

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

PÂMELA FERNANDA MARTINEZ

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *TLR2*
(rs1898830 e rs3804099) ENVOLVIDOS NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO DO *Helicobacter pylori* EM
PACIENTES DISPÉPTICOS**

BAURU
2014

PÂMELA FERNANDA MARTINEZ

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *TLR2*
(rs1898830 e rs3804099) ENVOLVIDOS NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO DO *Helicobacter pylori* EM
PACIENTES DISPÉPTICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira.

BAURU
2014

Martinez, Pâmela Fernanda.

M3857i

Investigação dos polimorfismos TLR2 (rs1898830 e rs3804099) envolvidos no processo inflamatório do *Helicobacter pylori* em pacientes dispépticos / Pâmela Fernanda Martinez -- 2014.

35 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Receptor toll like. 3. Polimorfismos. 4. Doenças gástricas. I. Oliveira, Juliana Garcia de. II. Título.

PÂMELA FERNANDA MARTINEZ

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *TLR2* (rs1898830 e rs3804099)
ENVOLVIDOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DO *Helicobacter pylori*
EM PACIENTES DISPÉPTICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Vanessa Doro Abdallah Kozlowiski
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dr. Paulo Henrique Weckwerth
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 02 de dezembro de 2014.

Dedico esta pesquisa a minha família, em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram e me deram forças, me ensinaram a nunca desistir. Dedico também a uma amiga que me ajudou muito.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Juliana de Oliveira Garcia que me deu a oportunidade e toda a base para desenvolver a pesquisa me ajudando e orientando.

À Universidade Sagrado Coração que proporcionou educação e estrutura para que fosse realizada todo trabalho.

Ao técnico do laboratório de Biologia Molecular Wilson Orcini e ao pesquisador João Paulo Bianchi Ximenez pela colaboração, paciência e dedicação.

Aos profs. Drs. Lucas Rasmussen e Spencer Payão pelo apoio e interesse em ajudar tanto no conteúdo e prática como no auxílio financeiro.

À Daniela Nicolielo pela competência em coordenar o curso de biomedicina sempre pensando nos alunos e buscando o melhor.

Às meninas estagiarias do laboratório que compartilharam os aprendizados, em especial a Weendelly Mayara Pereira que esteve comigo desde o início.

Ao meu namorado Ivan com quem desabafei e comemorei cada conquista, me motivou e me deu confiança.

Ao meu irmão Breno que amenizou as dificuldades cotidianas com seu bom humor e companheirismo.

À minha mãe Filomena e ao meu pai João que colaboraram de todas as formas possíveis com muito amor junto a minha família que sempre me ajudou e acreditou em mim.

À Fapesp pela disponibilização dos equipamentos e suporte financeiro e ao CNPq pela bolsa de pesquisa oferecendo essa oportunidade e experiência.

Toda minha gratidão à vocês!

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é o agente de infecção crônica mais comum em seres humanos, que coloniza especificamente as microvilosidades das células epiteliais gástricas. Esta bactéria pode ocasionar mudanças estruturais na mucosa gástrica e promover o desenvolvimento de gastrite, metaplasia, displasia e até o câncer gástrico. Fatores genéticos do hospedeiro associados a fatores ambientais, como infecção pelo *H. pylori*, podem aumentar o risco para doenças inflamatórias crônicas e consequentemente lesões gástricas pré-malignas. Portanto, é possível estabelecer uma relação entre os polimorfismos de uma variedade de genes humanos, os quais podem modificar os efeitos decorrentes da exposição natural ao ambiente, diminuindo ou aumentando o risco para uma infecção pelo *H. pylori*. Os receptores *Toll like* (TLRs) são uma classe de proteínas envolvidas na iniciação do processo inflamatório pelo *H. pylori* e que têm sido descritos como polimórficos. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão genotípico dos polimorfismos *TLR2* (19216 C/T - rs3804099 e 3013A/G - rs1898830) em um grupo de pacientes positivos para *H. pylori* (n=69) e um grupo de pacientes negativos para *H. pylori* (n=67); e a associação com a infecção do *H. pylori* na mucosa gástrica. Os polimorfismos foram genotipados pela técnica de PCR- RFLP (*Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism*), avaliando-se o padrão eletroforético a partir de DNA da mucosa gástrica para o gene *TLR2*. Para o SNP *TLR2* 3013A/G - rs1898830 todos os indivíduos avaliados em ambos os grupos foram considerados homocigotos selvagem (AA). Para o SNP *TLR2* 19216T/C - rs3804099, no grupo Hp positivo, as frequências genotípicas para TT, TC e CC foram 39,1, 49,3 e 11,6%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T e C foram 63,7% e 36,3%. No grupo Hp negativo, as frequências genotípicas para TT, TC e CC foram 26,9, 49,2 e 23,9%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T e C foram 51,5 e 48,5%. Nas análises estatísticas foi observada uma associação do genótipo raro CC com uma menor susceptibilidade a infecção para o *H. pylori* no modelo codominante (OR= 0,48, 95% IC=0,23-0,98, p=0,04), demonstrando o efeito protetor deste genótipo nos indivíduos sem a infecção por esta bactéria. O mesmo foi visto para a frequência alélica (OR=0,74, 95% IC= 0,56-0,99, p=0,04). Assim, evidenciou-se a associação protetora do alelo C em relação a infecção pelo *H. pylori* quando comparado os dois grupos.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*. Receptor *Toll Like*. Polimorfismo.

ABSTRACT

The *Helicobacter pylori* is the agent most common in human chronic infection, these colonizes the microvilli of gastric epithelial cells. This bacteria can cause structural changes in the gastric mucosa and promote the development of gastritis, metaplasia, dysplasia and even gastric cancer. Host genetic factors associated with environmental factors such as infection by *H. pylori* may increase the risk for chronic inflammatory diseases and thus premalignant gastric lesions. Therefore, it is possible to establish a relationship between polymorphisms of a variety of human genes, which may alter the effects of exposure to the natural environment, decreasing or increasing the risk for infection with *H. pylori*. Toll like receptors (TLRs) are a class of proteins involved in initiation of inflammatory process by *H. pylori* and have been described as being polymorphic. The objective of this study was to characterize the pattern of genotypic polymorphisms TLR2 (19216 C / T - rs3804099 and 3013A / G - rs1898830) in a group of patients positive for *H. pylori* infection (n = 69) and group of patients negative for *H. pylori* (n = 67) , and the association with infection with *H. pylori* . The polymorphisms were genotyped by PCR - RFLP (Polymerase Chain Reaction/ Restriction Fragment Length Polymorphism), evaluating the electrophoretic pattern of DNA from the gastric mucosa to the TLR2 gene. For TLR2 SNP 3013A/ G - rs1898830 all individuals evaluated in both groups were homozygous wild (AA). For SNP TLR2 19216T / C - rs3804099 , Hp positive group , the genotype frequencies for TT, TC and CC were 39.1, 49.3 and 11.6 % , respectively, while the T allele frequencies for 63 and C were , 7% and 36.3% . Hp negative group, the genotype frequencies for TT, TC and CC were 26.9, 49.2 and 23.9 % , respectively, while the allelic frequencies for T and C were 51.5 and 48.5%. In the statistical analysis was an association of the CC genotype rare with less susceptibility to infection for *H. pylori* codominant model (OR = 0.48, 95% CI = 0.23-0.98, p = 0.04) , demonstrating the protective effect of this genotype in patients without infection by this bacterium. The same was seen for the allele frequency (OR = 0.74, 95% CI = 0.56-0.99, p = 0.04). Thus, there was a protective association of the C allele in relation to infection by *H. pylori* compared the two groups.

