomem frituras em maior frequência (OR: 1,77 95%IC 1,12-2,92; $p=0,03$) e os que fizeram uso de cigarro, incluindo os exfumantes e fumantes atuais (OR: 1,89 95%IC 1,41-3,11; $p=0,01$).

30

6. CONCLUSÕES

1. A frequência do genótipo AT está associada à elevação do risco de CG em aproximadamente duas vezes.
2. O percentual de pacientes com CG infectados pelo *H. pylori*, diagnosticado pelos níveis de anticorpos séricos, não foi diferente do grupo controle na população estudada.
3. Não observamos correlação entre a frequência alélica e o risco de CG.
4. Indivíduos que consomem gorduras em excesso, ex-fumantes e fumantes têm maior risco de CG.
5. Não encontramos associação entre carne vermelha, frutas, verduras, cereais, etilismo e CG

31

7. ANEXOS

Anexo: 1 Ata de reunião da comissão julgadora da defesa de tese de mestrado

32

33

Anexo: 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM

34

35

Anexo: 3 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de misericórdia de São Paulo.

36

Anexo: 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“O polimorfismo -251 A/T na região promotora do gene da

interleucina 8 e o risco de CGem pacientes infectados por *Helicobacter pylori*: estudo caso-controle”.

PACIENTES

Estudos têm demonstrado a associação de polimorfismos do gene da interleucina 8 em CG(CG). Este estudo tem como objetivo elucidar a presença dessas alterações deste gene em pacientes portadores de CG, auxiliando assim, futuras formas de diagnóstico precoce e tratamento de indivíduos com maior risco da doença. Para tanto, convidamos o Sr(a). a participar do estudo, permitindo a coleta de pequena amostra de material biológico (15ml de sangue) e análise do mesmo. Esta análise não é um procedimento de risco. Não serão pagas taxas de participação, assim como não será cobrado taxa para realização do exame. Em qualquer etapa do estudo, o Sr(a). poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o mestrando Aledson Vitor Felipe, que podem ser encontradas no Laboratório de Pesquisa de Gastro-oncologia na Rua Pedro de Toledo, 781, 10º andar (frente), fone: 5084-1743. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), localizado na Rua Botucatu, 572 / 1º andar / cj 14, fone: 5571-1062/fax: 5539-7162/ e-mail: cepunifesp@epm.br.

A qualquer momento é garantida a liberdade da retirada de consentimento e decisão em deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Teremos o compromisso de utilizar os dados e o material somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente comunicado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo de Polimorfismos Genéticos nos tumores Gástricos”. Eu discuti com o mestrando sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos da investigação, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer

37

momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo. Data ____/____/____

PLANILHA A SER PREENCHIDA.

NOME:

RH:

IDADE:

SEXO: feminino() masculino()

FUMANTE: sim() nº/dia: passado() nº/dia: não()

ETILISTA: sim() destilados(dia/sem/mês) cerveja(dia/sem/mês) vinho(dia/sem/mês) não()

FIBRAS: sim() frutas(dia/sem/mês) verduras(dia/sem/mês) cereais(dia/sem/mês) não()

CARNE V: sim() (dia/1xsem/3xsem/mês) passado (dia/1xsem/3xsem/mês) não()

GORDURA: sim() (dia/1xsem/3xsem/mês) passado (dia/1xsem/3xsem/mês) não()

DIAGNÓSTICO:

TIPO HIST.: () Difuso () Intestinal

Diferenciação () Bem () Moderado () Pouco () Indiferenciado

T
N
M

ESTÁDIO
CIRURGIA
QUIMIOTERAPIA
RADIOTERAPIA

Data do diag//o. atual ___/___/_____

Situação da ultima consulta: () vivo com doença () vivo sem doença

38

Anexo: 5

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“O polimorfismo –251 A/T na região promotora do gene da interleucina 8 e o risco de CGem pacientes infectados por *Helicobacter pylori*: estudo caso-controle”.