Keywords: *Helicobacter pylori* . Toll Like Receptor. Polymorphism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO	11
2.1 CARCINOGENESE GÁSTRICA E O <i>Helicobacter pylori</i>	11
2.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO GÁSTRICO	12
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DO <i>H. PYLORI</i>	14
2.4 RECEPTORES DO TIPO <i>TOLL LIKE</i> (TLR)	14
3 OBJETIVO	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	17
4.2 CASUÍSTICA	17
4.3 ESTUDO MOLECULAR	18
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
5 RESULTADOS	22
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÕES	28
8 REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um microrganismo GRAM-negativo, flagelado que coloniza as células epiteliais gástricas. Os níveis de infecção por esta bactéria variam de acordo com o desenvolvimento do país, estando presente em 25-50% da população nos países bem desenvolvidos, e em 70-90% da população nos países em desenvolvimento (RHEE; PARK; CHO, 2014). Estes índices estão associados as condições culturais e de saneamento básico das populações, já que mecanismos de transmissão se caracterizam por ser pelas vias, fecal-oral e oral-oral (SIQUEIRA et al., 2007).

A infecção da maioria dos indivíduos é assintomática, mas cerca de 10-20% dos indivíduos podem desenvolver gastrite atrófica, displasia e úlceras péptica, e em torno de 3% o câncer gástrico. Em 1994, a bactéria foi classificada como carcinógeno do tipo 1 para câncer de estômago pelo *International Agency for Research on Cancer* (órgão subordinado à Organização Mundial da Saúde) (RHEE; PARK; CHO, 2014). O câncer gástrico é a segunda causa de morte no mundo, com incidência de 800.000 novos casos por ano (SABBI, 2011).

A vasta maioria destas bactérias que colonizam os hospedeiros é de vida livre, porém 20% se ligam fortemente às células epiteliais gástricas, podendo induzir mudanças ultraestruturais (SMITH et al., 2006). O conhecimento sobre o papel do *H. pylori* na tumorigênese gástrica é ainda incompleto. Sabe-se que a urease presente no *H. pylori* é, possivelmente, a proteína mais abundante expressa pelas bactérias, uma vez que representa 10% do total proteína em peso. A urease é mais conhecida pela sua atividade enzimática que conduz à hidrólise de ureia em amônia e dióxido de carbono, o que ajuda a neutralizar o pH no microambiente local (ALZAHIRANI et al., 2014).

O desenvolvimento de diferentes patologias depende da predisposição genética do hospedeiro e sua resposta imunitária. Inclui também fatores de virulência da bactéria e do meio ambiente, como a dieta e o estilo de vida (ZAUCO et al., 2013).

Dentre os fatores genéticos, pode-se fazer uma correlação entre os receptores *Toll like 2* (TLR2) e a infecção pelo *H. pylori* e outras doenças pépticas, inclusive o câncer gástrico. Os receptores conhecidos como *Toll like*, que reconhecem padrões moleculares associados aos microrganismos, são importantes membros da resposta imune inata, ou seja, responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo contra um patógeno. Os TLRs têm sido descritos como polimórficos e esta variação genética pode ser vantajosa em nível populacional, mas podem tornar alguns indivíduos com genótipos associados à ativação excessiva da resposta imune e

inflamação, propícios a desenvolver infecções crônicas, ou até mesmo o câncer (EL-OMAR, HOLD, 2008; SABROE et al., 2008).

Até o presente momento, foram identificados 13 tipos de receptores TLRs, e estes podem reconhecer diferentes ligantes bacterianos. Alguns TLRs reconhecem somente um tipo de padrão microbiano, entretanto o TLR2 reconhece uma variedade de moléculas incluindo as lipoproteínas bacterianas, os ácidos lipoteicóicos e peptidoglicanos constituintes das paredes celulares dos microrganismos (PEEK; FISK; WILSON, 2010).

O TLR2 tem sido associado ao reconhecimento do *H. pylori* e consequente iniciação da resposta imune primária dos indivíduos infectados (OLIVEIRA; DUARTE; SILVA, 2012). Há evidências que TLR2 é expresso em células epiteliais gástricas infectadas por esta bactéria, demonstrando que este receptor pode ter um papel significante na imunidade da mucosa gástrica após infecção pelo *H. pylori*. (SMITH et al., 2003).

Dessa forma, selecionamos dois polimorfismo encontrados no gene do TLR2 (3013A/G - rs1898830 e 19216T/C - rs3804099), e avaliamos pela técnica de PCR/RFLP as frequências alélicas e genotípicas destes polimorfismos; também fizemos a associação da suscetibilidade a infecção pelo *H. pylori* em uma amostra da população brasileira.

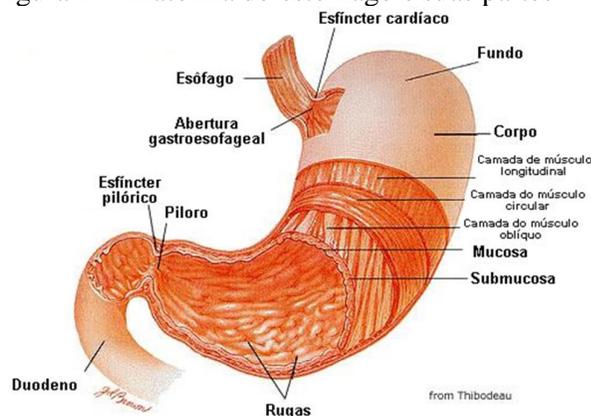
2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 CARCINOGENESE GÁSTRICA E O *Helicobacter pylori*

O estômago é um órgão sacular dividido em quatro regiões anatômicas, a cárdia, o fundo, o corpo e o antro. Ele está ligado superiormente ao esôfago pela região da cárdia e, inferiormente ao duodeno pelo esfíncter pilórico (Figura 1). A glândula gástrica típica é composta por três tipos de células: células mucosas; células principais, que secretam grandes quantidades de pepsinogênio e células parietais, que secretam ácido clorídrico e fator intrínseco. A principal característica da fisiologia gástrica é a secreção de ácido clorídrico, além da função do muco na proteção contra lesões (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Figura 1 - Anatomia do estômago e suas partes



Fonte: Meldau (c2006-2014).

O câncer gástrico representa um problema de saúde mundial, sendo a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer (AHN et al., 2012). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (2014), estimaram-se para o ano de 2014, 20.390 casos novos de câncer de estômago, sendo 12.870 entre os homens e 7.520 casos entre as mulheres. Esse dado é realmente preocupante uma vez que quando diagnosticado em estágio avançado, a doença é geralmente incurável (ZHANG et al., 2008).

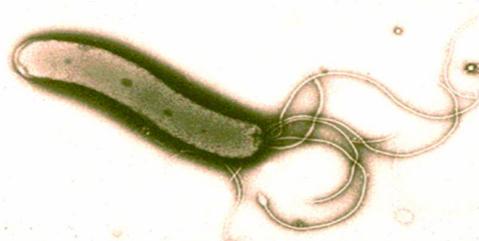
Os tumores do estômago se apresentam, predominantemente, na forma de três tipos histológicos: os linfomas diagnosticados em cerca de 3% dos casos, o leiomiossarcoma, iniciado em tecidos que dão origem aos músculos e aos ossos e o mais comum entre eles, o adenocarcinoma gástrico, que ocorre em 95% dos casos registrados. O pico de incidência se

dá em sua maioria em homens, por volta dos 70 anos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Os adenocarcinomas podem ser classificados quanto ao tipo histológico em dois principais grupos: tipo difuso e tipo intestinal. O do tipo intestinal é mais comumente associado com a infecção pelo *H. pylori* e fatores ambientais e progride por meio de um processo de múltiplas etapas com a participação de lesões gástricas com potencial pré-canceroso como gastrite aguda, gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e, finalmente, a formação de câncer gástrico (CORREA, 2004). Enquanto o adenocarcinoma do tipo difuso acomete principalmente indivíduos mais jovens, sendo o fator genético familiar muito relacionado. (ZABALETA, 2012; LIU et al., 2014).