CONTROLES

Estudos têm demonstrado a associação de polimorfismos do gene da interleucina 8 em CG(CG). Este estudo tem como objetivo elucidar a presença dessas alterações deste gene em pacientes portadores de CG, auxiliando assim, futuras formas de diagnóstico precoce e tratamento de indivíduos com maior risco da doença. Para tanto, é necessário comparar os resultados obtidos em pacientes que têm câncer com aqueles de pessoas que **NÃO TÊM CÂNCER, COMO O SR(a)**. Concordando, convidamos Sr(a). a participar do Grupo controle do estudo, permitindo a coleta de pequena amostra de material biológico (15ml de sangue) e análise do mesmo. Esta análise não é um procedimento de risco. Não serão pagas taxas de participação, assim como não será cobrado taxa para realização do exame.

Em qualquer etapa do estudo, o Sr(a). poderá ter acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o mestrando Aledson Vitor Felipe, que podem ser encontradas no Laboratório de Pesquisa de Gastro-oncologia na Rua Pedro de Toledo, 781, 10º andar (frente), fone: 5084-1743. Se você tiver alguma consideração ou duvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), localizado na Rua Botucatu, 572 / 1º andar / cj 14, fone: 5571-1062/fax: 5539-7162/ e-mail: cepunifesp@epm.br.

A qualquer momento é garantida a liberdade da retirada de consentimento e decisão em deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Teremos o compromisso de utilizar os dados e o material somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente comunicado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo de Polimorfismos Genéticos nos tumores Gástricos”. Eu discuti com o mestrando sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos da investigação, os procedimentos a serem

39
realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e

Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo. Data ____/____/____

PLANILHA A SER PREENCHIDA.

NOME:

RH:

IDADE:

SEXO: feminino() masculino()

FUMANTE: sim() n^o/dia: passado() n^o/dia: não()

ETILISTA: sim() destilados(dia/sem/mês) cerveja(dia/sem/mês) vinho(dia/sem/mês) não()

FIBRAS: sim() frutas(dia/sem/mês) verduras(dia/sem/mês) cereais(dia/sem/mês) não()

CARNE V: sim() (dia/1xsem/3xsem/mês) passado (dia/1xsem/3xsem/mês) não()

GORDURA: sim() (dia/1xsem/3xsem/mês) passado (dia/1xsem/3xsem/mês) não()

Genótipo:

H. pylori: () positivo () negativo

40

Anexo: 6. Grupo câncer contendo: idade, sexo, genótipo e sorologia p/ *H.*

pylori

Paciente IDADE Sexo

Genó

tipo

Hp (*cont.*)