A maioria das pessoas infectadas permanece assintomática, sendo que cerca de 15% - 20% dos infectados desenvolvem alguma doença gastrointestinal severa, tais como úlcera péptica, adenocarcinomas e linfomas (CHEN et al., 2013). Entretanto, quase todos os indivíduos *H. pylori* positivos têm gastrite crônica, e apenas 1 -2% dos infectados chegam a desenvolver o câncer de estômago (OLIVEIRA; SILVA, 2012). Na **Figura 2** pode-se visualizar a estrutura do *H.pylori*.

Figura 2 - *Helicobacter pylori*



Fonte: Meldau (c2006-2014).

2.1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO GÁSTRICO

A inflamação é o principal processo de defesa contra vários estímulos extracelulares, tais como agentes patogênicos, alimentos e poluentes ambientais. Quando as células respondem a estímulos por curtos períodos de tempo resulta em inflamação aguda ou fisiológica, no entanto, se a estimulação é mantida durante um tempo mais longo, este estado é conhecido como inflamação crônica ou patológica, e depende da capacidade de resposta do hospedeiro e da atividade bacteriana (KONTUREK, 2003).

Epidemiologicamente, doenças inflamatórias crônicas mostram uma forte associação com o risco de câncer. Muitos tumores são iniciados por lesão tecidual ou inflamação crônica, a qual pode ser ligada a infecções bacterianas, virais ou parasitárias. (STOICOV; CERNY; HOUGHTON, 2009)

O *H. pylori* provoca alterações no estômago e no duodeno (a primeira parte do intestino delgado). A bactéria infecta o tecido protetor que reveste o estômago, isso gera a liberação de certas enzimas e toxinas e a ativação do sistema imunitário. Juntos, esses fatores podem, direta ou indiretamente, prejudicar as células do revestimento, fazendo com que haja inflamação crônica nas paredes do estômago (gastrite) ou duodeno (duodenite) (GROVER, 2011).

A gastrite é a inflamação da mucosa do estômago e, muitas vezes, tem diferente significado para os leigos e para os médicos. O público, frequentemente, usa o termo gastrite como queixa, representando vários desconfortos relacionados com o aparelho digestivo (NI; MEI; SUN, 2012). Podemos classificar as gastrites em agudas ou crônicas. As gastrites agudas permitem uma abordagem mais simplificada, por serem de aparecimento súbito, evolução rápida e facilmente associadas a um agente causador. Na gastrite crônica, as lesões vão desde processo inflamatório superficial até a atrofia do epitélio (NI; MEI; SUN, 2012).

A maioria dos indivíduos infectados pelo *H. pylori* desenvolve uma pangastrite leve, condição que não altera negativamente a fisiologia gástrica e não está associada com doença significativa. Entretanto, esta bactéria é o principal agente etiológico em 95% dos casos de gastrite crônica (SMITH et al., 2006). A distribuição e gravidade da gastrite estão associadas com os níveis de secreção do ácido gástrico, bem como a localização gástrica da infecção pelo *H. pylori* e diversos tipos de cepas. Assim, a gastrite na região antral do estômago é associada a hipercloridria e alto risco de desenvolvimento de úlcera duodenal, enquanto a gastrite predominantemente na região do corpo gástrico leva a um quadro de hipocloridria e ao risco aumentado para câncer gástrico (SCHOLTE et al., 2002).

O aparecimento da gastrite, úlcera ou câncer depende da cepa do *H.pylori*, da sua virulência, da susceptibilidade do paciente e da interação bactéria e portador (JANG; KIM, 2011).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DO *H. pylori*

Também existem evidências substanciais indicando que diferenças genéticas do parasito têm um papel no resultado clínico da infecção pelo *H. pylori*, particularmente de genes relacionados à virulência como, *cagA*, *vacA*, *iceA* e *babA* (SEDAGHAT et al., 2014). O gene *cagA* faz parte da chamada ilha de patogenicidade e as linhagens positivas para este gene estão associadas com gastrites graves, úlceras pépticas, gastrites atróficas e câncer gástrico, além da expressão desta proteína estar associada com a redução do processo apoptótico (STOICOV et al., 2004). O segundo gene relacionado à virulência, o *vacA*, é responsável pela codificação de uma citotoxina vacuolizante, que induz a formação de vacúolos em células eucarióticas e estimula a apoptose celular. O gene *babA* codifica uma outra proteína de membrana, *babA*, que se liga ao receptor Lewis B das células gástricas e há evidências significantes indicando que o acúmulo da expressão desta proteína pode influenciar na severidade da doença (SMITH, HOLD; TAHARA; EL-OMAR, 2006). O gene *iceA* também tem sido estudado em cepas de *H. pylori* sendo suas principais variantes alélicas a *iceA1* e a *iceA2*. A função desses subtipos ainda não é compreendida. A expressão de *iceA1* é aumentada pelo contato da *H. pylori* com células epiteliais gástricas e em alguns casos sugerem a participação no desenvolvimento de úlceras pépticas (HUSSEIN, 2010). Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais o *H. pylori* participa provocando desregulação nos processos de proliferação celular, apoptose, respostas inflamatória e imune pelo hospedeiro, precisam ser melhores compreendidos.

2.4 RECEPTORES DO TIPO *TOLL LIKE* (TLR)

É conhecido que fatores genéticos do hospedeiro podem aumentar o risco para as lesões gástricas pré-malignas (AL-MOUNDHRI et al., 2006), portanto, é possível estabelecer uma relação entre doenças gástricas e os polimorfismos de uma variedade de genes humanos, os quais podem modificar os efeitos decorrentes da exposição natural ao ambiente, diminuindo ou aumentando o risco para a tumorigênese (NARDONE; MORGNER, 2003).

Os receptores *Toll like* (TLRs) são uma classe de proteínas que atuam num papel chave no sistema imune inato, e seus genes têm sido descritos como polimórficos. Eles são receptores não catalíticos de membrana que reconhecem moléculas estruturalmente conservadas derivadas dos microrganismos. Uma vez que esses patógenos tenham ultrapassado as barreiras físicas como da mucosa do trato intestinal ou a pele, eles são

reconhecidos pelos TLRs os quais ativam as respostas imunes celulares (FUKATA; ABREU, 2008).

A variação genética nestes genes pode ser vantajosa em nível populacional, mas pode tornar alguns indivíduos com genótipos associados à ativação excessiva da resposta imune e inflamação, propícios a desenvolver outras doenças, incluindo o câncer. (EL-OMAR, HOLD, 2008; SABROE et al., 2008).

Entre eles, têm sido demonstrados que o TLR2 (receptor de lipoproteínas bacterianas) está envolvido na resposta a infecção pela *H. pylori* e medeia a ativação de fatores de transcrição, principalmente via NF- κ B, resultando na inflamação. Atualmente, treze tipos de TLRs têm sido encontrados em humanos (PEEK; FISK; WILSON, 2010).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *Single-Nucleotide Polymorphisms*) em TLR2 têm sido associados à suscetibilidade para várias doenças inflamatórias e infecciosas, como lepra (KANG; CHAE, 2001), aumento do risco de sepse GRAM-negativa (SCHRÖDER et al., 2003) e infecções bacterianas recorrentes em crianças (KUTUKCULER; YENIAY; AKSU; BERDELI, 2007). Em adição, outros estudos recentes têm relacionado polimorfismos neste gene com câncer colorretal e cervical (INCA, 2014).

O *H. pylori* é inicialmente reconhecido para receptores do tipo toll via sinalização, sendo possível que os polimorfismos em genes funcionalmente relevantes deste braço do sistema imunitário podem afetar a magnitude e direção da resposta do hospedeiro contra a infecção. (CASTAÑO-RODRÍGUEZ et al, 2013).

Embora, mais de 20 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) tenham sido identificados dentro do gene *TLR2*, dois polimorfismos (rs1898830 e rs3804099) têm sido associados com doenças inflamatórias e aumento de produção de citocinas em sangue periférico em resposta ao estímulo por lipoproteína bacteriana. (CHEN et al., 2011).

3 OBJETIVOS

Tendo-se em vista os poucos estudos da literatura com polimorfismos de grupos de receptores TLRs envolvidos na infecção gástrica pelo *H. pylori* em pacientes brasileiros, este estudo teve por objetivos:

- a) Determinar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos em genes dos receptores *toll like*, *TLR2* (rs1898830 e rs3804099) em um grupo de indivíduos negativos para *H. pylori*; e determinar estes mesmos parâmetros em um grupo de pacientes positivos para *H. pylori*;
- b) Traçar um perfil genético desses polimorfismos em associação com risco aumentado para a infecção pelo *H. pylori*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação da Universidade do Sagrado Coração de Bauru-SP (USC) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Sagrado Coração com parecer número 071/12 (Anexo1). O projeto foi desenvolvido respeitando-se a Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos - Resolução CNS 196/96. Fizeram parte da amostragem, indivíduos de ambos os sexos que concordaram em participar dos estudos acima citados, após os devidos esclarecimentos e a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido efetuado pelos pesquisadores ou pelos médicos responsáveis dos setores envolvidos. Todas as amostras foram referidas por código, resguardando a identificação dos indivíduos.

4.2 CASUÍSTICA

Neste projeto, caracterizado como um estudo do tipo caso-controle utilizou-se um total de 140 amostras de DNA de biópsias gástricas provenientes de pacientes com dor abdominal, da cidade de Marília e região, atendidos no Serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília, submetidos à endoscopia digestiva alta e que não receberam drogas quimioterápicas, antiparasitárias ou antibióticos nos últimos 30 dias. O diagnóstico da infecção por *H. pylori* foi realizado previamente no hospital pelo teste da urease A e a confirmação pela avaliação molecular de genes deste microrganismo para todas as amostras. A Tabela 1 apresenta a caracterização dos indivíduos dos grupos *H. pylori* positivo (HP+) e *H. pylori* negativo (HP-) selecionados para participarem do estudo.

Tabela 1 - Descrição dos indivíduos dos grupos de *H. pylori* positivo (HP+) e *H. pylori* negativo (HP-) segundo as variáveis: sexo e idade.

Variáveis	<i>H. pylori</i> positivo (HP+)	<i>H. pylori</i> negativo (HP-)
	N (%)	N(%)
Mulheres	33 (47,14%)	42 (60%)
Homens	37 (52,85%)	28 (40%)
Total	70	70
< 18 anos	0 (0%)	17 (24,28%)
≥ 18 anos	70 (100%)	53 (75,71%)
Total	70	70

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3. ESTUDO MOLECULAR

4.3.1. Análise dos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos *TLR2* 19216T/C - rs3804099 e *TLR2* 3013A/G - rs1898830 foram determinados por amplificação gênica empregando-se a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para amplificar as regiões contendo os sítios polimórficos foram utilizados os *primers* descritos abaixo conforme sequências e protocolos na literatura. (Tabela 2).

Nas reações de PCR, com volume final de 25 µL, foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X, 2,0 µL de dNTPs (1,23 µmol/L), 0,5 µL de MgCl₂ (25 mmol/L), 1,25 µL de *primers* (25 µmol/L), 15,3 µL de dH₂O, 2,0 µL de DNA genômico e 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/ µL). O material foi processado em termociclador automático, sendo inicialmente submetido a uma temperatura de 94°C por 3 minutos para que ocorra a desnaturação. Posteriormente, para amplificação, submetido a 30 - 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, de 55-60°C por 30 segundos (Tabela 2), a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos de digestão foram visualizados em gel de agarose 1000 (©Invitrogen) com concentração de 2,5%, corado com brometo de etídio na presença de um marcador molecular de 100 pb.

Tabela 2 - Polimorfismos e suas sequências de *primers* e enzimas utilizadas.

Genes	Primers (5'-3')	T (°C) Anelamento	Enzimas	T(°C)	Fragmento	Referências
<i>TLR2</i> 19216T/C - rs3804099	F:TCCCTGGGC AGTCTTGAAC ATTAG R:TGTCCAAAT CAGTATCTCG CAGTTCC	0	6 <i>TaqI</i>	65	CC:415pb TC:415+109+306 pb TT:306+109pb	CHEN et al., 2011
<i>TLR2</i> 3013A/G - rs1898830	F: TGTCAGATGC ACCTAAACTG TTGC R: TCTCAGGATA ATGGCCTCCT GCTT	5	5 <i>MspI</i>	37	AA:353pb AG:353+13+220 pb GG:220+133pb	-
<i>Hpx</i> (Controle positivo)	F: GCGCAATCAG CGTCAGTAAT R: AATCCTAAAA CCTCATCCT	5	5 <i>MspI</i>	37	Fragmento: 423pb Corte: 350pb + 73pb	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Abaixo podem ser visualizados os padrões eletroforéticos da reação de PCR para o SNP *TLR2* 19216T/C - rs3804099 (Figura 3) e SNP *TLR2* 3013A/G - rs1898830 (Figura 4).

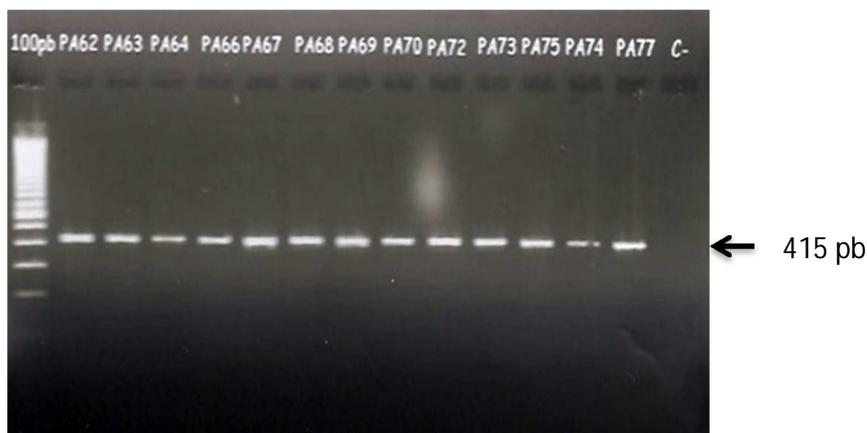


Figura 3 - Padrão de migração eletroforética na reação de PCR do gene *TLR2* para o estudo do SNP *TLR2* 19216T/C - rs3804099, fragmento de 415pb. Padrão molecular de 100pb.

Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 4 - Padrão de migração eletroforética na reação de PCR do gene *TLR2* para o estudo do *TLR2* 3013A/G - rs1898830, fragmento de 353 pb. Padrão molecular de 100pb.

Fonte: Elaborada pela autora.