IDAD

E

Sexo

1F 2M

Genó

tipo

Hp (*cont.*) IDADE Sexo

Genó

tipo

Hp

1 46 2 2 2 **44** 79 1 2 2 **87** 69 2 3 2

2 51 2 3 2 **45** 44 1 2 2 **88** 67 1 2 2

3 52 2 2 2 **46** 40 1 3 2 **89** 73 1 3 2

4 71 1 2 2 **47** 68 1 2 1 **90** 37 2 2 2

5 45 1 2 2 **48** 51 1 2 1 **91** 51 2 3 2

6 55 2 2 1 **49** 54 2 2 1 **92** 72 2 3 2

7 48 1 1 2 **50** 71 2 3 2 **93** 28 2 2 2

8 45 2 2 2 **51** 58 2 3 1 **94** 78 1 3 1

9 76 2 2 1 **52** 58 2 2 2 **95** 46 1 2 2

10 68 2 3 1 **53** 52 1 2 1 **96** 70 2 2 2

11 72 2 2 2 **54** 65 1 3 1 **97** 61 2 2 2

12 57 2 1 1 **55** 66 1 2 2 **98** 44 2 3 1

13 62 2 2 2 **56** 44 1 1 2 **99** 61 1 2 2

14 76 1 2 1 **57** 81 1 2 2 **100** 47 2 1 2

15 57 2 1 2 **58** 52 1 3 2 **101** 64 1 2 1

16 69 2 3 2 **59** 67 1 2 1 **102** 69 2 3 1

17 65 1 1 2 **60** 78 2 1 1 **103** 46 2 3 2

18 63 1 2 2 61 59 2 1 1 104 62 1 1 1
19 52 1 2 2 62 58 1 3 1
20 76 2 2 2 63 76 2 2 1
21 72 2 2 2 64 60 1 1 1
22 64 1 3 1 65 68 2 2 1
23 83 1 3 1 66 71 2 2 1
24 74 1 2 2 67 60 2 2 2
25 61 2 2 1 68 78 2 1 1
26 76 2 3 1 69 67 1 2 1
27 45 2 1 1 70 65 1 3 1
28 56 2 2 1 71 59 1 3 1
29 57 1 3 1 72 50 2 2 2
30 78 1 2 2 73 68 1 2 2
31 69 2 2 1 74 63 2 2 2
32 62 2 2 1 75 51 2 2 1
33 58 1 3 2 76 39 1 3 2
34 45 1 2 1 77 83 2 3 1
35 84 2 1 1 78 52 1 2 2
36 76 2 2 2 79 72 1 3 2
37 55 2 2 1 80 48 2 2 2
38 77 2 2 2 81 62 2 2 2
39 59 2 3 2 82 51 2 1 1
40 67 1 1 1 83 63 1 2 1
41 47 2 3 1 84 49 1 3 2
42 67 2 2 1 85 50 1 2 2
43 48 1 3 2 86 72 2 2 2

Legenda: Sexo: 1=feminino, 2=masculino; **Genótipo** 1=AA, 2=AT e 3=TT; **Hp**=1 positivo, 2=negativo.

41

Anexo: 7. Grupo controle: idade, sexo, genótipo e sorologia p/ *H. pylori*

Controle IDADE Sexo

Genó

tipo

Hp (cont.)

IDAD

E

Sexo

1F 2M

Genó

tipo

Hp (cont.) IDADE Sexo

Genó

tipo

Hp

1 48 1 1 1 44 47 1 2 2 87 75 2 2 2
2 53 1 3 2 45 51 1 1 1 88 62 2 1 2
3 68 1 3 2 46 71 2 2 2 89 74 2 2 1
4 80 1 1 1 47 68 1 3 1 90 65 2 2 2

5 61 2 3 1 **48** 52 1 1 1 **91** 56 2 2 2
6 71 1 2 1 **49** 67 2 2 1 **92** 82 2 1 2
7 82 2 2 1 **50** 68 1 1 2 **93** 67 2 2 2
8 59 1 1 2 **51** 27 1 2 1 **94** 84 1 2 2
9 **52** 61 1 2 2 **95** 60 2 3 2
10 69 1 2 1 **53** 72 2 2 1 **96** 67 2 3 2
11 65 2 2 1 **54** 66 1 1 1 **97** 52 2 1 2
12 64 1 2 1 **55** 72 1 2 2 **98** 60 2 3 2
13 77 2 1 2 **56** 54 1 2 2 **99** 58 2 3 2
14 65 1 2 1 **57** 47 2 2 2 **100** 50 2 3 2
15 57 2 2 2 **58** 52 2 3 2 **101** 63 2 2 1
16 49 2 3 1 **59** **102** 78 1 3 2
17 70 1 3 2 **60** **103** 66 1 1 1
18 55 1 3 2 **61** 63 1 2 2 **104** 68 1 1 2
19 64 2 2 2 **62** 28 1 3 1 **105** 83 1 3 1
20 47 1 1 1 **63** 48 1 1 2 **106** 51 2 1 2
21 53 2 1 1 **64** 56 1 2 2 **107**
22 65 2 2 1 **65** 72 1 1 1 **108** 76 2 1 2
23 55 1 3 1 **66** 26 1 1 1 **109** 67 2 3 1
24 79 1 1 1 **67** 58 2 3 2 **110** 69 2 3 2
25 65 2 3 1 **68** 60 2 1 1 **111** 45 1 3 2
26 65 1 2 1 **69** 61 1 1 1 **112** 67 1 3 2
27 56 1 2 2 **70** 57 2 1 1 **113** 61 1 1 1
28 54 2 2 2 **71** **114** 57 1 1 1
29 45 2 3 1 **72** 33 1 2 1 **115** 44 2 1 1
30 70 1 2 1 **73** 34 2 3 1 **116** 75 2 2 1
31 61 2 1 1 **74** 65 1 3 1 **117** 72 2 3 1
32 29 1 2 2 **75** 52 1 3 1 **118** 76 1 2 2
33 59 1 2 1 **76** 55 1 3 1 **119** 65 2 2 1
34 **77** 37 1 2 2 **120** 68 1 3 2
35 75 1 1 2 **78** 31 2 3 2 **121** 75 1 1 2
36 57 1 2 2 **79** 26 1 3 2 **122** 79 2 2 1
37 38 1 2 1 **80** 57 1 2 1 **123**
38 38 1 3 2 **81** 64 2 1 1 **124** 76 2 1 1
39 38 1 2 1 **82** 69 2 1 2 **125** 74 2 2 1
40 55 2 2 2 **83** 70 1 3 2 **126** 77 2 3 1
41 51 1 3 1 **84** 74 1 3 2 **127** 73 1 2 1
42 64 1 3 1 **85** 45 1 1 1 **128** 77 2 2 1
43 59 2 3 1 **86** 70 1 2 2 **129** 80 1 2 2