Amplificou-se o gene *Hpx2* presente no *Helicobacter pylori* que funcionou como controle positivo em todas as reações de RFLP para o SNP *TLR2* 3013A/G - rs1898830, já que não foram encontrados genótipos polimórficos em nenhuma amostra analisada. O padrão eletroforético da reação de PCR para este gene pode ser visto na Figura 5.

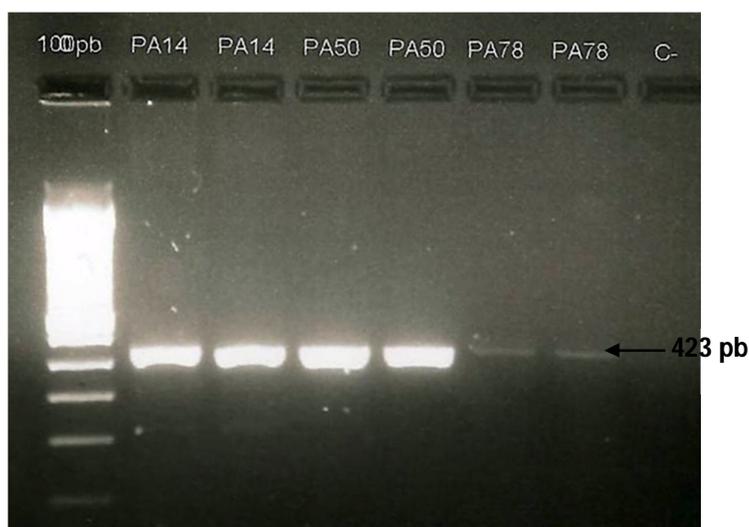
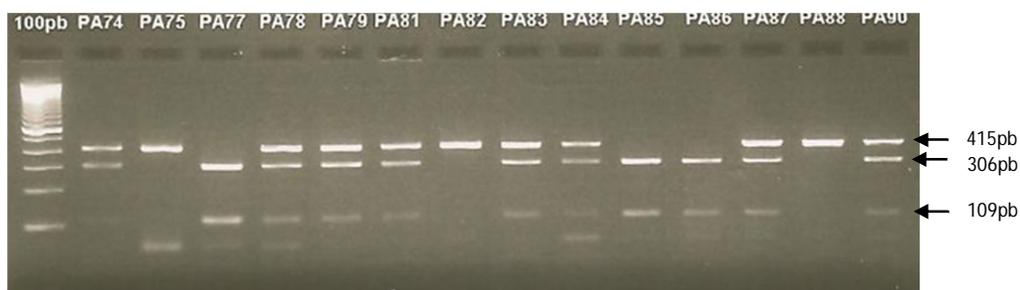


Figura 5 - Padrão de migração eletroforética na reação de PCR do gene *Hpx* utilizado como controle da reação enzimática para o estudo do SNP *TLR2* 3013A/G - rs1898830, fragmento de 423 pb. Padrão molecular de 100pb.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após as reações de amplificação, 10µL de produto de PCR foi digerido utilizando-se a enzima específica *TaiI* (12 horas a 65°C) ou *MspI* (12 horas a 37°C) conforme descrição na **Tabela 2**. Os padrões eletroforéticos da reação de RFLP para o estudo do SNP *TLR2* 19216T/C - rs3804099 podem ser visualizados na **Figura 6**.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 - Padrão de migração eletroforética para o polimorfismo *TLR2* (19216 T/C) após a reação de RFLP, onde observamos homocigoto selvagem TT = 415pb (PA75, PA82, PA88), heterocigoto TC = 415+306+109pb (PA74, PA78, PA79, PA81, PA83, PA84, PA87 e PA90), e homocigoto polimórfico CC = 306+109pb (PA77, PA85 e PA86). Coluna 1: padrão molecular de 100pb.

Entretanto, para a análise do polimorfismo SNP *TLR2* 3013A/G - rs1898830 utilizou-se um controle positivo em todas as reações de RFLP, já que não foram encontrados genótipos polimórficos em nenhuma amostra analisada. Assim para confirmar a veracidade dos resultados do RFLP, utilizou-se um controle positivo para a enzima específica *MspI*. O fragmento utilizado corresponde ao gene presente no *Helicobacter pylori*, *Hpx2* de 423 pb, que apresenta com certeza o sítio de corte das enzima, obtendo os fragmentos de 350 pb + 73pb (**Figura 7, Tabela 2**). Os padrões eletroforéticos da reação de RFLP para o estudo do SNP *TLR2* 3013A/G - rs1898830 podem ser visualizados na **Figura 7**.

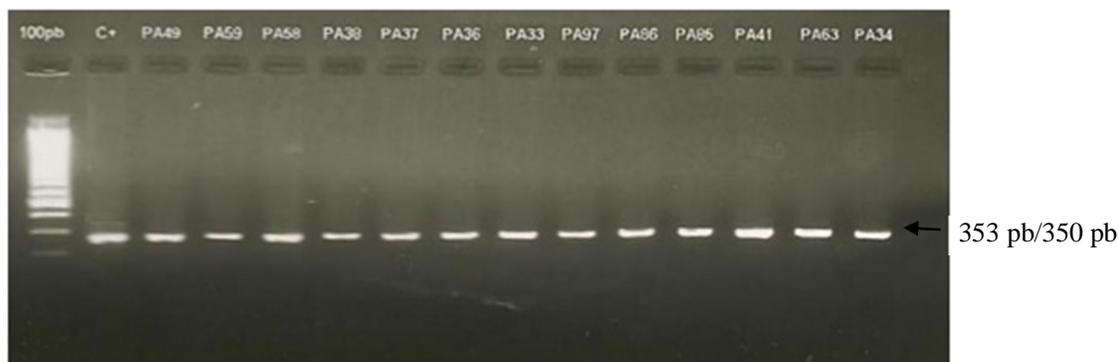


Figura 7 - Padrão de migração eletroforética para o polimorfismo *TLR2* 3013A/G - rs1898830 após a reação de RFLP, onde observamos todas as amostras (PA49, PA59, PA58, PA38, PA37, PA36, PA33, PA97, PA86, PA41, PA63, PA34) homozigotas selvagens (353pb). O gene *Hpx foi* utilizado como controle da reação enzimática, obtendo fragmentos de 350pb + 73pb (coluna 2 - C+). Padrão molecular de 100pb (coluna 1). Fonte: Elaborada pela autora.

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a comparação das frequências genóticas e alélicas entre os grupos utilizou-se o teste exato de Fisher. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aplicado para avaliar as frequências alélicas no programa *SNPstats*. (Institut Català d'Oncologia, 2006). A associação entre os polimorfismos e a presença da infecção por *H. pylori* foi analisado seguindo três modelos genéticos: codominante (alelos homozigotos de maior ocorrência vs alelos homozigotos de menor ocorrência ou alelos homozigotos de maior/menor ocorrência vs heterozigotos); dominante (alelos homozigotos de maior ocorrência vs heterozigotos+alelos homozigotos de menor ocorrência) e recessivo (alelos homozigotos de maior ocorrência + heterozigotos vs alelos homozigotos de menor ocorrência) Nas análises $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

5 RESULTADOS

As amostras de 136 indivíduos foram genotipadas para *TLR2* 3013A/G - rs1898830 e *TLR2* 19216T/C - rs3804099, pois 4 amostras (1 amostra do grupo *H. pylori* positivo e 3 amostras do grupo *H. pylori* negativo) encontravam-se com o DNA degradado, assim nosso grupo amostral foi totalizado em 69 amostras positivas e 67 negativas para o *H. pylori*.

Para o SNP *TLR2* 3013A/G - rs1898830 todos os indivíduos avaliados em ambos os grupos foram considerados homocigotos selvagem (AA), assim não foram realizados testes estatísticos com relação a este SNP.

As frequências alélicas e genotípicas para o SNP *TLR2* 19216T/C - rs3804099 estão de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos Hp positivo (Hp+) e Hp negativo (Hp-). O padrão eletroforético deste polimorfismo está representado na **Figura 5**.

Para o grupo Hp positivo, as frequências genotípicas para TT, TC e CC foram 39,1, 49,3 e 11,6%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T e C foram 63,7% e 36,3%. Para o grupo Hp negativo, as frequências genotípicas para TT, TC e CC foram 26,9, 49,2 e 23,9%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T e C foram 51,5 e 48,5% (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Frequências alélicas e genotípicas das amostras de DNA avaliadas nos grupos Hp+ e Hp- para o polimorfismo *TLR2* 19216 T/C - rs3804099

<i>TLR2</i> 19216 T/C - rs3804099	H. pylori positivo (Hp+)	H. pylori negativo (Hp-)
Genótipos	N (%)	N(%)
TT	27 (39,1%)	18 (26,9%)
TC	34 (49,3%)	33 (49,2%)
CC	8 (11,6%)	16 (23,9%)
Total	69 (100%)	67 (100%)
Alelos		
T	88 (63,7%)	69 (51,5%)
C	50 (36,3%)	65 (48,5%)
Total	138 (100%)	134 (100%)

TT= Homocigoto Selvagem; TC= Heterocigoto; CC= Homocigoto polimórfico
Fonte: Elaborada pela autora.

As análises estatísticas para comparação entre as frequências alélicas e genotípicas nos modelos (codominante, dominante e recessivo para os alelos raros) nos grupos Hp+ e Hp- estão representados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Análise das frequências genóticas e alélicas nos modelos codominante, dominante e recessivo nos grupos Hp positivo e Hp negativo para o SNP *TLR2* 19216T/C - rs3804099

OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de Confiança; * Diferença estatisticamente significativa
 Fonte: Elaborada pela autora.

Modelo <i>TLR2</i> 19216T/C - rs3804099	Genótipos/ Alelos	Grupos		OR (95%IC)	p
		Hp positivo- n(%)	Hp negativo - n(%)		
Codominante - OR (95%CI), p	TT	27 (39,1%)	18 (26,9%)	1	0,11
	TC	34 (49,3%)	33 (49,2%)	0,68 (0,32- 1,48)	
	CC	8 (11,6%)	16 (23,9%)	0,48 (0,23- 0,98)	
Dominante - OR (95%CI), p	TT	27 (39,1%)	18 (26,9%)	1	0,13
	TC/CC	42 (60,9%)	49 (73,1%)	0,57 (0,27- 1,19)	
Recessivo - OR (95%CI), p	TT/TC	61 (88,4%)	51 (76,1%)	1	0,06
	CC	8 (11,6%)	16 (23,9%)	0,42 (0,17- 1,08)	
Alelos	T	0,64	0,51	0,74 (0,56 - 0,99)	0,04*
	C	0,36	0,49		

Nesta análise foi observada uma associação do genótipo raro CC com uma menor susceptibilidade a infecção para o *H. pylori* no modelo codominante (OR= 0,48, 95% IC=0,23-0,98, p=0,04), demonstrando o efeito protetor deste genótipo. Na análise de frequência alélica, também se evidenciou a associação protetora do alelo C em relação à infecção pelo *H. pylori* quando comparado os dois grupos (OR=0,74, 95% IC= 0,56-0,99, p=0,04).

6 DISCUSSÃO

Os receptores do tipo *toll like* constituem uma família de proteínas transmembranas que reconhecem padrões moleculares microbianos, ou seja, moléculas conservadas em vários microrganismos. Por isso, possuem um papel fundamental na resposta imune inata estando envolvidos no reconhecimento de patógenos e na regulação de respostas inflamatórias (ABU-MAZIAD et al., 2010).

O TLR2 (*toll like receptor 2*) é responsável predominantemente pelo reconhecimento de bactérias Gram-positivas, entretanto, investigadores têm hipotetizado que mutações gênicas poderiam estar diminuindo a resposta as lipoproteínas de bactérias Gram-positivas e aumentando o risco de infecção para estas bactérias (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009). O *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa, mas mesmo assim o TLR2 tem sido descrito como receptor de reconhecimento desta bactéria e medeia a ativação de fatores de transcrição, principalmente via NF- κ B, resultando na inflamação. (BALKWILL, MANTOVANI, 2001; COUSSENS, WERB, 2002).

Evidências recentes demonstram que existe uma diversidade de segmentos genéticos no receptor *Toll Like*, especificamente do TLR2, acionando a resposta inflamatória e podendo levar a diferentes graus de inflamação no hospedeiro, resultando em diferentes destinos patológicos. Alguns genótipos mais virulentos já são bem descritos, como os SNPs rs5743704 e rs5743708, entretanto não são suficientes para explicar a associação dessa bactéria com doenças gastrointestinais, principalmente relacionadas ao câncer gástrico (CHEN et al., 2011).

O TLR2 3013 A/G (rs1898830) é um SNP com poucos estudos na população mundial e nenhum trabalho na população brasileira. Até o presente o MAF "MinorAlleleFrequency" deste SNP é 0,262, esta variável determina a frequência do menor alelo, assim deveríamos considerar o alelo raro G deste SNP em uma frequência de 26,2% na população. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1898830).

No entanto, em nossos estudos não encontramos nenhum indivíduo polimórfico G, sendo 100% do nosso grupo amostral genótipo AA. Este resultado tornou-se uma limitação de nosso estudo, apesar de termos usado um controle positivo para verificar o funcionamento da enzima em todas as reações de RFLP, acredita-se que pelo número amostral deveriam ter aparecido alelos raros G nesta população. Para podermos publicar estes dados, precisaremos confirmar estes resultados, utilizando outras metodologias.

O outro SNP avaliado, TLR2 19216 T/C rs3804099, está localizada no exon 3 e induz uma variação sinônimo (Asn199Asn). O MAF é considerado 0,431 (43,1%) para o alelo C raro. Entretanto, os estudos encontrados na literatura são muito contraditórios tanto em relação as frequências genotípicas e alélicas nas populações avaliadas, como também em relação ao alelo que estaria associado as doenças testadas (CHEN et al., 2013; CHENG et al., 2013).

Em nosso trabalho o alelo raro C foi considerado risco para a infecção para o *H. pylori* e obteve-se as respostas dos dados estatísticos em relação a esta hipótese. Assim, encontrou-se que o alelo raro C e o genótipo CC estão associados a um efeito protetor para a infecção pelo *H. pylori*. Uma meta análise que avaliou cinco estudos com este polimorfismo encontrou uma diminuição do risco para o câncer associado aos genótipos CC e TC em relação ao genótipo TT, principalmente na população asiática, sendo considerado um fator protetor, dados que corroboram os nossos resultados (WANG et al., 2013).

Zeng et al. (2011) avaliaram a associação deste SNP em amostras de câncer gástrico, sendo o único trabalho em amostras gástricas na literatura. Eles encontraram frequências genotípicas um pouco diferentes das vistas em nosso estudo (43,5%, 46,6% e 9,9% no grupo controle e 53,2%, 39,9% e 6,9% no grupo caso, frequências validas para TT, TC e CC respectivamente), entretanto, demonstraram que os genótipos TC + CC promoviam uma diminuição da susceptibilidade ao câncer gástrico quando comparado ao genótipo TT. Também concluíram que os portadores do genótipo TT e infectados por *H. pylori* eram ainda mais susceptíveis ao aparecimento do câncer. Os dados presentes neste raro trabalho em câncer gástrico corroboram os resultados encontrados pelo nosso grupo, e reforçam a importância dos nossos relatos, já que não há estudo semelhante na população brasileira.