Legenda: Sexo: 1=feminino, 2=masculino; **Genótipo** 1=AA, 2=AT e 3=TT; **Hp**=1 positivo, 2= negativo. Em vermelho e itálico os controles excluídos

Continua...

42

Continuação:

Controle IDADE Sexo

Genó

tipo

Hp (cont.)

IDAD

E

Sexo

1F 2M

Genó

tipo

Hp (cont.) IDADE Sexo

Genó

tipo

Hp

130 74 1 1 1 **173** 70 2 3 1 **216** 56 2 2 2

131 60 1 3 1 **174** **217** 63 2 2 2

132 76 1 3 2 **175** 69 1 2 1 **218** 57 2 2 2

133 69 2 1 2 **176** 80 1 2 2 **219** 75 2 2 1

134 62 1 3 1 **177** 39 1 3 1 **220** 64 2 2 2

135 75 2 3 1 **178**

136 80 2 3 1 **179** 80 2 2 1

137 65 2 3 1 **180** 70 1 2 2

138 62 2 3 2 **181** 67 1 2 1

139 69 2 1 1 **182** 77 1 2 2

140 73 2 3 1 **183** 74 1 2 1

141 61 2 1 1 **184** 65 1 1 1

142 64 1 1 1 **185** 70 1 2 2

143 76 2 3 2 **186** 65 1 2 2

144 66 1 3 1 **187** 54 1 1 2

145 67 1 2 2 **188** 39 2 3 2

146 64 2 3 1 **189** 65 1 1 2

147 77 1 3 2 **190** 76 1 3 2

148 66 2 2 2 **191** 62 1 3 2

149 58 2 1 2 **192** 38 2 2 1

150 69 1 3 1 **193** 64 1 1 2

151 63 2 2 1 **194** 63 1 1 2

152 70 2 1 1 **195** 80 1 2 1

153 62 1 2 1 **196** 58 1 3 1

154 78 1 1 1 **197** 63 1 1 2

155 67 1 1 1 **198** 60 2 2 1

156 70 1 3 1 **199** 52 1 3 1

157 81 1 1 2 **200** 68 2 3 1

158 59 1 2 2 **201** 71 2 1 1

159 86 1 2 1 **202** 62 2 2 1

160 91 1 1 1 **203**

161 76 1 1 1 **204** 56 2 2 1

162 68 1 2 2 **205** 62 2 3 1

163 62 2 2 1 **206**

164 63 1 2 2 **207** 77 2 1 2

165 69 2 1 2 **208** 71 2 2 2

166 **209** 69 2 2 2

167 63 1 2 1 **210** 74 2 1 1

168 38 1 2 2 **211** 73 2 1 1

169 73 1 2 1 **212** 61 2 2 2

170 68 1 2 2 **213** 68 2 3 2

171 57 1 3 1 **214** 70 2 3 2

172 63 1 3 1 **215** 52 2 1 1

Legenda: **Sexo:** 1=feminino, 2=masculino; **Genótipo** 1=AA, 2=AT e 3=TT; **Hp**=1 positivo, 2= negativo. Em vermelho e itálico os controles excluídos

43

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ando T, Kusugami K, Ohsuga M, Ina K, Shinoda M, Konagaya T, Sakai T, Imada A, Kasuga N, Nada T, Ichiyama S, Blaser MJ. Differential Normalization of Mucosal Interleukin-8 and Interleukin-6 activity after *Helicobacter pylori* Eradication. INFECTION AND IMMUNITY;1998;66(10):4742-7

Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. Current Opinion in Microbiology 2006;9:207-217

Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Maysushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. J. Interferon Cytokine Res. 22 (10) 2002: 1067-8

Borrmann R, Geschwülste des Magens. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, vol IV part 1. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1926;812-1054.

Brandt S, Kwok T, Hartig T, König W, Backert S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein., PNAS, 2005;102(26):9300-9305.

Buckland G, Bach A, Serra-Majem L. Adherence to a Mediterranean diet and risk of gastric adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study. Am J Clin Nutr 2010;91:381-90

Capasso M, Avvisati R A, Piscopo C, Laforgia N, Raimondi F, Angelis F, Iolascon A. Cytokine Gene Polymorphisms in Italian Preterm Infants: Association Between Interleukin-10 -1082 G/A Polymorphism and Respiratory Distress Syndrome. PEDIATRIC RESEARCH; 2007;61(3):313-317.

Clore, G.M., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., Gronenborn, A.M. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. Biochemistry v29 pp.1689-1696, 1990.

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Research, 1998;8(12):1229-31.

44

Con SA, Takeuchi H, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Yasuda N, Con-Wong R. Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica World J Gastroenterol. 2009;14;15(2):211-18

Correa P, Houghton J. Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastroenterology 2007;133:659-672

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol. 2007;18(3):581-92.

Flatland B. Helicobacter infection in humans and animals. Compendium, v. 24, n. 9, p.688-697, 2002.

Fornes NM, Filho RJG, Tadokoro H, Freire CAR. Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar. UNIFESP/Escola Paulista de Medicina. São Paulo: Manole, 2005;p101-103

Gonzalez EG, Padilla FJB, Ibarra SIMI, Gutierrez JPF, Garza HJM, Perez GIP. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. BMC Cancer 2007;7(70)1-5.

Hegedus O, Ryden J, Rehnberg AS, Nilsson S, Hellstrom PM. Validated accuracy of a novel urea breath test for rapid *Helicobacter pylori* detection and in-office analysis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 14(5):513-520.

IMMULITE. For the Detection of IgG Antibodies to *H. pylori* in Human Serum. Siemens Medical Solutions Diagnostics, 2006.

Invisorb® Spin Blod Mini KIT manual de extração e a purificação do DNA, 2009.

Ito H, Matsuo K, Hamajima N, Okuma K, Saito T, Tajima K. Significant association of interleukin 8 251T/A polymorphism with smoking behavior in a Japanese population. J Hum Genet 2005;50:567–573.

JGCA (Japanese Gastric Cancer Associations). Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition. Gastric Cancer. 1998;(1):10–24.

Joh T, Kataoka H, Tanida S, Watanabe K, Ohshima T, Sasaki M, Nakao H, Ohhara H, Higashiyama S, Itoh M. *Helicobacter pylori*-Stimulated Interleukin-8 (IL-8) Promotes Cell Proliferation Through Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Activation. Digestive Diseases and Sciences, 2005;50(11):2081–2089.

45

Johnson M A. Aminoácido e Proteínas, p.313-14. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Fundamentos de Química Clínica. 6ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2008

Karashima T, Sweeney P, Kamat A, Huang S, Kim S J, Bar-Eli M, McConkey D J, Dinney C P N. Nuclear Factor-B Mediates Angiogenesis and Metastasis of Human Bladder Cancer through the Regulation of Interleukin-8. Clinical Cancer Research, 2003;9:2786–2797.

Kim N, Cho I, Lee H S, Park J H, Kim J H, Kim J S, Jung H C, Song S I. The Discrepancy Between Genetic Polymorphism of p53 Codon 72 and the Expression of p53 Protein in *Helicobacter pylori*-Associated Gastric Cancer in Korea. Dig Dis Sci. 2010 Jan;55(1):101-10.

Kono S, Hirohata T. Nutrition and Stomach cancer. Cancer Causes Control 1996; 7(1):41-55. Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. J Bras Patol Med Lab. 2003;39:4.