Um trabalho recente avaliou este SNP em populações raciais brancas e negras e fez a associação com o processo inflamatório da endometriose. Foram encontradas entre mulheres brancas proporções semelhantes as observadas no presente para o grupo Hp negativo, sendo 29,2% TT, 50% TC e 20,8% CC, entretanto eles concluíram uma maior associação dos portadores do genótipo CC e a ocorrência de endometriose nas mulheres avaliadas (TAYLOR et al., 2013).

Como pode ser observado, poucos são os estudos relacionando este SNP TLR2 19216 T/C rs3804099 com doenças inflamatórias (ABU-MAZIAD et al., 2010; TAYLOR et al., 2013; GOLOVKIN et al., 2014) e/ou câncer (ZENG et al., 2011; JUNJIE et al., 2012; KIM et al., 2012; SLATTERY ML, HERRICK JS, BONDURANT KL, WOLFF RK., 2012). Assim, os resultados encontrados no presente trabalho tornam-se de grande importância. Trata-se do

primeiro relato na população brasileira que investigou e encontrou associação de genótipo CC e do alelo raro C com a infecção pelo *Helicobacter pylori*, o efeito protetor desta variante genética apresenta uma grande importância na tumorigênese gástrica, já que este microrganismo está fortemente associado ao desenvolvimento da carcinogênese do estômago (TAKAISHI; OKUMURA; WANG, 2008).

7 CONCLUSÕES

- a) Para o SNP *TLR2* 3013A/G todos os indivíduos avaliados em ambos os grupos foram considerados homocigotos selvagem AA. Para o SNP *TLR2* 19216 T/C, no grupo Hp positivo, as frequências genotípicas para TT, TC e CC foram 39,1, 49,3 e 11,6%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T e C foram 63,7% e 36,3%. No grupo Hp negativo, as frequências genotípicas para TT, TC e CC foram 26,9, 49,2 e 23,9%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T e C foram 51,5 e 48,5% ;
- b) Para o SNP *TLR2* 3013 A/G (rs1898830) não pudemos realizar análises estatísticas, sendo, portanto necessárias novas técnicas para confirmação destes dados. Já o SNP *TLR2* 19216 T/C rs3804099 teve evidências de associação do seu alelo raro C com efeito protetor em relação a infecção pelo *H. pylori*, assim enfatizando a contribuição de fatores genéticos envolvidos com a resposta inflamatória do estômago;
- c) Os resultados presentes neste estudo são de grande importância no estudo de doenças gástricas, pois trata-se do primeiro trabalho com este polimorfismo no gene *TLR2* na população brasileira.

REFERÊNCIAS

ABU-MAZIAD, A. et al. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. **Pediatric research**, New York, v. 68, n. 4, p. 323-329, oct, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463618>>. Acesso em: 15 março 2012.

AHN, D. H. et al. Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. **Mol Carcinogenesis**, New York, Sep 21, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23001871>>. Acesso em: 15 março 2013.

ALZAHARAN I et al. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells. **World Journal Gastroenterol**, Beijing, v.20 n.36 p. 12767-12780, Sep 28, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278677>>. Acesso em: 10 out 2014.

AL-MOUNDHRI, MS. et al. Interleukin-1beta gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. **Gastric Cancer**, Korea, v. 9 n. 4, p. 284-290, nov 24, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17235630>>. Acesso em: 15 março 2012.

BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, London, v. 357 n. 9255 p.539-545, Feb 17, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684>>. Acesso em: 15 março 2012

CASTAÑO-RODRÍGUEZ N et al. The role of TLR2, TLR4 and CD14 genetic polymorphisms in gastric carcinogenesis: a case-control study and meta-analysis. **PLOS ONE**, San Francisco, v.8 p.10-13, Apr 2, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565226>>. Acesso em: 17 abril 2013

CHEN A. et al. Risks of interleukin-1 genetic polymorphisms and Helicobacter pylori infection in the development of gastric cancer. **Aliment Pharmacology & Therapeutic**, Oxford, v.20, n.2, p.203-211, Jul, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233701>>. Acesso em: 15 março 2012.

CHEN KH. et al. Identification of haplotype tag SNPs within the entire TLR2 gene and their clinical relevance in patients with major trauma. **Shock**, New York, v.35,n.1 p.35-41, Jan, 2011. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577149>>. Acesso em: 15 março 2012.

CHEN MY, HE CY, MENG X, YUAN Y. Association of Helicobacter pylori babA2 with peptic ulcer disease and gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v.14, n.23, p.194-242, Jul, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864790>>. Acesso em: 22 jul 2013.

CHENG CH, LEE YS, CHANG CJ, LIN TY. Genetic polymorphisms in Toll-like receptors among pediatric patients with renal parenchymal infections of different clinical severities. **Plos One**, San Francisco, v.8 n.3, Mar 4, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484049>>. Acesso em: 22 jun 2013.

CORREA P. The biological model of gastric carcinogenesis. **IARC Scientific Publication**, France, n.157, p.301-310, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055303>>. Acesso em: 22 jun 2013.

COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and cancer. **Nature**, New York, p.19-26 v.420 n. 6917 p. 860-867. Dec, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490959>>. Acesso em: 22 jun 2013.

EL-OMAR EM. Mechanisms of increased acid secretion after eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, Texas, v.55, n.2, p. 144-146, Feb, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407378>>. Acesso em: 22 jun 2013.

EL-OMAR EM, NG MT, HOLD GL. Polymorphisms in toll like receptor genes and risk of cancer. **Oncogene**, New York, v.27, n.2, p.244-252, Jan 7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18176606>>

FUKATA, ABREU. Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. **Oncogene**, New York, v.27, p. 234-243, Jan 7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18176605>>. Acesso em: 22 jun 2013.

GOLOVKIN AS et al. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. **Cytokine**, London, v.8, n.1, p. 16-21. Sep 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213166>>. Acesso em: 10 out 2014.

GONCALVES MH. et al. *Helicobacter pylori* virulence genes detected by string PCR in children from an urban community in northeastern Brazil. **Clinical Microbiology**, Switzerland, v.51 p.988-989, Mar, 2013, doi: 10.1128/JCM.02583-12. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254125>>. Acesso em: 22 jun 2013.

HUSSEIN NR. *Helicobacter pylori* and gastric cancer in the Middle East: a new enigma? **World J Gastroenterol**, Beijing, v.16, p.3226-3234, Jul 14, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20614477>>. Acesso em: 22 jun 2013.

INCA- Instituto Nacional do Câncer, Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago>>. 2014.

Institut Català d' Oncologia. Hospital Duran I Reynals.2006. Disponível em: <<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>>. Acesso em: 11 fev 2012.

ISRAEL DA, PEEK RM JR. The role of persistence in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Curr Opinion in gastroenterology**, United States, v. 22 n.1, p. 3-7, Jan, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319669>> . Acesso em: 22 jun 2013.

JANG, KIM. Molecular pathology of gastric carcinoma. **Pathobiology**, United States, v.78, p.302-10, Nov 18, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22104201>> . Acesso em: 22 jun 2013.

JUNJIE X. et al. The association between Toll like receptor 2 singles nucleotide polymorphism and hepatocellular carcinoma susceptibility. **Biomed Central**, London, p. 12-57, Feb 7, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309608>>. Acesso em: 22 jun 2013.