Latorre MRDO. A mortalidade por câncer de estômago no Brasil: análise do período de 1977 a 1989. Cad Saúde Pública. 1997; 13(Supl 1):67-78.

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 1965;64:31–49

Lee W P, Tai D I, Lan K H, Li A F Y, Hsu H C, Lin E J, Lin Y P, Sheu M L, Li C P, Chang F Y, Chao Y, Yen S H, Lee S D. Allele of the Interleukin-8 Promoter Is Associated with Increased Risk of Gastric Carcinoma Featuring Diffuse-Type Histopathology in Chinese Population. Clin Cancer Research, 2005;11(18):6431-41.

Li C, Zienkiewicz J, Hawiger J. Interactive Sites in the MyD88 Toll/Interleukin (IL) 1 Receptor Domain Responsible for Coupling to the IL1 β Signaling Pathway. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2005;280(28):26152–59.

Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. Int. J. Cancer: 2009;124, 2406-15.

Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor α and risk of gastric cancer in a Chinese population. Carcinogenesis. 2005; 26(3):631-36.

Mac Donald JS, Hill MC, Roberts IM. Gastric cancer: epidemiology pathology, detection and staging. In Ahlgren JD, Mac Donald JS: Gastrointestinal. 1995;75:2203-8

46

Matysiak-Budnika T, Me'graudb F, *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. European Journal of Cancer; 2006;42:708–716.

Murakami K, Kodama M, Fujioka T. Latest insight into the effects of *Helicobacter pylori*

infection on gastric carcinogenesis. World Journal of gastroenterology. 2006;12(17):2713-2720.

Nieburgs HE and Glass GBJ. Gastric-cell maturation disorders in atrophic gastritis, pernicious anemia, and carcinoma. Dig Dis Sci. 1963; (8) 2:135-59

Ohyouchi M, Imatani A, Yonechi M, Asano N, Miura A, Iijima K, Koike T, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T. The polymorphism interleukin 8 –251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. GUT;2005;5(54):330-335.

Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Impact of IL8 and IL8-Receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. Bio Méd Central; Clinical and Molecular Allergy; 2006;(4):2;1-6.

Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Knayer U, Gonser T, Adler G, Brenner H. *Helicobacter pylori* among Preschool Children and Their Parents: Evidence of Parent-Child Transmission. The Journal of Infectious Diseases 1999;179:398–402

Salvo VLMA, Gimeno SGA. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimentos. Rev Saúde Pública. Rev. Saúde Pública. 2002;36(4);505-12.

Sandor J, Kiss I, Farkas O, Ember I. Association between gastric cancer mortality and nitrate content of drinking water: Ecological study on small area inequalities. European Journal of Epidemiology. 2001; 17: 443–47

Sarvestani E K, Bazargani A, Masoudian M, Lankarani K, Taghavi AR, Saberifiroozi M. Association of *H pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. World J Gastroenterol. 2006;12(32):5205-10.

Savage SA, Hou L, Lissowska J, Chow WH, Zatonski W, Chanock SJ, Yeager M. Interleukin-8 Polymorphisms Are Not Associated with Gastric Cancer Risk in a Polish Population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(3):589-591.

47

Selvaraj P, Anand SP, Jawahar MS, Chandra G, Banurekha B, Narayanan, PR. Promoter polymorphism of IL-8 gene and IL-8 production in pulmonary tuberculosis. Current Science, 2006;90(7):252-4.

Shirai K, Ohmiya N, Taguchi A, Mabuchi N, Yatsuya H, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Mori N, Goto H. Interleukin-8 gene polymorphism associated with susceptibility to non-cardia gastric carcinoma with microsatellite instability. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 21(2006) 1129–1135.

Siqueira JS, Lima PSS, Barreto AS, Quintans-Junior LJ. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* Revisão. RBAC. 2007;39(1):9-13.

Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006;21;12(19):2979-90.

Song, B, Zhang D, Zheng H, Wang X, Zhou Y, Liu X. Association of Interleukin-8 Gene Polymorphism With Cachexia From Patients With Gastric Cancer. Journal of Interferon & Cytokine Research. January 2010, 30(1): 9-14.