KANG TJ, CHAE GT. Detection of toll like receptor 2 (TLR2) mutation in the leprosy patients. **Fems Immunology Medicinal Microbialy**, New York, v,31, p.53-58, Jul 31, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476982>>. Acesso em: 22 jun 2013.

KIM MK, et al. Association of Toll-like receptor 2 polymorphisms with papillary thyroid cancer and clinicopathologic features in a Korean population. **Jornal Korean Medicine Scitific**, Korea, v.27 p. 1333-1338, Oct 30, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166414>>. Acesso em: 22 jun 2013.

KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 30, n.4, p.621-5., Aug 15, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686699>> . Acesso em: 22 jun 2013.

KUTUKCULER N, YENIAY BS, AKSU G, BERDELI A. Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor- 2 gene in children with recurrent febrile infections. **Biochemical Genetics**, New York, v.45, p.507-514, Jun 7, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554618>>. Acesso em: 22 jun 2013.

LIU et al. Interleukin-23A is associated with tumor growth in Helicobacter-pylori-related human gastric cancer. **Cancer Cell International**, Amsterdam, v.14 p.104, 2014. Disponível em: <<http://www.cancerci.com/content/14/1/104>> . Acesso em: 10 out 2014.

MELDAU, D. C. Estômago. **Infoescola**, c2006-2014. Disponível em:<<http://www.infoescola.com/sistema-digestivo/estomago/>>. Acesso em: 10 set. 2014.

MELDAU, D. C. Helicobacter pylori. **Infoescola**, c2006-2014. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/reino-monera/helicobacter-pylori/>>. Acesso em: 10 set. 2014.

MULLER LB, FAGUNDES RB, MORAES CC, RAMPAZZO A. Prevalence of Helicobacter pylori infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia, **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.44 p.92-98, Apr-Jun , 2007. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17962851>>. Acesso em: 22 jun 2013.

NARDONE G, MORGNER A. *Helicobacter pylori* and gastric malignancies. **Helicobacter**, Oxford, v.8, p.44-52, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617217>>. Acesso em: 22 jun 2013.

NI J, MEI M, SUN L. Oxidative DNA damage and repair in chronic atrophic gastritis and gastric_cancer. **Hepatogastroenterology**, Athens, v.9, p.671-5, May, 2012. doi: 10.5754/hge12177. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469707>> . Acesso em: 22 jun 2013.

OLIVEIRA, J. G.; DUARTE, M. C.; SILVA, A. E. IL-1ra anti-inflammatory cytokine polymorphism is associated with risk of gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population, but the TNF- β pro-inflammatory cytokine is not. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 7, p. 7617-25, Jul 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327782>>. Acesso em: 22 jun 2013.

PEEK RM JR, FISKE C, WILSON KT. Role of Innate Immunity in Helicobacter pylori-Induced Gastric Malignancy, **Physiol Ver**, New York, v.90 p.831–858, Jul 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664074>>. Acesso em: 22 jun 2013.

RHEE; PARK; CHO. *Helicobacter pylori*: Bacterial Strategy for Incipient Stage and Persistent Colonization in Human Gastric Niches, **Yonsei Med**, Korea v. 55 n6 p.1453-1466, 2014, nov 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323880>>. Acesso em: 10 out 2014.

ROBBINS, COTRAN, **Pathologic bases of disease**. Saunders: Philadelphia, 2005.

SABBI T, Short review about Helicobacter pylori infection in pediatric age: epidemiological and clinical findings, diagnosis, therapy and role of probiotics, **Pediatr Med Chir**, Vicenza, v.33, p.221-6, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22428430>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SABROE I, PARKER LC, DOWER SK, WHYTE MK. The role of TLR activation in inflammation. **Journal of Pathology**, United States, v.214, p.126–135, Jan 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18161748>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SÁNCHEZ-ZAUCO NA et al. Impact of cagPAI and T4SS on the Inflammatory Response of Human Neutrophils to Helicobacter pylori Infection. **Plos One**, San Francisco, v.8, n.6 , Jun 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23755130>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SCHOLTE GH et al. Genotyping of helicobacter pylori in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: Relation to histological parameters and effects on therapy. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 97, n. 7, p. 1687-1695, Jul 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135019>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SCHRÖDER NW et al. Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. **Jornal Biology Chemistry**, Cambridge, v,18, p.15587-94, May 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594207>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SCOTT DR, MARCUS EA, WEN Y, OH J, SACHS G. Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.104, p.7235-7240, Apr 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438279>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SEDAGHAT H. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2*, and *oipA* genotypes in patients with upper gastrointestinal diseases. **Iranian Jornal of**

Microbiology, Iran, v.6, n.1, p.14-21, Feb 2014. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/viewFile/750/380>>. Acesso em: 10 jan 2014.

SIQUEIRA JS, LIMA PSS, BARRETO AS, QUINTANS-JUINOR LJ. Aspectos gerais na infecção pelo *Helicobacter pylori*. Revisão. **RBAC**. v.39, p.9-13, 2007. Acesso em: 22 jun 2013.

SLATTERY ML, HERRICK JS, BONDURANT KL, WOLFF RK. Toll-Like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. **Internacional Jornal Cancer**, Totowa, v.130. p.2974-2980, Jun 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792899>>. Acesso em: 22 jun 2013.

SMITH MF JR. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. **Jornal of Biology Chemistry**, Hong Kong, v. 278, n. 35, p. 32552-60, Aug 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807870>>. Acesso em: 15 março 2012.

STOICOV C. et al. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling, **Gene**, Notherland, v. 27, p.1-17, Oct 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474284>>. Acesso em: 15 março 2012.

STOICOV C, LI H, CERNY J, HOUGHTON JM. How the study of *Helicobacter* infection can contribute to the understanding of carcinoma development, **Clinica of Microbioly and Infection**, Paris, v.15 p.813-822, Sep 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19702586>>. Acesso em: 15 março 2012.

TAKAISHI S, OKUMURA T, WANG TC. Gastric cancer stem cells. **Jornal Clinical Oncology**, Lewis, v.17, p.2876-2882, Jun 10, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539967>>. Acesso em: 15 março 2012.

TAYLOR BD. et al. Racial Variation in Toll-Like receptor Variants Among women with Pelvic Inflammatory disease. **The Journal of Infectious disease**, Los Angeles, v.207 p. 940-946, Mar 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23255565>>. Acesso em: 22 jun 2013.

WANG W. et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. **Human Genetics**, Berlin, Feb 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23430453>>. Acesso em: 22 jun 2013.

WU WK. et al. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 295, n. 2, p. 144-53, Sep 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488613>>. Acesso em: 15 março 2012.

ZABALETA, J. Multifactorial etiology of gastric cancer. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 863, p. 411-35, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22359309>>. Acesso em: 15 março 2012.

ZENG HM. et al. [The correlation between polymorphisms of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 9 and susceptibility to gastric cancer]. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi**,

Beijing, v. 45, n. 7, p. 588-592, Jul 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041559>>. Acesso em: 15 março 2012.

ZHANG, J. et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. **Jornal of Human Genetic**, Dalhi, v.53, n.6, p. 479-89, Mar 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350251>>. Acesso em: 15 março 2012.

ANEXO 1 - CERTIFICADO DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CERTIFICADO**

Baseado em parecer competente este Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto "INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS TLR2 (RS1898830 E RS3804099) ENVOLVIDOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO DO HELICOBACTER PYLORI EM PACIENTES DISPÉPICOS", sob o protocolo nº 071/12, tendo como responsável a pesquisadora JULIANA GARCIA DE OLIVEIRA e o considerou Aprovado.

Bauru, 28 de novembro de 2012.



Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan
Presidente Comitê de Ética em Pesquisa – USC