Stubbs JB, Marshall BJ. Radiation dose estimates for the carbon-14-labeled urea breath test. J Nucl Med 1993; 34(5):821-825.

Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H. Interleukin-8 Promoter Polymorphism Increases the Risk of Atrophic Gastritis and Gastric Cancer in Japan. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(11):2478-93.

Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, Lin S N, Toyokawa, T, Okada H, Shiratori Y, Oguma K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. Microbiology. 2004;150:3913-22.

Teixeira JBA, Nogueira MS. Câncer gástrico: fatores de risco em clientes atendidos nos

serviços de atenção terciária em um município do interior paulista. Rev Latino-am Enfermagem 2003 janeiro-fevereiro; 11(1):43-8.

Torok AM, Bouton AH, Goldberg JB *Helicobacter pylori* Induces Interleukin-8 Secretion by Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 5-Dependent and - Independent Pathways. Infection and Immunity. 2005;73(3):1523-31.

48

UICC. (União Internacional Contra o Câncer). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro, 2004.

Voutilainen M, Juhola M, Färkkilä M, Sipponen P. Foveolar hyperplasia at the gastric cardia: prevalence and associations. J Clin Pathol 2002;55:352-4.

Wen S, Moss S F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. Cancer Lett. (2008), doi:10.1016/j.canlet.2008.

Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A. Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. J. Exp. Med. 188 (9)1998: 1757-62.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.

ENDEREÇOS ELETRÔNICOS:

INCA. Instituto Nacional do Câncer: banco de dados. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2009>. Acesso em: agosto, 2009.

INCA. Instituto Nacional do Câncer: banco de dados. <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acesso em: janeiro, 2010.

ASC. (American Cancer Society). Cancer Facts and Figures 2009, http://www.cancer.org/docroot/PRO/content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2009_Presentation.asp, Acesso em: junho, 2009.

49

9. ABSTRACT

Background: *Helicobacter pylori* infection is associated with gastric cancer (GC) non-cardia, however, only a small proportion of infected people develop this cancer. Studies on specific strains of bacteria showed that the genetic and environmental factors are associated with this carcinogenesis. Interleukin-8 (IL-8) plays an important role in inflammation of the stomach mucosa after infection with *H. pylori*. Studies have shown that the polymorphism of IL-8 may increase the risk of GC. **Objective:** To investigate the association between polymorphism of IL-8, infection with *H. pylori*, lifestyle and risk of GC. **Patients and methods:** Case-control study done in patients with non-cardia GC compared with healthy subjects in the ratio 1:2, respectively. DNA was extracted from white blood cells, purified and polymorphism analysis was performed by PCR-RFLP and visualized by agarose gel electrophoresis to 5%. Infection with *H. pylori* was investigated by serum antibodies to *H. pylori*. Environmental issues such as smoking, alcohol consumption and diet were investigated by questionnaire. **Results:** A total of 312 individuals was studied, and 208 controls and 104 cancer patients. No significant differences between sex or age between the control group and patients with CG. The proportion of patients infected by *H. pylori* was similar ($p=0.15$) between the control group (53.8%) and case (45.2%). Lower frequency of AA genotype was found in the cancer group ($p=0.01$), however, no difference between alleles A and T. Cigarette smoking ($p=0.001$), sharp intake of fat ($p=0.003$) and low intake of vegetables ($p=0.02$) were more frequent in case group. A multivariate logistic regression analysis demonstrated a higher risk of GC in subjects with the heterozygous

genotype AT (OR: 2.28 95% IC 1,16-4,49, $p=0.02$) and excessive consumption of fat (OR: 1.77 95% CI 1,12-2,92, $p = 0.03$). Smokers and former smokers also showed increased risk of GC compared to the control group (OR: 1.89 95% CI 1,41-3,11, $p=0.01$). **Conclusions:** The presence of the AT genotype is associated with increased risk of GC in about two times. The percentage of patients with GC infected with *H. pylori*, diagnosed by serum antibody levels was not different from the control group in the population. No correlations between allele frequency and risk of GC. Individuals who consume too much fat, ex-smokers and smokers have a higher risk of GC.

KEY WORDS: Polymorphism, Interleukin-8, Gastric cancer

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)